

Твердофазный синтез олигосахаридов и гликоконъюгатов

Н.К.Кочетков

*Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук
117913 Москва, Ленинский просп., 47, факс (095) 135 – 5328*

Рассмотрено применение полимерных носителей для целенаправленной региоспецифической сборки олигосахаридов, гликопептидов и фосфогликанов. Показано, что хотя в настоящее время метод синтеза олигосахаридов на носителе и не может конкурировать с синтезом в растворе, тем не менее в ряде случаев он имеет преимущества перед последним. Приведены конкретные примеры успешного использования твердофазного синтеза сложных олигосахаридов и гликоконъюгатов. Особое внимание уделено выбору оптимального носителя, линкера и метода гликозилирования.

Библиография — 105 ссылок.

Оглавление

I. Введение	869
II. Методология синтеза олигосахаридных цепей на носителях	869
III. Модельные синтезы ди- и трисахаридов	872
IV. Синтез высших олигосахаридов	875
V. Синтез гликопептидов	886
VI. Синтез фосфогликанов	892
VII. Заключение	894

I. Введение

Бурное развитие молекулярной биологии неразрывно связано с успехами химии и биохимии биополимеров, в том числе и с разработкой эффективных путей их направленного химического синтеза. В последнее время появились совершенно новые подходы к синтезу биополимеров, использующие новые принципы наращивания полимерной цепи, в частности, сборку цепей на полимерных носителях.

Данный метод был впервые применен Меррифилдом¹ для синтеза пептидов. После решения целого ряда методических задач этот метод (часто не совсем точно называемый «твердофазным синтезом») удалось автоматизировать, и он стал основным, рутинным методом получения пептидов.

За последние два-три десятилетия появились многочисленные данные, свидетельствующие о существенной роли в процессах жизнедеятельности таких классов биополимеров, как полисахариды и гликоконъюгаты (гликопротеины, гликолипиды). Эти полимеры играют важную роль в таких биологических актах, как взаимодействие антиген–антитело, фермент–субстрат, лиганд–рецептор и некоторых других, связанных с углевод-белковым взаимодействием.^{2,3}

Первые попытки осуществить синтез олигосахаридной цепи на носителе были предприняты в начале 70-х годов,^{4,5} однако уже тогда стало понятно, что на быстрый прогресс в этом направлении рассчитывать нельзя, так как химический синтез олигосахаридов со строго определенной заданной

последовательностью мономерных звеньев представляет значительные трудности из-за полифункциональности моносахаридов и стереохимической неоднозначности межмономерной гликозидной связи.

В настоящее время метод синтеза олигосахаридов на носителе еще не может конкурировать с обычным синтезом в растворе, тем не менее он продолжает развиваться и методически совершенствоваться. Это связано с тем, что в некоторых случаях синтез на носителях имеет преимущества. Известен целый ряд примеров успешного использования твердофазного синтеза сложных олигосахаридов и гликоконъюгатов.

Накопленный экспериментальный материал иллюстрирует основные проблемы и достижения твердофазного синтеза углеводовсодержащих соединений и позволяет оценить целесообразность его использования в том или ином случае. В этой связи представляется необходимым подытожить полученные результаты с тем, чтобы заинтересованный читатель мог ориентироваться в возможностях метода и быть осведомленным о проблемах, которые потребуют разрешения при его использовании.

Настоящий обзор охватывает публикации, появившиеся по 1999 г. включительно.

II. Методология синтеза олигосахаридных цепей на носителях

Синтез олигосахаридов на носителях включает иммобилизацию первого звена, с которого начинается наращивание олигосахаридной цепи, на специально подобранном оптимальном носителе; наращивание олигосахаридной цепи с помощью того или иного метода создания межгликозидной связи (гликозилирование) и снятие синтезированной молекулы олигосахарида с полимерной подложки без нарушения его структуры. Специфика химии углеводов проявляется на

Н.К.Кочетков. Академик, профессор, почетный директор ИОХ РАН. Телефон: (095)135 – 6148.

Область научных интересов: химия углеводов; новые синтетические методы, выделение, синтез и химические свойства олиго- и полисахаридов; синтез биологически активных веществ и антибиотиков.

Дата поступления 28 декабря 1999 г.

всех этапах твердофазного синтеза олигосахаридов, отличающегося от пептидного и нуклеотидного синтеза.

1. Носители

Для синтеза олигосахаридов используют как нерастворимые твердые носители, так и растворимые полимеры. В первом случае реакция протекает в гетерогенной среде, а во втором — в гомогенной.

Положительной стороной использования нерастворимого твердого носителя является то, что выделение и очистка продукта реакции после каждой стадии синтеза достигается простым фильтрованием и промыванием растворителем. Кроме того, для ускорения реакции можно ввести значительный избыток одного из реагентов, который затем можно регенерировать. Негативной стороной использования нерастворимого носителя является то, что протекание реакции на поверхности твердого тела затрудняет подход находящегося в растворе реагента к реакционному центру. Это создает дополнительные трудности в регулировании регио- и стереонаправленности реакции.

Синтез олигосахаридной цепи, фиксированной на растворимом полимерном носителе, лишен в определенной мере указанного недостатка, но делает более сложной очистку продукта реакции на каждой стадии синтеза, так как в этом случае приходится высаживать полимерный продукт реакции добавлением другого растворителя и очищать его повторными пересаживаниями. Использование избытка реагента для ускорения реакции также нежелательно, поскольку его полное удаление, необходимое для сохранения правильной последовательности мономеров в синтезируемой цепи, затруднено. Однако проведение реакции гликозилирования в гомогенной среде создает лучшие возможности для регулирования ее регио- и стереоспецифичности.

В современной практике для синтеза полисахаридных цепей применяют оба типа носителей, причем синтез на растворимых полимерах (особенно это касается глико-конъюгатов) в последние годы приобретает все большее значение.

а. Нерастворимые твердые носители

На эффективность твердофазного синтеза сильное влияние оказывают такие характеристики носителя, как его пористость и степень набухания в растворителе (отношение объема набухшего в данном растворителе носителя к его первоначальному объему). Эти характеристики важны, так как определяют доступность иммобилизованной молекулы для реагента, находящегося в растворе. Важной в практическом отношении характеристикой носителя является также количество молей первого мономера (с него начинается цепь), которое может быть иммобилизовано на 1 г носителя, так называемая нагрузка носителя.

В начальный период исследований для олигосахаридного синтеза использовали главным образом смолы на основе полистирола, полученные сополимеризацией стирола с *n*-дивинилбензолом. Они выпускаются в виде порошков сферической формы («бусы») и различаются степенью сшивки, пористостью, набухаемостью и размером частиц.[†] В настоящее время в качестве носителей чаще всего применяют модифицированные полистиролы, содержащие реакционноспособные группировки: хлорметильные (полимер Меррифилда), фенольные гидроксилы,⁷ меркаптометильные,⁸ сульфонилметильные,⁹ дифенил- и диизопропилхлорсилльные,¹⁰ (3-меркаптопропил)окси(тио)метильные^{11, 12} и некоторые другие. Выбор в качестве носителя той или иной полистирольной смолы определяется стратегией конкрет-

ного синтеза, выбором метода присоединения первого мономера к носителю и структурой линкера, причем функциональная группировка, содержащаяся в полистирольной смоле, иногда сама служит линкером.

Одним из наиболее существенных недостатков полистирольных смол как носителей в твердофазном синтезе олигосахаридов является их низкая совместимость с биомолекулами. В частности, при ферментативном твердофазном синтезе с участием гликозилтрансфераз выходы олигосахаридов были настолько низкими, что применение этого метода оказалось нецелесообразным.

В этой связи были предприняты попытки использовать в качестве носителей полиакриламидные гели. Последние модифицировали, например, введением аминоэтильных групп.¹³

В последнее время в качестве нерастворимых твердых носителей все чаще используют стекла с контролируемой пористостью (СКП), поверхность которых модифицирована, например, привитыми 3-аминопропильными группировками, служащими для присоединения первого мономера (см., например, работы^{14, 15}). Известны носители на основе СКП, поверхность которых была модифицирована силанизированием с предварительным цирконированием.¹⁶ Применение СКП имеет ряд преимуществ: можно выбрать носитель с нужной пористостью и модифицировать его поверхность должным образом.

б. Растворимые носители

Носители этого типа в последнее время получили широкое применение. Простейшим растворимым носителем является полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой ~ 5000, в котором одна из концевых гидроксильных групп метилирована, а вторая свободна и служит для иммобилизации первого мономера (либо непосредственно, либо через линкер).¹⁷ Коммерчески доступный ПЭГ растворим во многих растворителях.

В последние годы получили распространение полимеры смешанного типа, содержащие одновременно как гидрофобные, так и гидрофильные фрагменты. Такие носители позволяют проводить синтез как бы в микросреде (т.е. в условиях, соответствующих условиям проведения гомогенной реакции) и в то же время легко выделять продукты реакции после каждой стадии. К числу таких носителей относятся сополимер акриламида или его *N*-замещенных производных с полиэтиленгликолем (ПЭГА), на концах которого находятся аминогруппы;¹⁸ а также сополимер полистирола с полиэтиленгликолем («Тентагель»);¹⁹ Применяются и другие, более сложные сополимеры, которые будут упомянуты ниже.

2. Линкеры

При твердофазном синтезе олигосахаридов первый мономер обычно присоединяют к носителю не непосредственно, а через бифункциональную группировку, так называемый линкер. Линкер служит не только для связывания мономера с носителем, но и для отдаления мономера и растущей цепи от носителя с целью уменьшения влияния твердой поверхности на ход реакции. Это приобретает существенное значение, поскольку известно специфическое и порою недостаточное понятное влияние, которое оказывает гетерогенность среды на стереохимию формирующейся гликозидной связи.

При подборе линкера необходимо предусмотреть возможность последующего избирательного разрыва одной из его связей при освобождении синтезированного олигосахарида от носителя с сохранением лабильных гликозидных связей.

В первых синтезах олигосахаридов иммобилизацию первого моносахарида на полистироле, содержащем хлорме-

[†] Краткий обзор носителей, используемых в твердофазном синтезе, дан в работе⁶.

тильные группы, осуществляли без использования линкера. Однако в последующих работах обычно применяли линкеры, различающиеся структурой и химическими свойствами.

Следует иметь в виду, что в углеводном твердофазном синтезе (в отличие от уже стандартизированного синтеза пептидов и олигонуклеотидов) до сих пор используются самые разнообразные линкеры. Выбор наиболее подходящего для конкретного случая линкера является важным элементом планирования синтеза. При синтезе гликопептидов линкером часто служит сама пептидная цепь, которая к тому же отделяет наращиваемую углеводную цепь от поверхности носителя. Более подробно линкеры будут рассмотрены при обсуждении синтеза конкретных соединений.

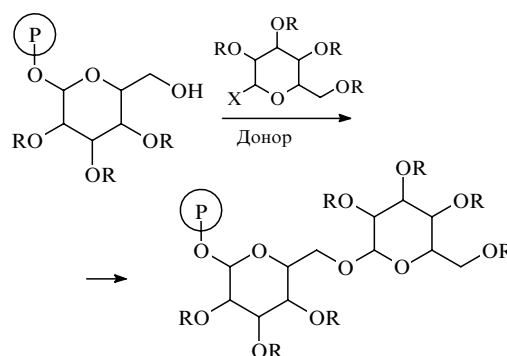
3. Наращивание олигосахаридной цепи

Этот этап является решающим в синтезе олигосахаридов, поэтому выбор метода формирования гликозидной связи (реакции гликозилирования), связывающей отдельные моносахариды, определяет весь план синтеза. Для соблюдения строго заданной моносахаридной последовательности гликозидная связь должна образовываться с полной регио- и стереоспецифичностью, а для получения однородного олигосахарид заданной структуры, не нуждающегося в дополнительной сложной очистке (что собственно и является главным преимуществом синтеза на носителе по сравнению с синтезом в растворе) необходимо, чтобы выход на всех стадиях был близок к количественному. Отсутствие единой оптимальной для всех моносахаридов методики гликозилирования делает выполнение этих требований весьма затруднительным, что является главной причиной относительно слабого прогресса в твердофазном синтезе олигосахаридов.

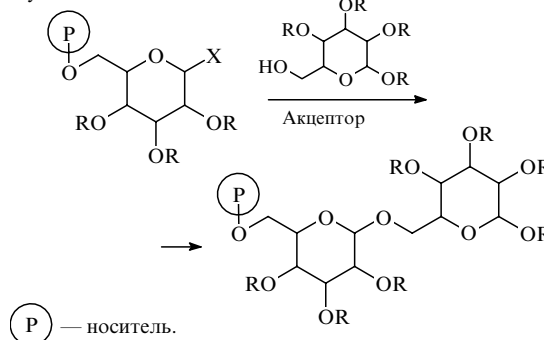
Две проблемы представляются особенно трудно разрешимыми. Первая заключается в том, что для уверенного получения любого биополимера, содержащего 40–50 мономерных звеньев в заданной последовательности (без делеций и «ошибочных» звеньев), выход на каждой стадии наращивания очередного звена должен быть не ниже 97–98%. Между тем даже лучшие из методов гликозилирования не обеспечивают такого высокого выхода, который к тому же сильно колеблется в зависимости от природы моносахаридного мономера и типа возникающей гликозидной связи. Второй проблемой является стереохимическая неоднозначность реакции образования гликозидной связи,[‡] что резко отличает синтез олигосахаридов от синтеза пептидов и олигонуклеотидов, хотя известно, например, что синтез 1,2-*транс*-гликозидной связи в большинстве случаев проходит стереоспецифично. К настоящему времени с помощью твердофазного синтеза уверенно удается получать лишь олигосахариды с относительно короткими последовательностями.

Еще одна проблема, возникающая при твердофазном синтезе олигосахаридных цепей, вытекает из полифункциональности моносахаридов. При формировании (1-2)-, (1-3)- и т.д. межмономерной гликозидной связи необходимо временно защищать гидроксильные группы, не участвующие в реакции гликозилирования. В общем случае при синтезе нерегулярных олигосахаридов, т.е. таких, в состав которых входят или различные моносахариды, или одинаковые моносахариды с различными типами связей, на каждой стадии наращивания нового моносахаридного звена требуется своя специфическая защита в зависимости от типа гликозидной связи. После стадии гликозилирования надо менять тип защиты гидроксильных групп вплоть до полного удаления старых и введения новых защитных группировок. Эта сложная операция делает олигосахаридный синтез технически громоздким (по сравнению с пептидным и олигонуклеотид-

Путь А:



Путь В:



Ⓟ — носитель.

Схема 1

ным). Правда, в ряде случаев, например при синтезе гомополисахаридов, наращивание цепи включает однотипные операции, но даже тогда переход от наращивания одного звена к наращиванию следующего осложнен, и автоматизация процесса становится проблематичной.

При планировании общей стратегии олигосахаридного синтеза с использованием той или иной комбинации защитных групп нужно прежде всего определить порядок наращивания олигосахаридной цепи. Наращивание можно проводить в двух направлениях — от восстанавливающего конца цепи к невозстанавливающему (путь А) и наоборот (путь В) (схема 1). В первом случае (путь А) моносахарид, закрепленный на носителе через гликозидный гидроксил, служит гликозил-акцептором в реакции гликозилирования, а второй моносахарид, находящийся в растворе, — гликозил-донором. Во втором случае (путь В) первый моносахарид закрепляется на носителе за одну из гидроксильных групп (не гликозидную) и является гликозил-донором, а второй моносахарид находится в растворе и выполняет функцию гликозил-акцептора. Естественно, что защитные группы и их смена на каждой стадии синтеза в обоих случаях различны. При синтезе по пути А необходимо менять или избирательно удалять защиту гидроксильных групп в конечном моносахариде гликозил-акцептора, а при синтезе по пути В необходимо вводить (или создавать) группировку, активирующую гликозидный центр в конечном моносахариде гликозил-донора. Естественно, что реагенты, находящиеся в растворе, — гликозил-акцептор (путь В) или гликозил-донор (путь А), — также должны содержать нужные защитные группы.

Реакция гликозилирования может осуществляться как химическим путем, так и под действием специфических ферментов, чаще всего гликозилтрансфераз, что изменяет всю стратегию синтеза и устраняет проблему временной защиты моносахаридного звена.

а. Химические методы гликозилирования

В первых работах по твердофазному синтезу олигосахаридов использовалось классическое гликозилирование гликозил-

[‡] Критический обзор стереоспецифичности важнейших реакций гликозилирования дан в работе ²⁰.

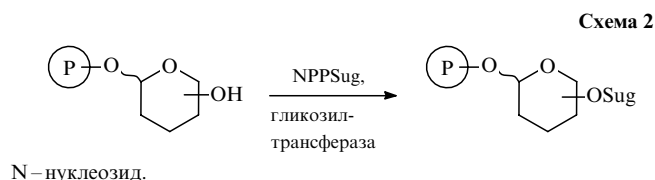
галогенидами (преимущественно пер-*O*-ацетилгликозилбромидами)⁸ в условиях реакции Кенига–Кнорра или реакции Гельфериха,⁴ а также ортоэфирный метод гликозилирования.²² Однако недостаточно высокие выходы и отсутствие полной стереоспецифичности при формировании гликозидной связи делает эти методы малоприменимыми для использования в твердофазном синтезе. Были опробованы и другие методы построения гликозидной связи с использованием таких гликозил-доноров, как тиогликозиды (в присутствии активаторов), гликозилтозилаты,²³ гликозилсульфоксиды²⁴ и некоторые другие.

Наиболее успешным оказалось гликозилирование *O*-трихлорацетимидатами сахаров.²⁵ Этот метод дает достаточно высокие выходы для широкого круга моносахаридов. К сожалению, до сих пор не решен вопрос о стереоспецифичности этой реакции и о влиянии на ее протекание конфигурации трихлорацетимидата, что не позволяет сделать окончательное заключение о возможности ее использования в твердофазном синтезе достаточно высокомолекулярных олигосахаридов.

В последнее время для синтеза относительно коротких, но сложных по строению олигосахаридов и гликоконъюгатов Данишевский с сотр.²⁶ предложил использовать так называемый гликальный метод, где донором служит 1,2-ангидросахар. Этот метод не нашел пока широкого применения в «обычном» олигосахаридном синтезе, но на его основе разработана удобная схема твердофазного синтеза (см. ниже).

б. Ферментативное гликозилирование

Наращивание олигосахаридной цепочки, фиксированной на носителе, может осуществляться и биохимическим путем,[†] т.е. под действием ферментов, которые переносят на конец растущей цепи моносахарид из соответствующего нуклеозиддифосфатсахара (NPPSug) (схема 2).



Важнейшими преимуществами ферментативного метода являются хорошие выходы и, главное, высокая регио- и стереоспецифичность образования гликозидной связи. Кроме того, в этом случае можно не защищать гидроксильные группы моносахаридов, что коренным образом упрощает синтез. Однако высокая специфичность ферментативного гликозилирования имеет и отрицательный эффект в том случае, когда речь идет о введении разных моносахаридов или о создании различных типов гликозидной связи. Это связано с тем, что из-за обычно узкой специфичности гликозилтрансфераз на каждой ступени наращивания цепи необходимо использовать свой особый фермент. Необходимо учитывать также тот факт, что на специфичность фермента может влиять не только природа моносахарида-донора и моносахарида-акцептора, но и природа моносахаридов, занимающих соседние места в уже синтезированном фрагменте цепи.

Другой особенностью ферментативного гликозилирования, с которой необходимо считаться при проведении твердофазного синтеза, является заметное влияние на результат реакции природы носителя и структуры линкера. Это,

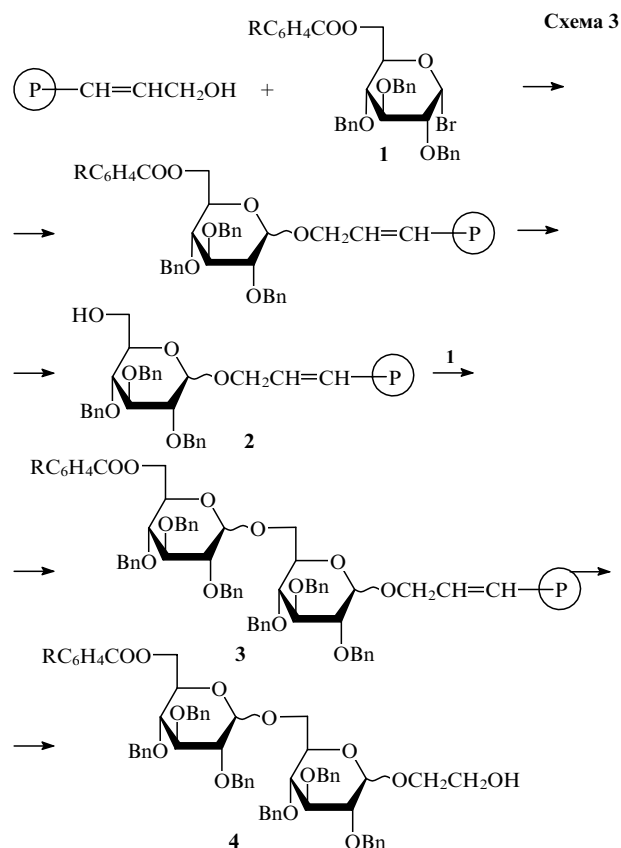
очевидно, связано с тем, что подход фермента, который сам является макромолекулой, к реакционному центру иммобилизованной на полимере олигосахаридной цепи и создание фермент-субстратного комплекса в этом случае затруднены по сравнению с ферментативной реакцией в растворе, поэтому и требования к носителю и линкеру, которые должны обеспечивать контакт между реагирующими молекулами, более жесткие. Именно по этой причине при ферментативном наращивании цепи на носителе используют растворимые, конформационно подвижные носители и сложные по структуре линкеры. (Выше уже говорилось о невозможности применения гликозилтрансфераз для ферментативного твердофазного синтеза олигосахаридов на полистирольных смолах из-за несовместимости этих разных по природе макромолекул.)

Хотя первые опыты по использованию ферментов в твердофазном олигосахаридном синтезе относятся к 80-м годам, широкое применение этот метод получил только в настоящее время.

III. Модельные синтезы ди- и трисахаридов

Первые работы по твердофазному синтезу олигосахаридов имели целью выяснить принципиальную возможность использования этого метода для получения таких соединений. В начале были синтезированы простейшие ди- и трисахариды.

Так, Фреше и Шерх⁴ осуществили синтез D-глюкопиранозил-(1-6)-D-глюкозы и соответствующего трисахарида с 1-6-связями, наращивая олигосахаридную цепь, иммобилизованную на нерастворимом носителе, с восстанавливающего конца (схема 3). Сначала действием 2,3,4-три-*O*-бензил-6-*O*-(*n*-нитробензоил)-D-глюкопиранозилбромида (1, R = NO₂) или его *n*-метоксibenзоильного аналога (1, R = MeO) на полистирольную смолу, модифицированную введением остатков аллилового спирта,²⁸ иммобилизовали



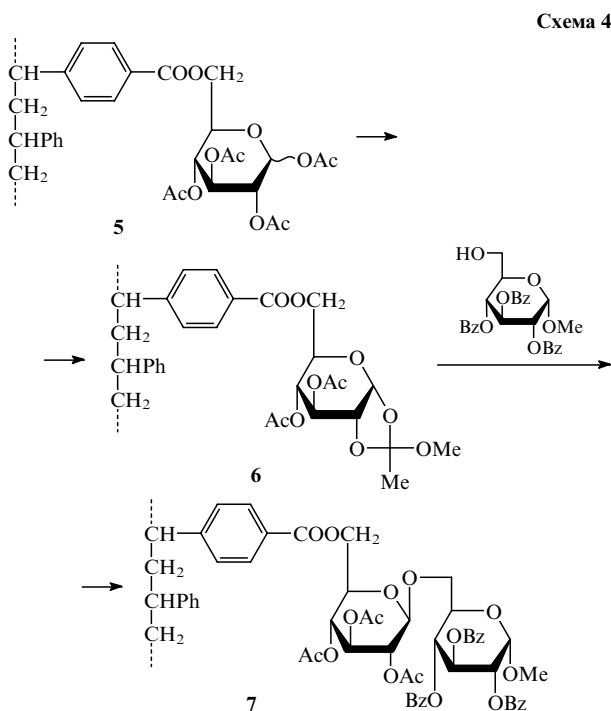
R = NO₂, MeO.

§ Обзор методов гликозилирования дан в работе²¹.

† Биосинтез олигосахаридов описан в обзоре²⁷.

замещенную глюкозу, после чего сняли ацильную защиту с гидроксильной группы в положении 6. Остатки глюкозы в полимере **2** гликозилировали действием тех же бромидов. Затем остатки иммобилизованного дисахарида в полимере **3** вновь подвергли дезацилированию и гликозилированию с целью получения трисахарида. Полимер **3**, содержащий остатки дисахарида (или его аналог с остатками трисахарида), подвергли озонолу для снятия с него продукта реакции — соответствующего ди- или трисахарида. После восстановления выделили продукты в виде соответствующих 2-гидроксиэтилгликозидов. Дисахарид **4** представлял собой смесь производных изомерных α - и β -D-глюкопиранозил-(1-6)-D-глюкоз (изомальтозы и генциобиозы), т.е. синтез на носителе не был стереоспецифичным и не отличался в этом отношении от аналогичной реакции в растворе.

Другая схема синтеза β -D-глюкопиранозил-(1-6)-D-глюкозы (генциобиозы) была независимо предложена Гатри.⁵ В этой работе для наращивания цепи был использован ортоэфирный метод гликозилирования[†] (схема 4). Сополимеризацией стирола с 1,2,3,4-тетра-*O*-ацетил-6-*O*-(*n*-винилбензоил)-D-глюкопиранозой или с ее 6-*O*-(*n*-винилфенил)сульфонильным аналогом был получен линейный полимер **5**, содержащий остатки глюкозы, присоединенные через 6-гидроксильную группу. Остатки глюкозы, иммобилизованные на полимере, превращали в остатки соответствующего 1,2-ортоэфира. Полученный таким образом полимер **6** служил гликозил-донором. При его взаимодействии с метил-2,3,4-три-*O*-бензоил- α -D-глюкопиранозидом в стандартных условиях ортоэфирного метода гликозилирования было получено производное генциобиозы **7** с выходом 64%, которое снимали с полимерной основы действием метилата натрия. Поскольку ортоэфирный метод гликозилирования для первичных спиртов стереоспецифичен, то в этом случае синтез на носителе также протекал стереоспецифично и давал только генциобиозу.

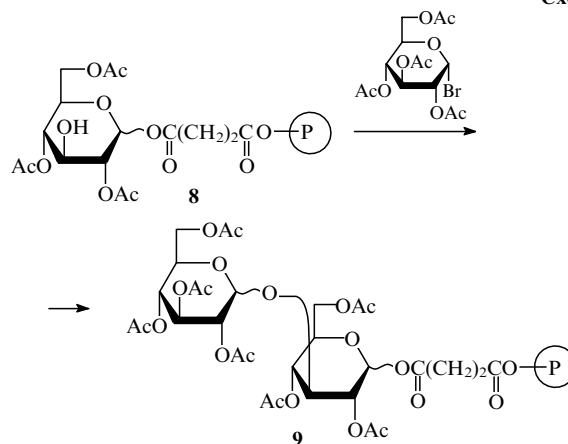


Эти две работы продемонстрировали возможность образования гликозидной связи в условиях гетерогенной реакции, но в то же время показали, что твердофазный синтез олигосахаридов не имеет преимуществ перед обычной реакцией в растворе. Дальнейшие исследования в этой области были

посвящены главным образом методическим вопросам: подбору носителя; созданию линкера, удобного для иммобилизации субстрата; обработке полимера между последовательными стадиями и т.д. Одновременно изучали возможность применения твердофазного метода к синтезу других простейших олигосахаридов.

Так, для проверки возможности гликозилирования менее реакционноспособной вторичной гидроксильной группы был предпринят твердофазный синтез D-глюкопиранозил-(1-3)-D-глюкозы²⁹ (схема 5). Для этого остаток 2,4,6-три-*O*-ацетил-D-глюкопиранозы иммобилизовали на полистирольной смоле через линкер — остаток янтарной кислоты. Иммобилизованный таким образом гликозил-акцептор **8** гликозилировали 2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- α -D-глюкопиранозилбромидом в условиях реакции Гельфериха в течение 48 ч при 30°C. Полимер **9** отделяли, промывали и проводили гликозилирование еще 2 раза. В полученном полимере **9** ацилгликозидную связь разрывали действием ацетата гидразиния. Выход дисахарида (смесь α -изомера (нигерозы) и β -изомера (ламинарибиозы) в соотношении ~3:2) составил 81%.

Схема 5



Гликозилирование с использованием 3,4,6-три-*O*-ацетил-2-*O*-бензил- α -D-глюкопиранозилбромида протекало стереоспецифично, выход α -связанного дисахарида составил 55%. Таким образом, была показана возможность реализации в условиях твердофазного синтеза гликозилирования иммобилизованного моносахарида по менее реакционноспособной вторичной гидроксильной группе.

Позже линкер на основе янтарной кислоты нашел применение при химическом и ферментативном синтезе олигосахаридов на растворимых носителях. Так, Крепинский,³⁰ впервые использовал этот линкер для иммобилизации первого моносахарида на монометилевого эфира ПЭГ. Гликозилирование иммобилизованных таким образом производных моносахаридов (метилгалактопиранозид, метил-2-дезоксигалактопиранозид, метил-2-дезоксигалактопиранозид или 1,6-ангидро- β -D-глюкопиранозид) проводили гликозилбромидом или избытком *O*-гликозилтрихлорацетимидата в присутствии соответствующих промоторов. Полученные дисахариды[‡] по окончании синтеза легко отщеплялись от носителя. В то же время отмечались некоторые затруднения при отделении иммобилизованного продукта от избытка гликозилирующего реагента, находящегося в растворе, что, как отмечалось выше, является одним из недостатков использования растворимого полимера в качестве носителя.

Аналогичный подход был использован при синтезе β -D-глюкопиранозил-(1-6)-D-галактозы. В данном случае глико-

[†] Ортоэфирному методу гликозилирования посвящен обзор²².

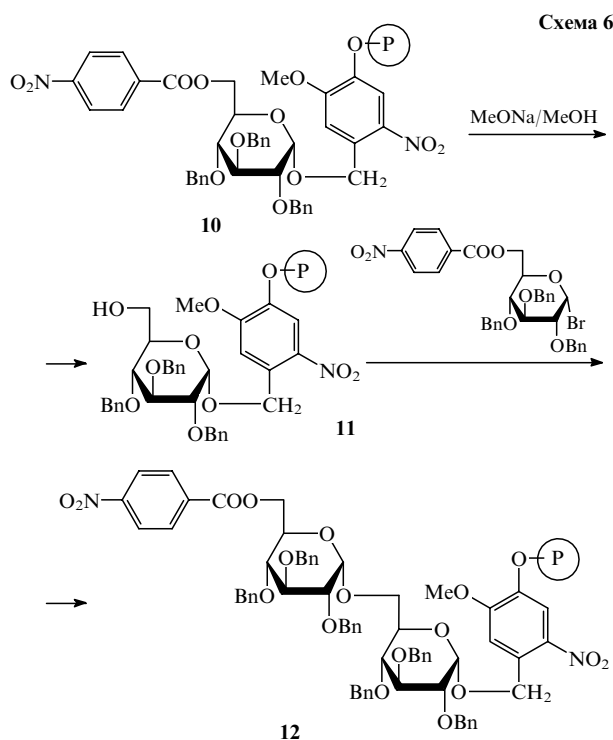
[‡] α «метатезис» олигосахаридов, наблюдавшемся при использовании данного метода гликозилирования, см. в работе³¹.

зил-акцептор — остаток избирательно защищенного метил- α -D-галактопиранозидов со свободным первичным гидроксильным — иммобилизовали через остаток янтарной кислоты, связанный с OH-группой моносахарида в положении 2 или 3, на растворимом носителе «Тентагель». Гликозилирование иммобилизованного моносахарида *O*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- α -D-глюкопиранозил)трихлорацетимидатом протекало стереоспецифично, выход дисахарида после отщепления от носителя под действием водного аммиака составлял 50–70% (в зависимости от промотора гликозилирования).¹⁹

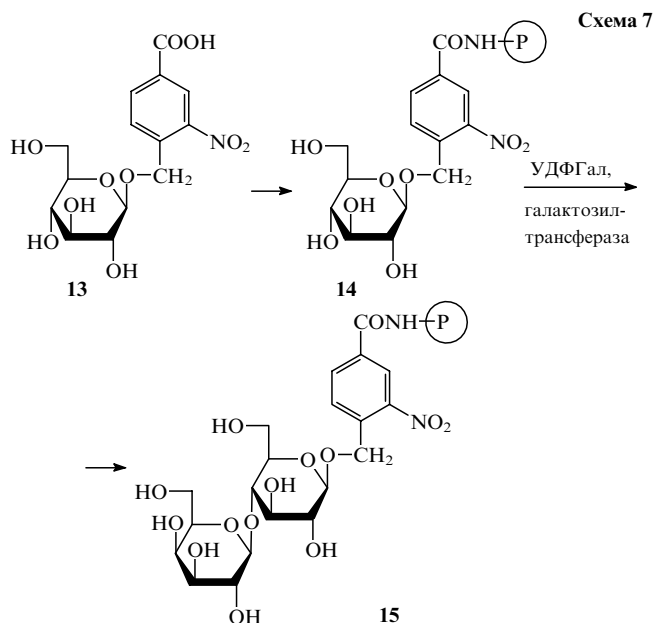
С целью упрощения процедуры снятия олигосахаридов с носителя было предложено присоединять первый моносахарид тиогликозидной связью,⁸ которую создавали либо реакцией 1-тиосахаров с хлорметилированным полистиролом, либо реакцией ацилгликозилгалогенидов с полистиролом, содержащим HSCH₂-группы. В качестве модельного синтеза был осуществлен синтез генциобиозы. Полученный дисахарид снимали с носителя в виде бензилгликозида кипячением в бензоле, содержащем иодистый метил и бензиловый спирт.

Зехави^{32–34} предложил использовать в качестве линкеров фоточувствительные производные 4-гидроксиметил-3-нитробензойной и 4-гидроксиметил-6-метокси-3-нитробензойной кислот. Гидроксильную группу таких линкеров гликозилируют моносахаридами, а карбоксильную группу используют для связывания с полимером-носителем. Благодаря наличию фрагмента *o*-нитробензилового спирта эти линкеры легко распадаются при фотолизе в нейтральной среде, освобождая связанные с ними олигосахариды.

Линкеры этого типа были впервые использованы при синтезе α -D-глюкопиранозил-(1-6)-D-глюкозы (изомальтозы) (схема 6).³² Остаток 2,3,4-три-*O*-бензил-6-*O*-(*n*-нитробензоил)-D-глюкопиранозиды иммобилизовали в виде *O*-гликозида (**10**) через указанный линкер на полистирольной смоле. Затем действием MeONa освобождали 6-OH-группу и гликозилировали полимер **11**, содержащий остатки частично замещенной глюкозы, 2,3,4-три-*O*-бензил-6-*O*-(*n*-нитробензоил)- α -D-глюкопиранозилбромидом. Для снятия конечного продукта — производного изомальтозы — полимер **12** облучали в диоксане в течение 32 ч (выход 80%).



В дальнейшем фоточувствительный линкер на основе 4-гидроксиметил-3-нитробензойной кислоты был использован для ферментативного синтеза олигосахаридов на других носителях. Действием эфира 4-гидроксиметил-3-нитробензойной кислоты на 2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- α -D-глюкопиранозилбромид с последующим *O*-деацетилированием и омылением получили гликозид **13** (схема 7), который закрепили на модифицированном 2-аминоэтильными группами полиакриламиде¹³ или на модифицированном поливинило-вом спирте, содержащем аминогруппы.³³ Полученные таким путем полимеры **14**, содержащие связанные гликозидными связями остатки глюкозы, служили акцепторами при ферментативном синтезе. Их инкубировали с галактозил-трансферазой в присутствии уридиндифосфатгалактозы (УДФГал) — донора галактозильных остатков. Образующуюся в результате этой ферментативной реакции β -D-галактопиранозил-(1-4)-D-глюкозу (лактозу) снимали с носителя облучением полимера **15** в водном растворе в течение 20 ч. Этот синтез впервые продемонстрировал успешное использование фермента — гликозилтрансферазы — для регио- и стереоспецифического синтеза дисахарида путем гликозилирования иммобилизованного остатка моносахарида, лишенного защитных групп.



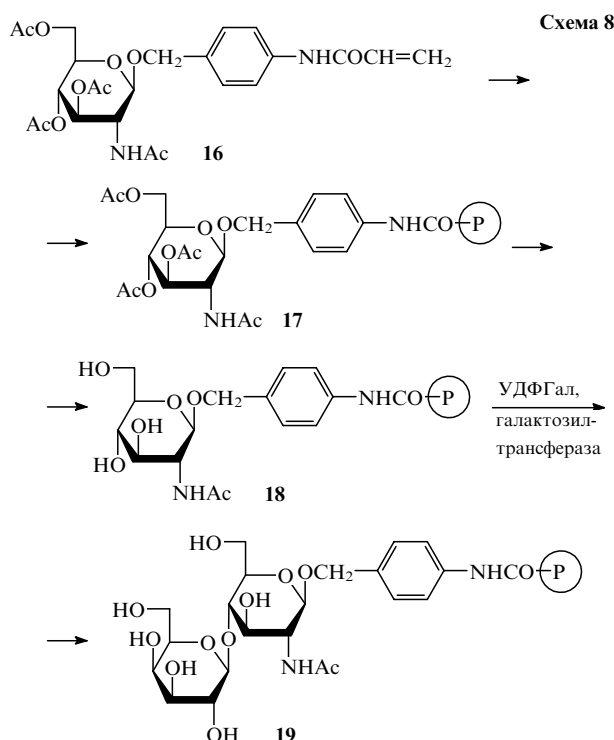
Аналогично, гликозилированием 4-гидроксиметил-3-нитробензойной кислоты, иммобилизованной на полиакриламиде, 1,2-ортоэфиром целлобиозы с последующим деацетилированием был получен полимер, содержащий остаток целлобиозы с незащищенными гидроксильными группами. Последний выполнял роль акцептора в ферментативной реакции с галактозилтрансферазой и УДФГал, приводящей к трисахариду β -Galp(1-4)- β -Glc(1-4)Glc. Иммобилизованную на полиакриламиде целлобиозу использовали также для получения олигосахаридов, содержащих остатки *N*-ацетил- β -D-глюкозамина, посредством их переноса с хитина в присутствии лизоцима.¹³

С целью решения вопросов о специфичности гликоген-синтазы — фермента, переносящего остатки глюкозы с уридинфосфатглюкозы (УДФГ) на глюкоолигосахариды, — и о роли праймера («затравки») в биосинтезе гликогена были изучены иммобилизованные на (2-аминоэтил)полиакриламиде с тем же фоточувствительным линкером остатки мальтозы, α -Glc(1-4)Glc, мальтотриозы, α -Glc(1-4)- α -Glc(1-4)Glc, и панозы, α -Glc(1-6)- α -Glc(1-4)Glc.³⁴ Производные этих олигосахаридов присоединяли к производным 4-гидроксиметил-3-нитробензойной кислоты,

полученные гликозиды дезацетилировали и иммобилизовали на полимере через карбоксильную группу линкера под действием водорастворимого карбодиимида. Изучение реакций этих иммобилизованных акцепторов с УДФГ в присутствии гликогенсинтазы позволило выяснить существенные детали биосинтеза гликогена — роль праймера, появление разветвлений и т.п.

При ферментативном синтезе *N*-ацетиллактозамина (2-ацетида-4-*O*-(β-D-галактопиранозил)-2-дезоксид-*D*-глюкозы)³⁵ остаток *N*-ацетилглюкозамина через гликозидный центр и фоточувствительный линкер — 4-гидроксиметил-3-нитробензойную кислоту — иммобилизовали на водорастворимом сополимере акриламида с *N*-акрилоилоксисукцинимидом, модифицированном введением 2-аминоэтильных группировок. После *O*-деацетилирования остатка глюкозамина полимер инкубировали с УДФГ в присутствии ферментной системы УДФГ–эпимераза–галактозилтрансфераза, которая обеспечивала эпимеризацию остатка глюкозы и перенос образовавшегося галактозного остатка на акцептор. Полученный таким путем *N*-ацетиллактозамин снимали с носителя фотолизом.

Сополимеризацией акриламида с его производным **16** (схема 8) был получен полиакриламид **17**, содержащий остатки глюкозамина, присоединенные *O*-гликозидной связью к линкеру бензильного типа. После *O*-деацетилирования полимер **18** инкубировали с УДФГал и галактозилтрансферазой. Полученный в результате этой реакции *N*-ацетиллактозамин **19** снимали с носителя гидрогенолизом в присутствии Pd/C.³⁶



Приведенные выше примеры свидетельствуют о перспективности использования ферментов в синтезе олигосахаридов на носителях. Эффективность ферментативного наращивания олигосахаридной цепи зависит от того, на какое расстояние моносахарид-акцептор растущей цепи удален от поверхности носителя. Это расстояние, а следовательно, и оптимальный размер линкера, определяются молекулярной массой фермента. Так, при переносе остатка галактозы под действием галактозилтрансферазы достаточно, чтобы первый моносахарид-акцептор был присоединен к полимеру цепочкой, содержащей два метиленовых

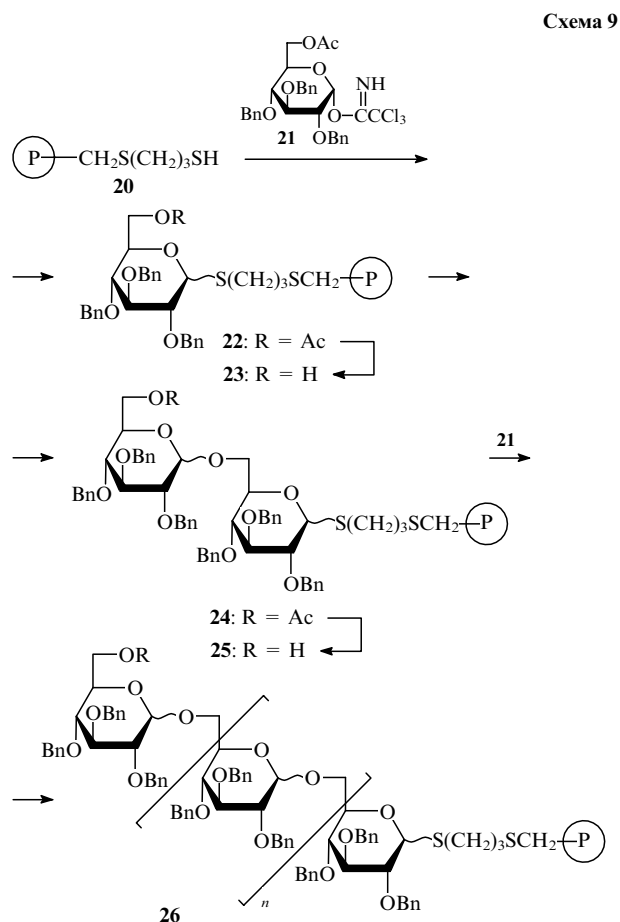
звена, тогда как для успешного переноса остатка глюкозы под действием более высокомолекулярной гликогенсинтазы требуется уже цепочка из шести метиленовых звеньев.

Описанные выше синтезы ди- и трисахаридов на носителях не имеют особых преимуществ перед синтезом этих соединений в растворе, однако они позволили решить неотложные методические вопросы и перейти к целенаправленному синтезу фрагментов гомо- и гетерополисахаридов и гликопептидов, а также способствовали развитию комбинационной химии в углеводном ряду.

IV. Синтез высших олигосахаридов

К настоящему времени выполнено несколько твердофазных синтезов гомоолигосахаридов регулярного строения, содержащих до 10 моносахаридных звеньев. И хотя некоторые соединения этого типа можно получить полимеризацией производных моносахаридов,^{37,38} их синтез на носителях позволил разработать стандартную методику ступенчатого наращивания олигосахаридной цепи, подходящую для определенного метода гликозилирования.

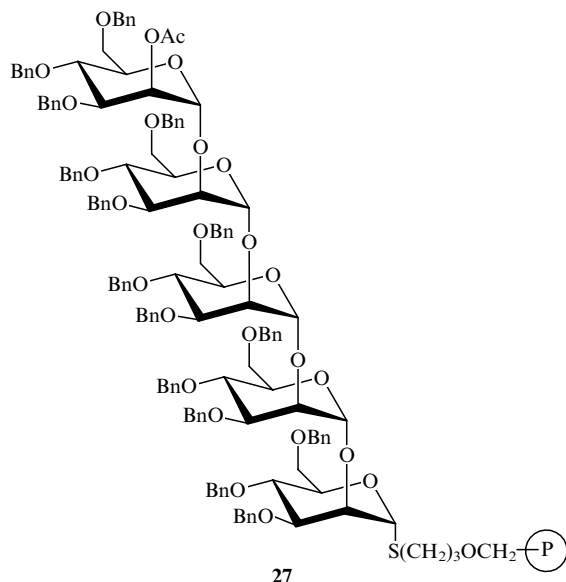
Для получения глюко- и манноолигосахаридов был использован наиболее часто применявшийся трихлорацетимидатный метод Шмидта. На схеме 9 представлен синтез (1-6)-*D*-глюкоолигосахаридов.³⁹ Модифицированный 3-меркаптопропилтиометильными группировками носитель **20** был получен взаимодействием полимера Меррифила с пропан-1,3-дитиолом. Остаток замещенной глюкозы присоединяли тиогликозидной связью к свободной тиольной группе этого носителя действием *O*-(6-*O*-ацетил-2,3,4-три-*O*-бензил-*D*-глюкопиранозил)трихлорацетимидата (**21**). В полученном полимере **22** удаляли 6-*O*-ацетильную группу и образующийся полимер **23** обрабатывали 3-кратным избытком имидата **21** в присутствии триметилсилитрифлата.



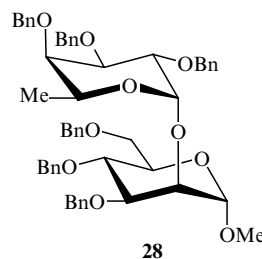
В полимере **24** вновь удаляли *O*-ацетильную группу, проводили гликозилирование полимера **25** действием гликозил-донора **21** и весь цикл повторяли нужное число раз. По окончании синтеза олигосахарид отщепляли от полимера **26** действием тиофильного реагента (например, трифлата диметил(метилтио)сульфония) в присутствии основания. Этот метод был применен для синтеза ди-, три-, тетра- и пентасахаридов. Выход продуктов на каждой стадии наращивания цепи определяли по увеличению массы полимера; кроме того, был специально разработан масс-спектрометрический метод контроля. С этой целью пробу полимера обрабатывали тетрафторборатом диметил(метилтио)сульфония в смеси дихлорметан–метанол в присутствии основания Хюнига и освободившиеся олигосахариды анализировали масс-спектрометрией. Анализ масс-спектров позволял судить о полноте протекания гликозилирования на каждой стадии. Согласно данным масс-спектрометрии (MALDI-TOF) выход составлял 95%.

Каждая стадия гликозилирования приводила к смеси α - и β -аномеров в соотношении 1 : 1, так что пентамер представлял собой смесь 32 диастереомеров. Предложенная методология пригодна, таким образом, для комбинаторного синтеза.

По аналогичной схеме был осуществлен синтез α -1,2-связанных олигоманнозидов.¹¹ В полученную подобным методом полистирольную смолу $(\text{P})\text{-CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ вводили остатки 2-*O*-ацетил-3,4,6-три-*O*-бензил-D-маннопиранозы. После дезацетилирования, гликозилирования продукта дезацетилирования *O*-(2-*O*-ацетил-3,4,6-три-*O*-бензил-D-маннопиранозил)трихлорацетимидатом и повторения указанного цикла реакций иммобилизованные олигоманнозиды **27** (до гексасахаридов включительно) снимали с носителя обработкой *N*-бромсукцинимидом в смеси THF–MeOH в присутствии 2,6-ди-*трет*-бутилпиридина. Процесс наращивания цепи контролировали масс-спектрометрически. Выходы ди-, три- и тетраманнозидов составляли 75, 54 и 34% соответственно.

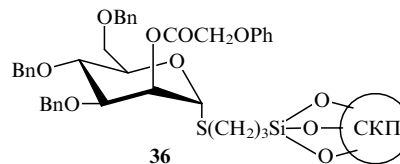


Если гликозилирование первого остатка маннозы проводить не *O*-маннозилтрихлорацетимидатом, а аналогичным производным L-фукозы, то можно получить соответствующий дисахарид **28**, содержащий α -L-фукозидную (1,2-*цис*-гликозидную) связь.



Этот же подход был использован и для синтеза фрагмента известного гликопротеина — разветвленного пентасахарид (схема 10).¹² На том же полимере $(\text{P})\text{-CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ действием *O*-(2,4-ди-*O*-бензил-3,6-ди-*O*-бензоил- α -D-маннопиранозил)трихлорацетимидата иммобилизовали остатки маннозы. В полученном полимере обе бензоильные группы удаляли и образовавшийся диол **29** гликозилировали избытком *O*-(2-*O*-ацетил-3,4,6-три-*O*-бензил- α -D-маннопиранозил)трихлорацетимидата (**30**). Ацильные группы в полимере **31** вновь удаляли и иммобилизованный трисахарид **32** гликозилировали *O*-(3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксиглюкопиранозил)трихлорацетимидатом (**33**), что привело к полимеру с иммобилизованным пентасахаридом **34**. Тиогликозидную связь расщепляли действием *N*-бромсукцинимидом в присутствии метанола и 2,6-ди-*трет*-бутилпиридина и получили пентасахарид **35** с выходом 20% (таким образом, гликозилирование протекало с выходом 85% на каждой стадии). Выход продуктов контролировали масс-спектрометрически, а стереохимию образующихся гликозидных связей устанавливали с помощью спектроскопии ЯМР.

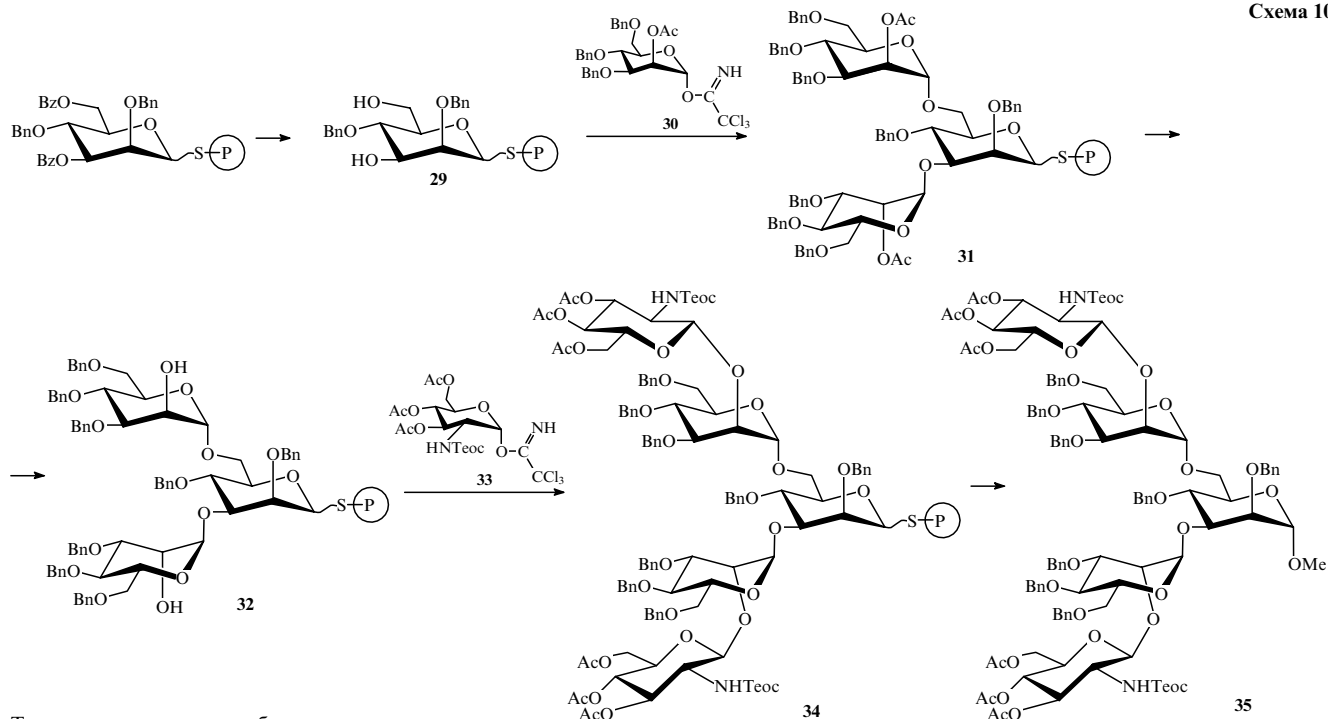
Аналогичные синтезы α -(1-2)-связанных манноолигосахаридов выполнены и на других носителях, например на пористом стекле, к поверхности которого были привиты меркаптопропильные группы.⁴⁰ К модифицированному обработке 3-меркаптопропилтриметоксисилом носителем присоединяли остатки 3,4,6-три-*O*-бензил-2-*O*-феноксиацетил-D-маннозы. Феноксиацетильную группу в иммобилизованном таким путем сахарида **36** удаляли действием гуанидина и по свободному гидроксилу вводили следующее маннозное звено, после чего весь процесс повторяли. Синтезированный олигоманнозид снимали с носителя реакцией с метанолом в присутствии *N*-бромсукцинимидом и 2,6-ди-*трет*-бутилпиридина. Масс-спектрометрический контроль показал, что полученный трисахарид содержал лишь следы моно- и дисахаридов, что указывало на то, что гликозилирование протекало с высоким выходом на каждой стадии.



Синтез олигоманнозидов этого типа был осуществлен и на растворимом носителе — монометилвом эфире полиэтиленгликоля.¹⁷ В качестве линкера использовали 1,4-бис(гидроксиметил)бензол,⁸ к которому присоединяли остаток 2-*O*-ацетил-3,4,6-три-*O*-бензил-D-маннопиранозы.

§ Нужно отметить, что линеры этого типа применяли и в ряде других синтезов на растворимых носителях, например при синтезе модельных дисахаридов.

Схема 10



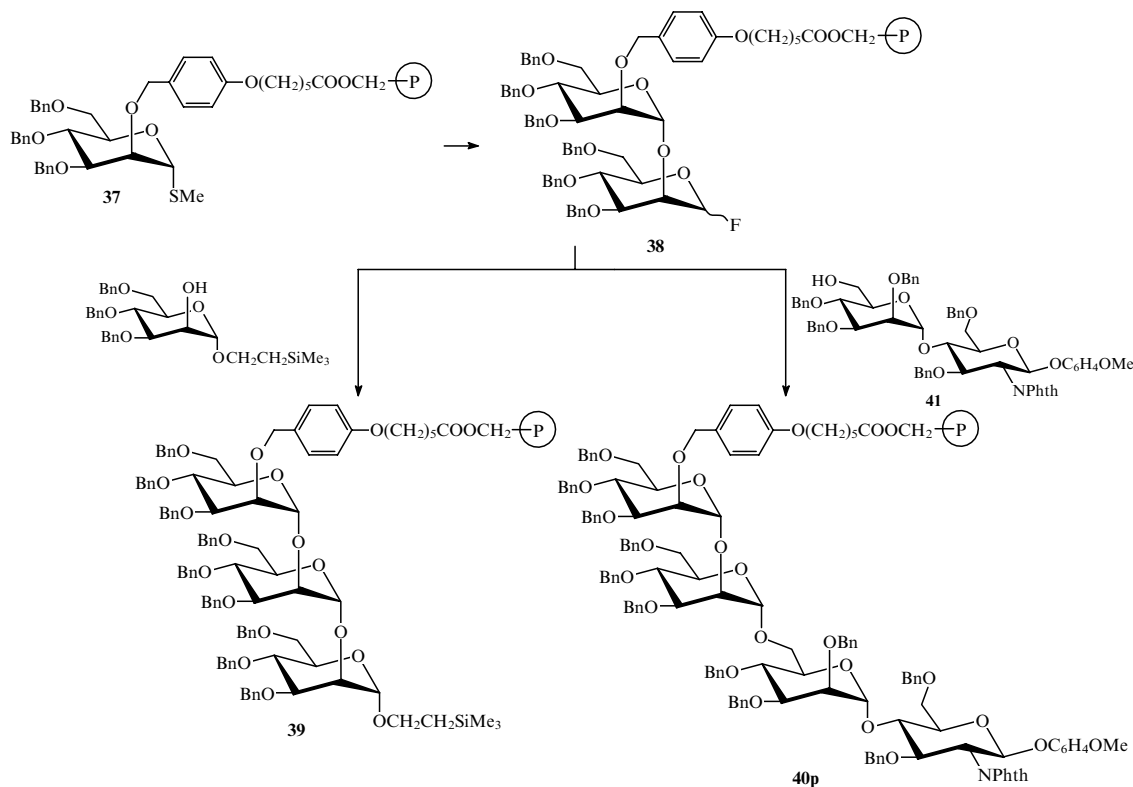
Teos — трихлорэтоксикарбонил.

Наращивание олигосахаридной цепи проводили по описанной выше схеме. Для отщепления продукта реакции от носителя было предложено использовать систему трифлат скандия(III) — уксусный ангидрид.⁴¹

Все приведенные выше синтезы олигоманнозидов проводили путем наращивания цепи от восстанавливающего конца к невосстанавливающему. Вместе с тем известен метод получения тех же олигоманнозидов с использованием противоположной стратегии — наращивания цепи от невосстанавливающего конца к восстанавливающему. Синтез на растворимом носителе ПЭГ проводили по следующей

схеме.⁴² К метил-3,4,6-три-*O*-бензил-1-тио- α -D-маннопиранозиду в положение 2 присоединяли линкер — 6-(4-гидроксиметилфенокси)гексановую кислоту, которая этерифицировала ПЭГ (схема 11). Остаток замещенного метилтиоманнопиранозидов в полимере **37** выступал как гликозил-донор. Он реагировал в присутствии метилтрифлата с 3,4,6-три-*O*-бензил-D-маннопиранозилфторидом, образуя производное дисахарида **38**, которое также выступало в роли гликозил-донора. Гликозилированием 3,4,6-три-*O*-бензил-2-(триметилсилил)этил- α -D-маннопиранозидов по методу Сузуки⁴³ был получен иммобилизованный трисахарид **39**, который

Схема 11

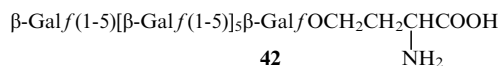


снимали с носителя в присутствии основания и освобождали от защитных групп гидрогенолизом. Конечный продукт (выход 40%), благодаря наличию гидрофобной триметилсилилэтильной группировки, легко отделялся от побочных продуктов реакции.

Введение гидрофобных групп для упрощения процедуры выделения конечного продукта реакции было использовано авторами работы⁴² и при синтезе более сложного гетероолигосахарида **40** — фрагмента гликофосфатидинозита. Последний был получен взаимодействием дисахарида **41** с гликозил-донором **38**. Отщепленный гидрогенолизом от полимера **40p** тетрасахарид **40**, благодаря присутствию гидрофобных фталимидной и метоксифенильной групп, легко очищался хроматографией на обращенной фазе. Этот прием является интересной в методологическом отношении модификацией углеводного синтеза на носителях.

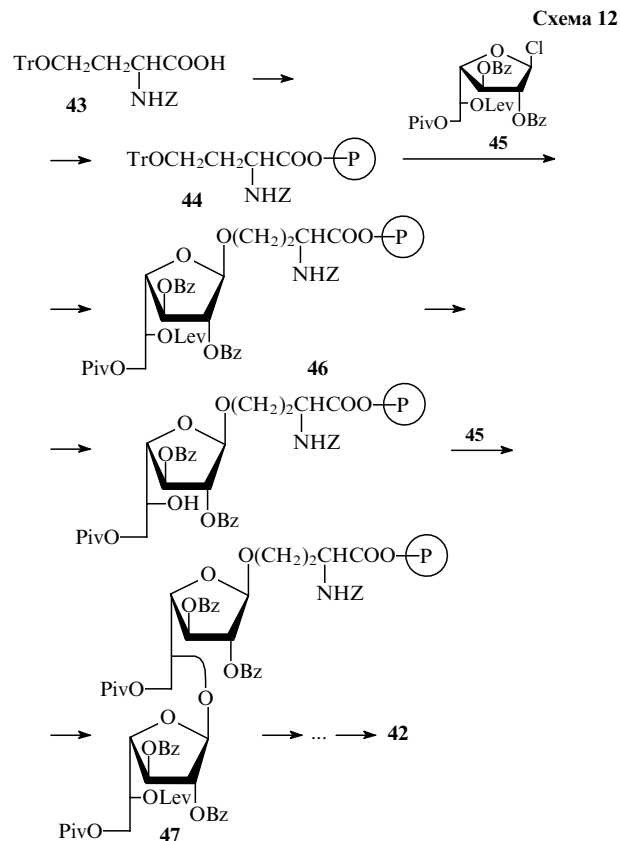
Рассмотренные выше синтезы олигоманнозидов не позволяют высказать окончательные рекомендации в пользу того или другого варианта, тем не менее они свидетельствуют о гибкости твердофазного метода синтеза и его широких возможностях.

Заслуживает внимания твердофазный синтез природного иммунологически активного гептасахарида **42**,



содержащего β -(1-5)-связанные галактофуранозные звенья и остаток L-гомосерина на восстанавливающем конце (схема 12).⁴⁴ L-Гомосерин **43** с защищенными OH- и NH₂-группами иммобилизовали на смоле Меррифилда. Полимер **44** подвергли детритилированию и образовавшееся гидроксилсодержащее производное гликозилировали действием 2,3-ди-*O*-бензоил-5-*O*-левулиноил-6-*O*-пивалоил- β -D-галактофуранозилхлорида (**45**) в условиях реакции Гельфериха. Полученный полимер **46**, содержащий иммобилизованные остатки галактофуранозы (нагрузка 0.5 ммоль · г⁻¹), послужил исходным для синтеза гептасахарида **42**. Избирательное удаление остатка левулиновой кислоты в полимере **46** и гликозилирование освободившейся гидроксильной группы действием хлорида **45** в тех же условиях позволило нарастить следующее галактофуранозидное звено и получить полимер **47**. Повторение этой последовательности операций привело к производному гептасахарида **42**, которое снимали с полимера действием основания (одновременно снимались все *O*-бензоильные группы). Бензилоксикарбонильную группу удаляли гидрогенолизом. Общий выход гептасахарида **42** составил 23%.

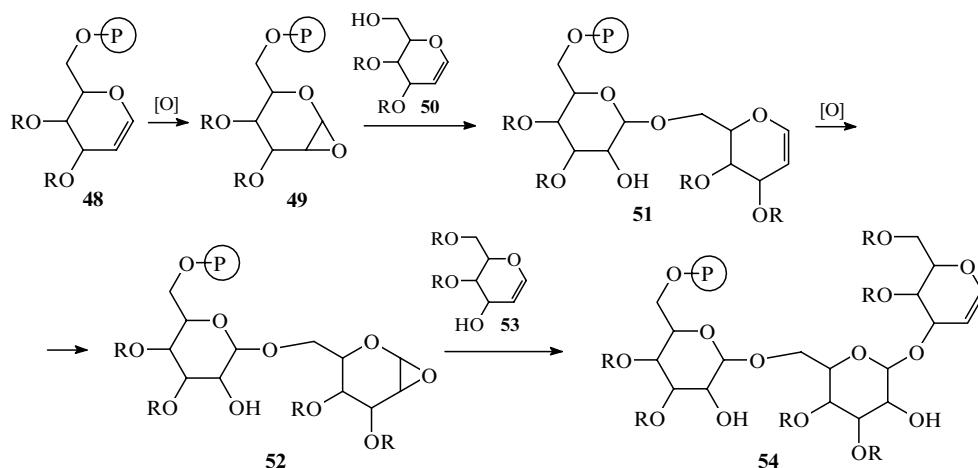
Полученный олигосахарид содержал только β -гликозидные связи и не содержал заметной примеси более коротких олигомеров, что указывало на высокие выходы гликозили-



Tr = Ph₃C; Z = PhCH₂OCO; Piv = Me₃CCO; Lev = MeCO(CH₂)₂CO.

рования на каждой стадии и на устойчивость защитных групп. Выбор защитных групп в данном синтезе имел важное значение. Так, например, при замене левулиноильной группы на также избирательно удаляемую хлорацетильную группу образуется значительное количество примесей. Синтетический олигосахарид **42**, благодаря присутствию в нем остатка гомосерина, может быть легко превращен в соответствующий гликоконъюгат. Это был первый пример синтеза олигосахаридной цепи, связанной с аминокислотным остатком. Он открыл путь к твердофазному синтезу гликопептидов.

Дальнейшая разработка твердофазного олигосахаридного синтеза шла по пути поиска новых методов создания гликозидной связи. Наиболее интересные возможности для синтеза сложных, в том числе разветвленных олигосахаридов, открывает гликальный метод (схема 13).¹⁰ Гликаль **48**, иммобилизованный на носителе через одну из гидроксиль-



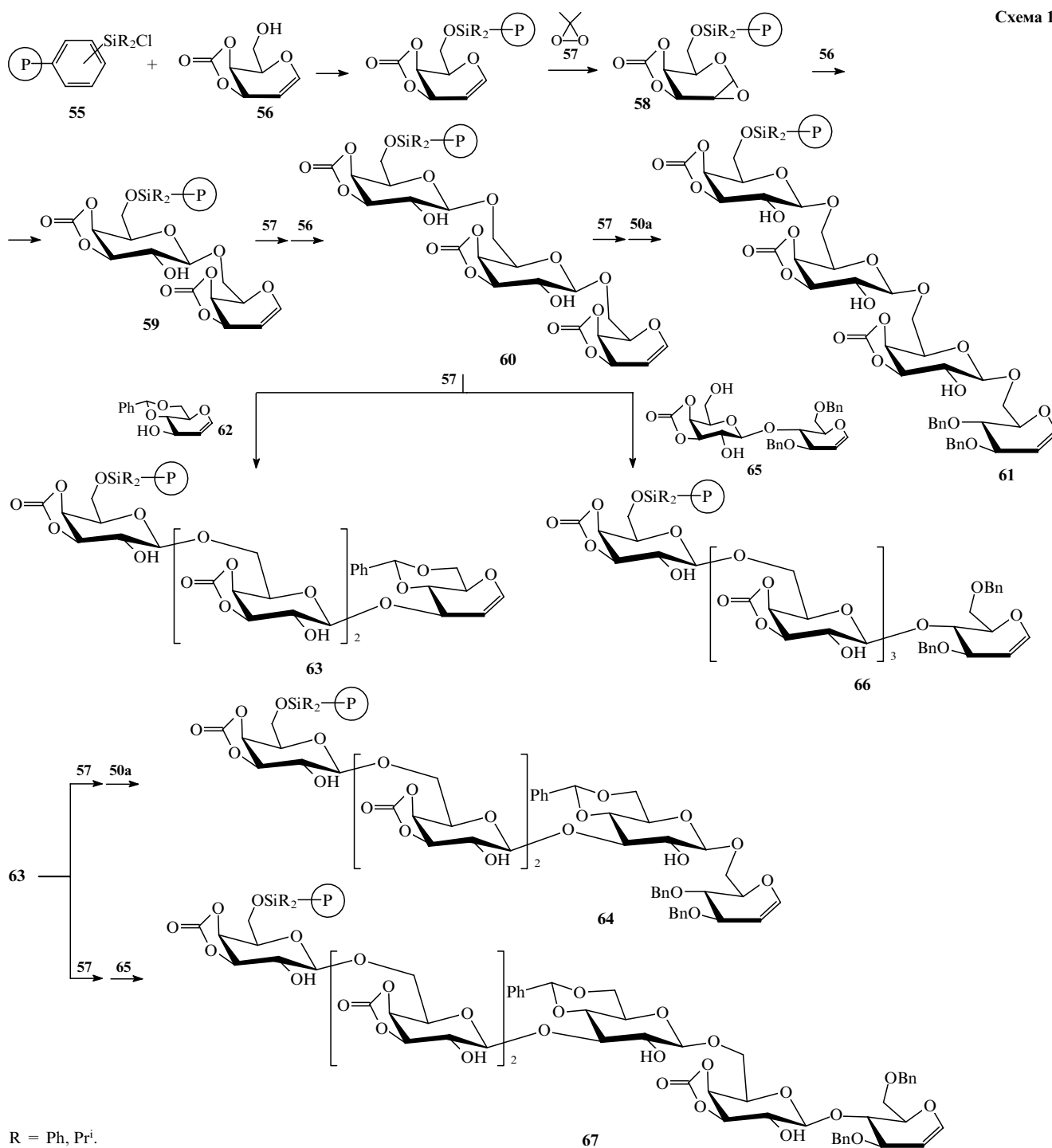
ных групп, после обработки мягким эпоксилирующим реагентом — 3,3-диметилдиоксираном — превращается в 1,2-ангидросахар **49**. Последний при реакции с гликалем **50**, имеющим свободную гидроксильную группу, в присутствии ZnCl_2 дает гликаль дисахарида **51**, который переводят в 1,2-ангидросахар **52**. Его взаимодействие с моносахаридным гликалем **53** приводит к иммобилизованному трисахаридному гликалю **54** и т.д. Выходы на каждой стадии гликозилирования достигают 90–95%. Высокая стереоспецифичность образования гликозидной связи однозначно определяется хорошо изученными закономерностями раскрытия эпиксидного кольца. Как видно, особенностью этого подхода является восстановление реакционноспособной эпиксидной группировки (гликозил-донорной группы) на восстанавливаемом конце растущей цепи в мягких стандартных условиях. Варьируя структуру гликаля-акцептора, можно полу-

чать гомо- и гетероолигосахариды как регулярного, так и нерегулярного строения. Иммобилизованные гликали, содержащие свободные гидроксильные группы (как в результате реакции, так и после избирательного удаления защитных групп), могут выступать и в роли гликозил-акцепторов, что позволяет проводить их гликозилирование и получать разветвленные олигосахариды.

Следует подчеркнуть, что очистка продукта реакции при гликальном методе синтеза упрощается, так как возможные примеси, образующиеся за счет неполноты гликозилирования на промежуточных стадиях синтеза, приобретают более полярный характер после окончательной обработки и легко отделяются от целевых олигосахаридов хроматографически.

Перспективность и гибкость применения гликального метода иллюстрируется конвергентным синтезом нескольких олигосахаридов на нерастворимом носителе (схема 14).¹⁰

Схема 14



В полистирольную смолу последовательным действием бутиллития и дифенил- или диизопропилдихлорсилана вводят группировки R_2SiCl ($R = Ph, Pr^i$), которые служат линкером, связывающим первый мономер с носителем. Подобный линкер удобен тем, что связь $O-Si$ легко разрывается при действии Bu_4NF , обеспечивая снятие продукта синтеза с носителя в мягких условиях.

Обработка модифицированного полистирола **55** производным D-галакталя **56** в присутствии основания с последующим окислением диметилдиоксираном (**57**) приводит к полимеру **58** с иммобилизованным остатком ангидросахара, который служит гликозил-донором при наращивании цепи. Гликозилирование полимера **58** D-галакталем **56** в присутствии безводного $ZnCl_2$ дает производное дисахаридного гликаля **59**. Повторение этого цикла операций приводит к трисахаридному гликалю **60** и затем, после реакции с 3,4-ди-O-бензил-D-глюкалем (**50a**), к тетрасахаридному гликалю **61** с (1-6)-типом гликозидных связей. Если в реакцию с иммобилизованным гликозил-донором, полученным из трисахаридного гликаля **60**, ввести гликаль-акцептор иного строения (например, 4,6-O-бензилиден-D-глюкаль **62**), то образуется тетрасахаридный гликаль **63** нерегулярной структуры. Последний по описанной выше схеме реагирует после превращения в гликозил-донор с 3,4-ди-O-бензил-D-глюкалем, давая производное нерегулярного пентасахарида **64**. Наконец, трисахаридный гликаль **60** после окисления и взаимодействия с дисахаридным гликалем **65** дает пентасахаридный гликаль **66**. Превращение тетрасахаридного гликаля **63** в гликозил-донор по стандартной схеме и реакция с дисахаридным гликалем **65** приводят к производному гексасахарида **67**.

На каждой стадии этого конвергентного синтеза полученный олигосахарид может быть отщеплен от полимера действием Bu_4NF , а защитные группы удалены стандартными методами. Выходы олигосахаридов на каждой стадии синтеза составляют 80–90%, что позволяет получать конечные продукты с выходами порядка 20–40%. На всех стадиях синтеза стереохимия гликозидных связей контролировалась с помощью спектроскопии ЯМР.

Труднее оценить перспективы применения в твердофазном синтезе двух других, предложенных в последние годы методов гликозилирования: с использованием в качестве гликозил-доноров гликозилсульфоксидов²⁴ и пент-4-енил-гликозидов.⁴⁵

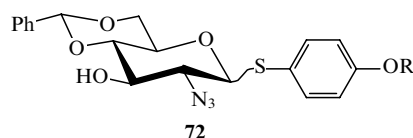
Рассмотрим несколько примеров твердофазных синтезов с использованием этих гликозилирующих реагентов. Один из них представлен на схеме 15.²⁴

n-Гидроксифенил-2,3,4-три-O-пивалоил-6-O-тритил-1-тио-β-D-галактопиранозид (**68**) закрепляли на полимере Мерри-

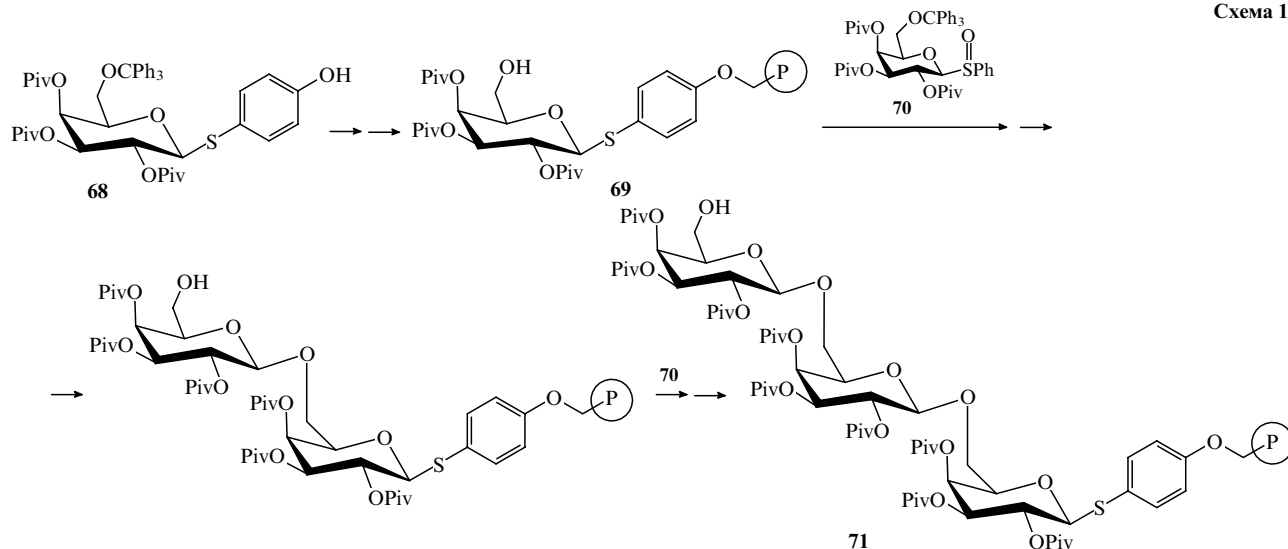
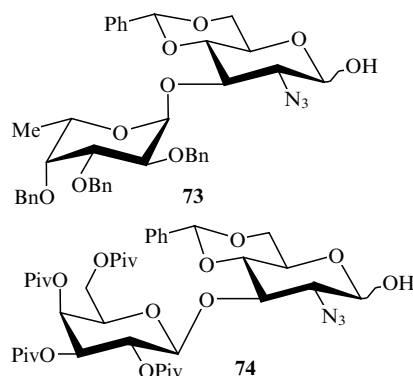
фида. После удаления тритильной группы из иммобилизованного остатка моносахарида освободившуюся гидроксильную группу в полимере **69** гликозилировали сульфоксидом **70** в присутствии ангидрида трифторметансульфокислоты и 2,4,6-три-*m*-*tert*-бутилпиридина. После удаления тритильной группы в иммобилизованном дисахариде процесс повторили. Полученное производное соответствующего трисахарида **71** снимали с носителя действием трифторацетата ртути в смеси дихлорметан–вода. Гликозилирование протекало стереоспецифично с образованием β-галактозидной связи. Общий выход трисахарида составил 52%. С учетом того, что отщепление олигосахарида от носителя проходит на 70–75%, выходы ди- и трисахаридов на стадии гликозилирования были не менее 94–95%.

С использованием гликозилсульфоксидов как гликозил-доноров можно гликозилировать и вторичные гидроксильные группы, что было показано на примере получения двух синтетических предшественников Льюис-антигенов группоспецифических гликопротеинов крови.

При гликозилировании иммобилизованного аналогичным образом остатка 2-азидо-4,6-O-бензилиден-2-дезоксид-глюкозы (**72**)



сульфоксидами на основе 2,3,4-три-O-бензил-L-фукозы и 2,3,4,6-тетра-O-пивалоил-D-галактозы с выходами 67 и 64% были получены дисахариды **73** и **74** соответственно, причем реакция проходила стереоспецифично.



Стереоспецифичность, которую особенно подчеркивают авторы,²⁴ в данном случае вполне естественно определяется природой заместителя у атома O(2) донора. Такая же закономерность наблюдается при гликозилировании в растворе.

Данные о дальнейшем использовании гликозилсульфоксидов в твердофазном синтезе олигосахаридов пока отсутствуют.

Препятствием к широкому распространению метода гликозилирования с использованием гликозилсульфоксидов могут оказаться более сложные экспериментальные условия и неопределенность вопроса о его стереоспецифичности при использовании других моносахаридов.

Действие пент-4-енилгликозидов в качестве гликозилирующего реагента основывается на генерации карбокатиона на гликозидном центре сахара под действием *N*-иодсукцинимиды и триэтилсилилтрифлата. В обзоре⁴⁵ подробно описаны реакции гликозилирования с применением *n*-пент-4-енилгликозидов, а в кратком сообщении⁴⁶ приводятся общие соображения об использовании этой реакции в твердофазном синтезе с применением различных носителей, линкеров и моносахаридов. По данным авторов работы⁴⁶ твердофазная реакция гликозилирования протекает с удовлетворительным выходом. Стереоспецифичность реакции недостаточно высока, поэтому ее предлагают использовать в комбинаторной химии для получения «коллекций» иммобилизованных олигосахаридов, непосредственно пригодных для испытания на активность. Получение подобной «коллекции» депротектированных олигосахаридов методами комбинаторной химии было продемонстрировано на примере синтеза (без описания эксперимента) трисахарида β -Galp(1-2)- α -Glc(1-6)GlcNAc.

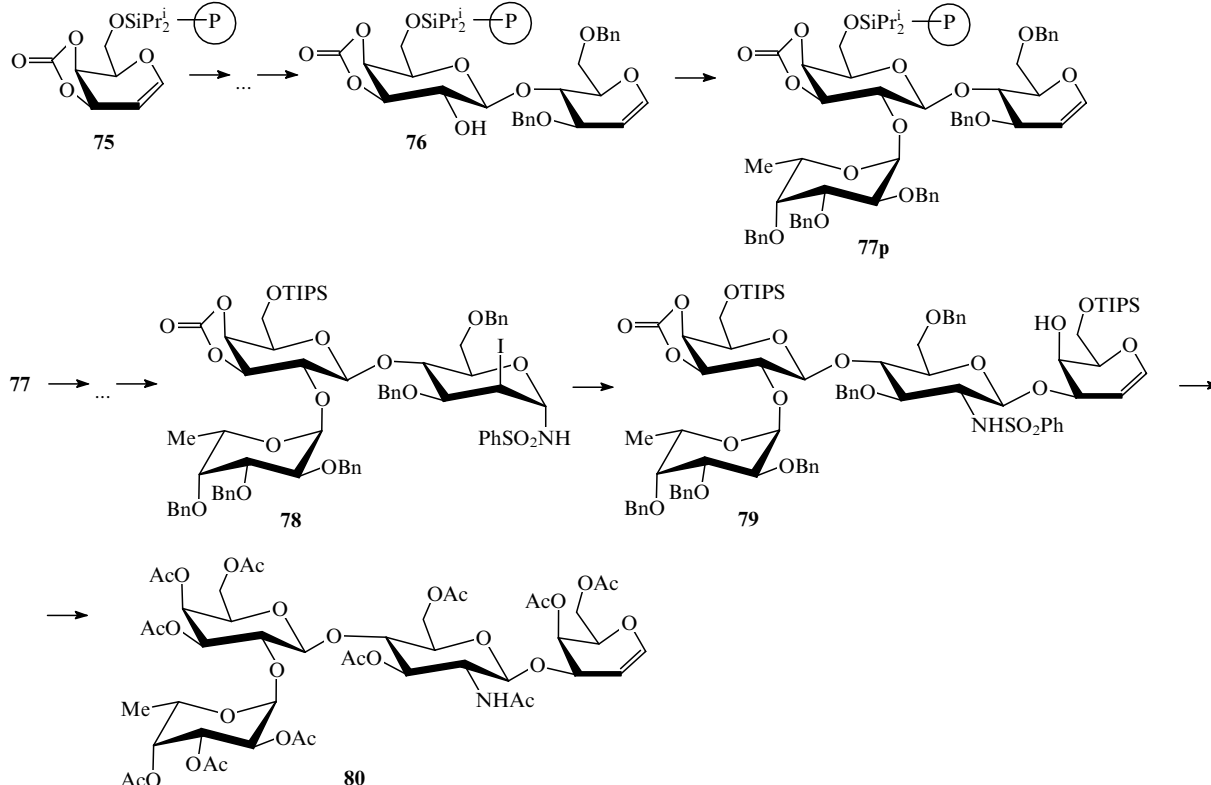
Преимущества твердофазного синтеза олигосахаридов наиболее существенно проявляются при целенаправленном синтезе сложных фрагментов природных биополимеров. Так, гликальным методом были получены биологически важные олигосахариды, играющие значительную роль в углевод-белковом взаимодействии и являющиеся антиген-

ными детерминантами. Отдельные стадии этого синтеза осуществляли на полистирольном носителе.

Синтез *N*-детерминанты типа 2 группоспецифического гликопротеина крови представлен на схеме 16.⁴⁷ 3,4-*O*-Карбонил-D-галакталь **75**, иммобилизованный на полистирольной смоле через диизопропилсилильный линкер, окисляли диметилдиоксираном в соответствующий 1,2-ангидросахар, который затем вводили в реакцию с 3,6-ди-*O*-бензил-D-глюкалем в присутствии $ZnCl_2$. Образовавшийся иммобилизованный гликаль дисахарида **76** гликозилировали по свободной OH-группе в положении 2' действием 2,3,4-три-*O*-бензил-L-фукопиранозилфторида в присутствии трифлата олова и 2,6-ди-*tert*-бутилпиридина. Иммобилизованный трисахарид **77p** снимали с носителя обработкой Bu_4NF (общий выход 50%), после чего синтез продолжали уже в растворе. Сначала в полученном трисахариде **77** защищали гидроксильную группу у атома C(6) в остатке галактозы триизопропилсилильной группой, а затем обрабатывали бензолсульфамидом в присутствии перхлората (диколлидин)иодония. Полученный в результате такой обработки 2-дезоксид-2-иод-N-фенилсульфонилгликозиламин **78** (ср.⁴⁸) при взаимодействии с 3-*O*-трибутилстаннил-6-*O*-триизопропилсилил-D-галакталем в присутствии тетрафторбората серебра претерпевал перегруппировку.⁴⁹ Образовавшийся тетрасахарид **79** после удаления защитных групп и N-ацетилирования давал тетрасахарид **80** — производное *N*-антигена типа 2 группоспецифического гликопротеина крови.

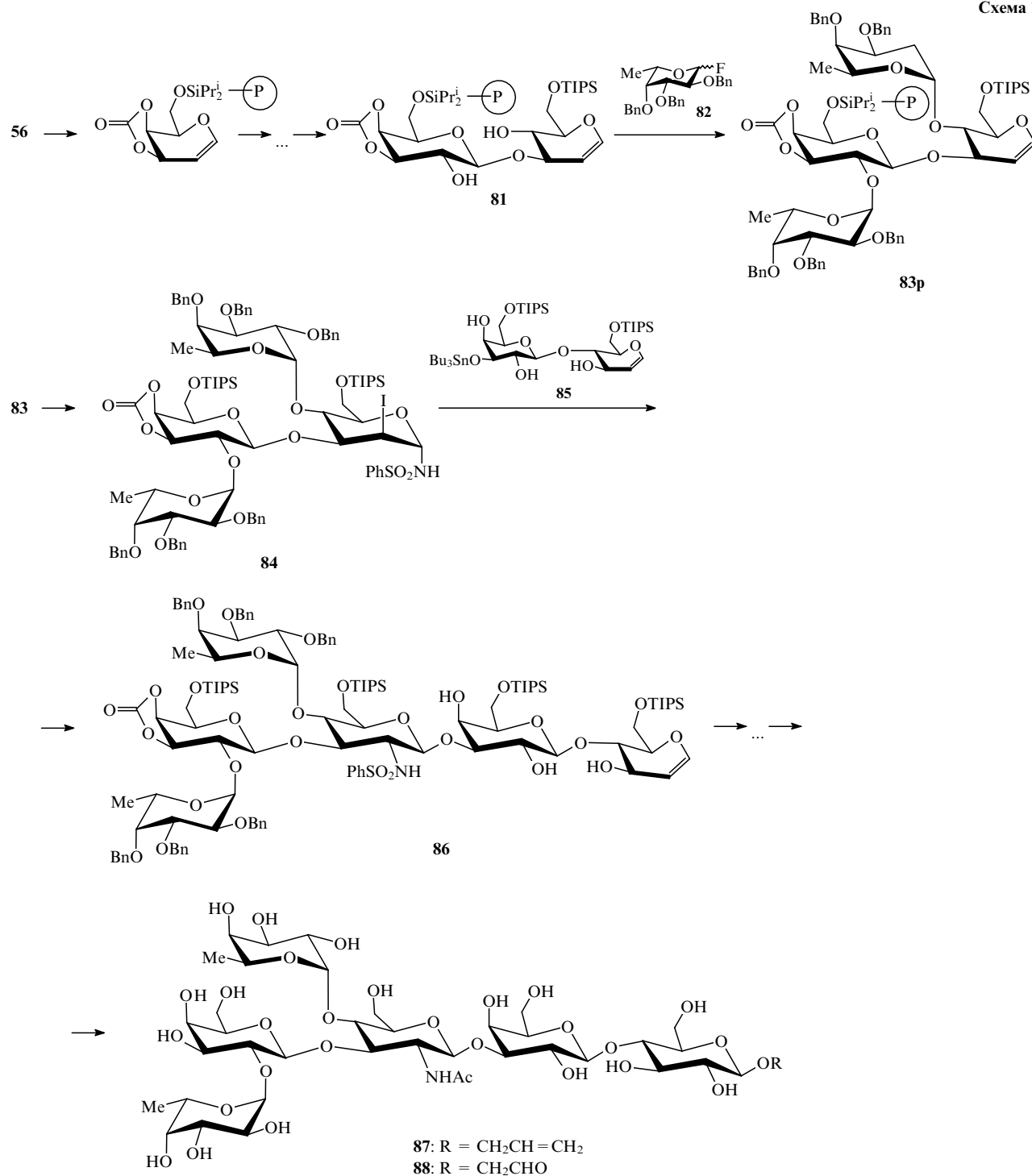
Аналогичным образом был получен (схема 17) гексасахарид, обладающий Le^b -специфичностью, в форме, пригодной для конъюгации с белком.⁴⁷ Исходный галакталь **56** иммобилизовали на полистирольную смолу и продукт реакции превращали в 1,2-ангидросахар, которым затем гликозилировали 6-*O*-триизопропилсилил-D-глюкаль (в нем избирательно реагирует только наиболее реакционноспособная гидроксильная группа при атоме C(3)). Полученный (1-3)-связанный дисахарид **81** с двумя свободными гидроксильными группами гликозилировали избытком 2,3,4-три-*O*-бен-

Схема 16



TIPS = $SiPr_3$.

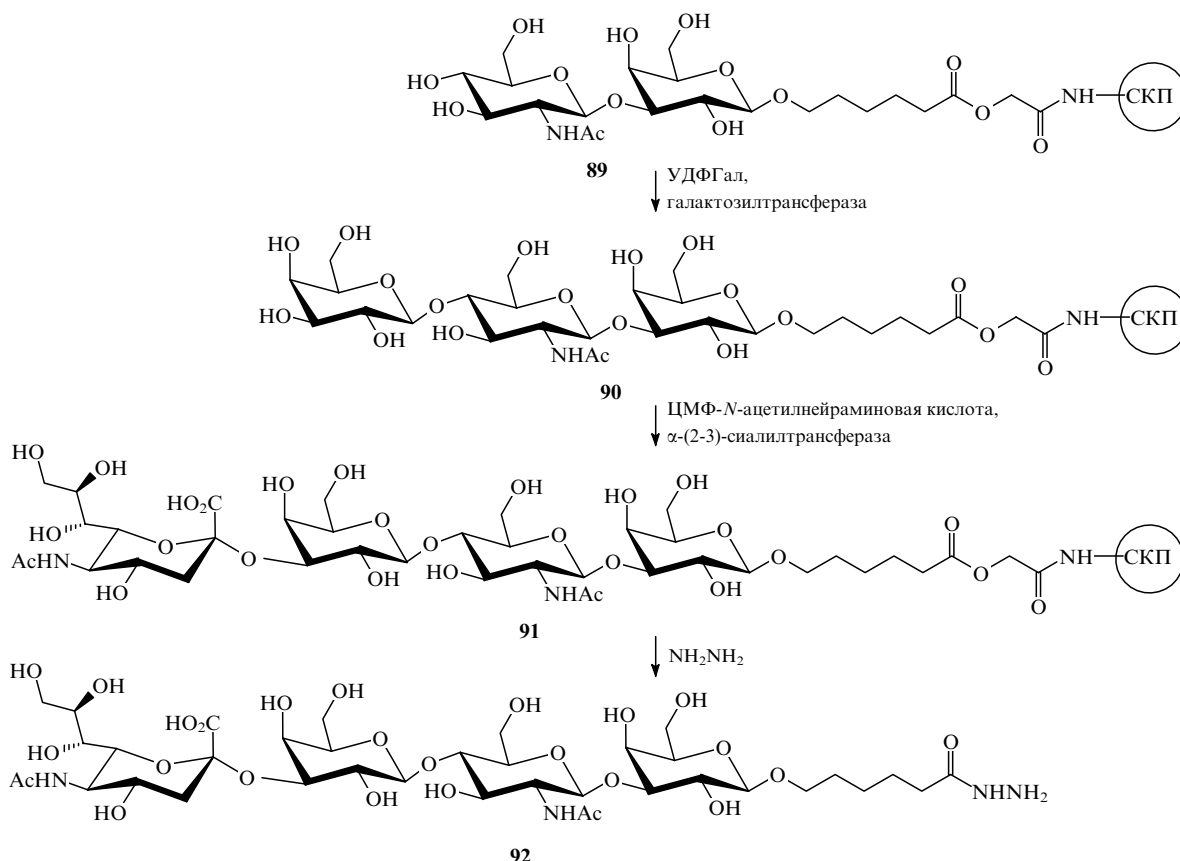
Схема 17



зил-L-фукопиранозилфторида (82). Образующийся тетрасахарид 83p, содержащий два остатка L-фукозы, снимали с носителя, первичноспиртовые группы силилировали, после чего синтез продолжали в растворе. Высвободившийся тетрасахарид 83 переводили в 2-дезоксид-2-фенилсульфонилгликозил-амин 84. Последний после реакции с производным 3-О-трибутилстаниллакталя 85 давал гликаль гексасахарида 86, который после перевода в 1,2-ангидропроизводное и взаимодействия с аллиловым спиртом превращался в аллилгликозид соответствующего гексасахарида 87. С целью выработки антител к Le^b-антигену гексасахарида 87 превращали в альдегид 88, пригодный для конъюгации с белком.

В работе¹⁵ осуществлены ферментативный синтез в растворе пентасахарида NeuAc- α -(2-3)-Gal- β -(1-4)-[Fuc- α -(1-3)]-GlcNAc- β -(1-3)-Gal и ферментативный твердофазный синтез тетрасахарида NeuAc- α -(2-3)-Gal- β -(1-4)-GlcNAc- β -(1-3)-Gal, являющихся ингибиторами Е-селектина и *Helicobacter pylori* соответственно. Фрагмент пентасахарида — тетрасахарид NeuAc- α -(2-3)-Gal- β -(1-4)-[Fuc- α -(1-3)]-GlcNAc (сиалил-Льюис-X, SLe^x) — является опухолеассоциированным антигеном; его активность связана с адгезией клеток, метастазированием, воспалительными процессами и тромбозом. В состав этого антигена входит остаток нейраминавой кислоты, стереоспецифическое введение которого в олигосахаридную цепь химическими методами достаточно сложно,

Схема 18



поэтому использование ферментативного гликозилирования оказывается особенно удобным.

Твердофазный синтез тетрасахарида NeuAc- α -(2-3)-Gal- β -(1-4)-GlcNAc- β -(1-3)-Gal осуществляли на пористом стекле, модифицированном введением иодацетиламино-групп, что позволило проводить отдельные стадии синтеза как в водной среде, так и в органическом растворителе (схема 18).¹⁵ Исходный дисахарид — 2-ацетидамо-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозил-(1-3)-галактопиранозу, полученную химическим синтезом в виде гликозида ω -гидроксигексановой кислоты, — иммобилизовали на модифицированном СКП. Иммобилизованный дисахарид **89** при инкубации с УДФГал в присутствии β -(1-4)-галактозилтрансферазы давал трисахарид **90**, который затем вводили в реакцию с цитидин-5'-фосфат-*N*-ацетилнейраминавой кислотой (ЦМФ-*N*-ацетилнейраминавой кислоты) в присутствии α -(2-3)-сиалилтрансферазы. Полученный тетрасахарид **91** отщепляли от носителя действием гидразина и выделяли в виде гликозида ω -гидроксигексаногидразида **92**, пригодного для конъюгации с белком. Этот синтез еще раз демонстрирует преимущества использования ферментов при твердофазном синтезе олигосахаридов, когда регио- и стереоспецифичность образующихся гликозидных связей определяются специфичностью гликозилтрансфераз.

Другим примером эффективного использования твердофазного метода для направленного синтеза биологически активных олигосахаридов сложного строения служит полу-

чение элиситора фитоалексинов (ЭФА), предохраняющего растения от вирусной и бактериальной инфекций. Синтетический ЭФА (разветвленный гептасахарид) представляет практический интерес для растениеводства, так как природный продукт малодоступен из-за его низкой концентрации в растениях. Синтез ЭФА **93** был осуществлен по двум различным схемам.

Согласно первой из них (схема 19)⁵⁰ олигосахаридная цепь строится последовательным наращиванием блоков на растворимом носителе (ПЭГ) с использованием тиогликозидного метода гликозилирования. Первый моносахарид — метил-2,3-ди-*O*-бензоил-6-*O*-диметокситритил- α -D-глюкопиранозид (**94**) — присоединяли к носителю, модифицированному остатками янтарной кислоты, через гидроксильную группу при атоме C(4) (нагрузка — 148 ммоль \cdot г⁻¹). После мягкого ацидолиза диметокситритильной группы образовавшийся полимер вводили в реакцию с тиогликозидом дисахарида **95** в присутствии *N*-иодсукцинимид и трифторметансульфокислоты. Бензилиденовую защиту удаляли кислотным гидролизом и проводили региоселективное гликозилирование иммобилизованного трисахарида **96** по атому O(6') тиогликозидом **97**. Последующее ацилирование гидроксильной группы у атома C(4') и удаление силильной защиты привело к тетрасахариду **98**.

Повторение этой последовательности операций (взаимодействие с дисахаридом **95**, дебензилидирование и взаимодействие с тиогликозидом **97**) дает защищенный

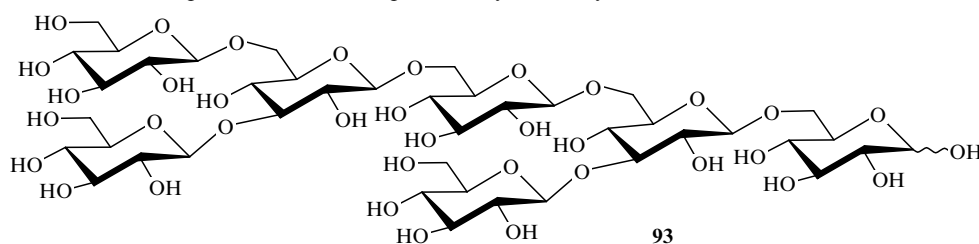
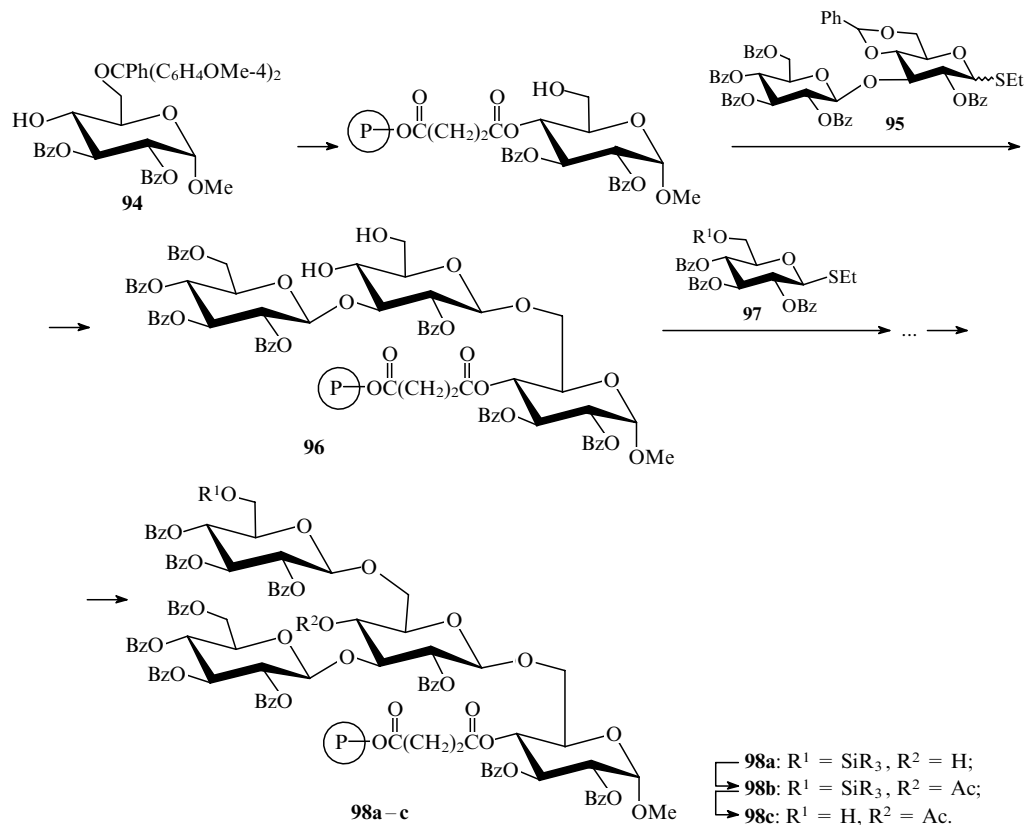


Схема 19



иммобилизованный гептасакхарид. Для очистки продуктов, образующихся на каждой стадии синтеза, от избытка растворимого реагента проводили осаждение полимерного материала и его промывание эфиром. Удаление защитных групп действием метилата натрия сопровождалось снятием гептасакхаридов с носителя. В результате с выходом 18% был получен биологически активный метилгликозид ЭФА.

По второй схеме ЭФА и его низшие аналоги получали на гидроксильрованной полистирольной смоле с использованием фоточувствительного линкера **99** и тиогликозидного метода гликозилирования.⁷ Нитробензиловый спирт **99** гликозилировали фенол-2,3,4-три-*O*-бензоил-6-*O*-(*mpem*-бутилдифенилсилил)-1-тио-β-D-глюкопиранозидом (**100**) и полученный гликозид иммобилизовали. Иммобилизованный таким способом остаток глюкозы служил началом олигосахаридной цепи, которую наращивали согласно схеме 20 последовательным взаимодействием с тиоглюкозидами **100**, **101** и **102**. Тиоглюкозид **100** содержал избирательно отщепляемую *mpem*-бутилдифенилсилильную защитную группу у атома O(6), а тиоглюкозид **101** — 9-флуоренилметоксикарбонильную (Fmoc) группу у атома O(4). Эти группы удаляли избирательно и гликозилировали освобожденные гидроксильные группы соответствующим тиоглюкозидом в присутствии трифлата диметил(метилтио)-сульфония. Полученный таким образом с общим выходом 20% гептасакхарид снимали с носителя фотолизом.

Твердофазный синтез был применен также для получения олигосахаридов, содержащих 6-дезоксид и/или 2,6-дидезоксимоносахаридные звенья, которые являются углеводными цепями некоторых важных антибиотиков.⁹ В этом синтезе оригинально сочетается снятие готового олигосахаридов с носителя с нуклеофильным замещением гидроксильной группы, через которую сахар иммобилизован на носителе. В качестве такого носителя использовали полимер Меррифила, модифицированный введением остатка этансульфокислоты. Метил-4-*O*-ацетил-2,3-ди-*O*-бензил- или метил-2-*O*-ацетил-3,4-ди-*O*-бензил-α-D-глюкопиранозид **103a(b)**

иммобилизовали на этом носителе (схема 21), после чего *O*-ацетильные группы удаляли действием гуанидина. Иммобилизованные моносахариды **104a(b)** вводили в реакцию с гликозил-донорами **105** или **106** в присутствии триметилсилилтрифлата и получали соответствующие иммобилизованные дисахариды **107–110**. Отщепление дисахаридов от носителя проводили обработкой NaI в метилэтилкетоне, при этом одновременно происходило замещение сульфонилокси-группы на иод. Выходы иоддесоксисахаров **111–114** составляли 85–91%. После обработки последних Bu₃SnH были выделены соответствующие дезоксисахара **115–118** с выходом 92%.

Этот метод был использован для целенаправленного синтеза углеводного фрагмента антибиотика оливомицина А (схема 22).⁹ Глюкаль **119** иммобилизовали на сульфонилоксилированном полимере Меррифила, после чего снимали *O*-силильную защитную группу и обрабатывали полимер трихлорацетимидатом **122**. Полученный иммобилизованный дисахарид **123** после десилилирования (**123**→**124**) гликозилировали гликозилацетатом **106** в присутствии триметилсилилтрифлата. Трисахарид **125** снимался с носителя с одновременным замещением атома брома на иод (выход 67%). Гликаль **125** использовали для непосредственного введения углеводного фрагмента в агликон антибиотика.

Авторы отмечают одно важное, но пока еще не вполне понятное обстоятельство: гликозилирование трихлорацетимидатом **122** акцептора на носителе протекает стереоспецифично с образованием только β-связей, в то время как в продукте, полученном в растворе, в небольшом количестве присутствуют и α-связи.

Данный пример интересен еще и тем, что демонстрирует возможность осуществления одновременно с твердофазным синтезом углеводных структур трансформации моносахаридного звена. Это расширяет круг реакций в синтетической химии углеводов, проводимых на полимерных носителях. Так, авторы работы⁹ указывают на возможность введения аналогичным путем в углеводные фрагменты звена амина-

Схема 21

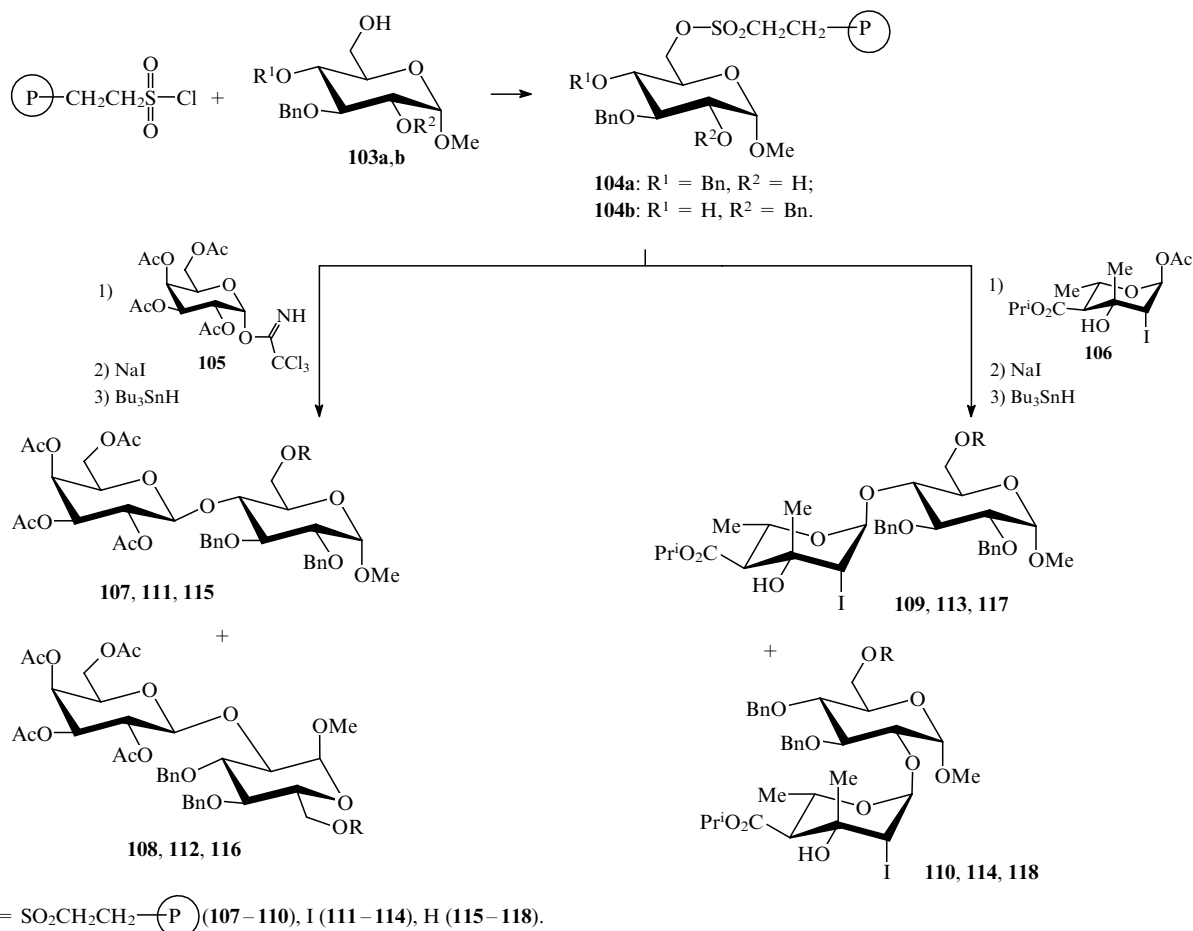
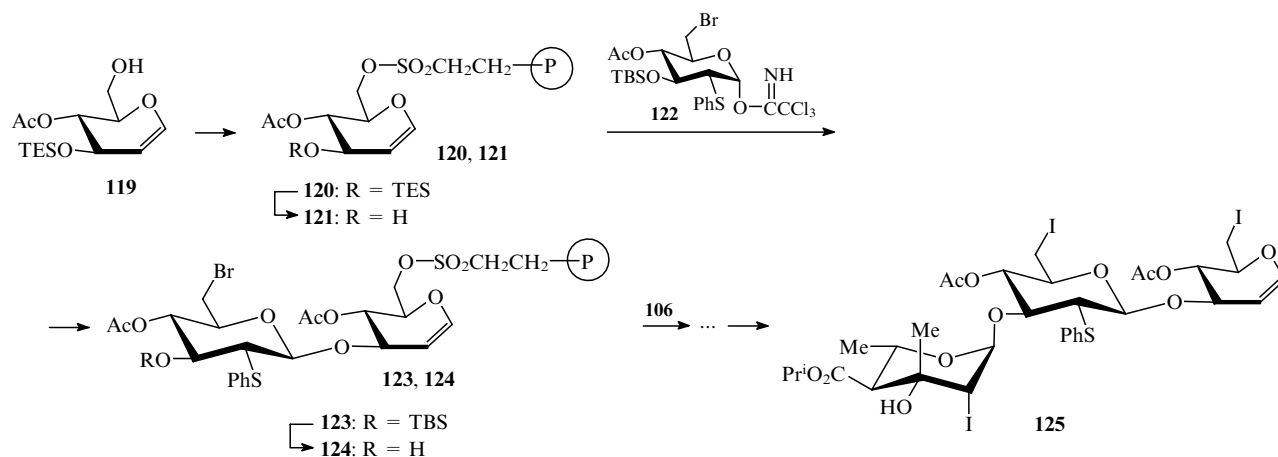


Схема 22



сахара и использования для снятия продукта реакции с носителя азида натрия вместо NaI.

V. Синтез гликопептидов

Гликопептиды — соединения, содержащие олигосахариды, связанные ковалентной O- или N-гликозидной связью с аминокислотами или пептидами. Они являются фрагментами гликопротеинов — важнейших природных гликоконъюгатов, выполняющих ответственные и разнообразные функции в клетке, — и используются в качестве простейших моделей при изучении биологической функции гликопротеинов. В последнее время гликопептиды приобрели и практическое значение, поскольку некоторые из них послужили

основой для создания высокоэффективных лекарственных средств нового поколения.

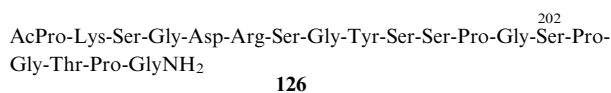
Для получения гликопептидов чаще применяют твердофазный синтез, так как при их синтезе в растворе возникают серьезные затруднения. Синтез гликопептидов можно осуществлять наращиванием либо пептидной, либо олигосахаридной цепей.

Простейшими представителями гликопептидов являются пептиды, одна из аминокислот которых гликозилирована моносахаридом.[¶] Для их получения можно

[¶] Интересно отметить, что именно введение первого моносахаридного звена оказывает наиболее существенное влияние на физико-химическую характеристику пептида.

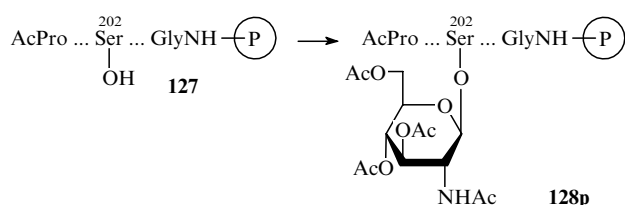
использовать прямое гликозилирование соответствующего аминокислотного остатка в готовой иммобилизованной пептидной цепи.[†]

Этот метод был кратко описан⁵³ на примере синтеза гликозилированного фрагмента 189-207 тау-протеина (**126**) — белка, ответственного за развитие определенного этапа болезни Альцгеймера, а также его упрощенного аналога.



Иммобилизованный 19-членный пептид **127**, содержащий необходимые защитные группы на аминокислотных остатках, за исключением гидроксильной группы серина-202, подлежащего гликозилированию, был получен твердофазным пептидным синтезом. Его обрабатывали 3,4,6-три-*O*-ацетил-2-метил-*D*-глюкооказолином,[‡] полученным при действии триметилсилилтрифлата на пер-*O*-ацетил- β -*D*-глюкозамин по методике, описанной в работе⁵⁴ (схема 23).

Схема 23



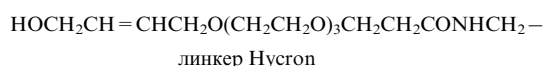
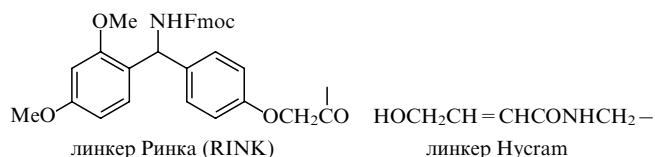
Образовавшийся *O*-гликопептид **128p** (выход 23%) снимали с носителя действием смеси трифторуксусной кислоты и анизола и очищали хроматографией. Структура гликопептида **128** была подтверждена масс-спектрометрически. Аналогично было осуществлено гликозилирование остатка серина в упрощенном аналоге — пептиде AcGly-Ser-Pro-Val-Glu-Lys. Соответствующий *O*-гликопептид был получен с выходом 33%. Тем самым была продемонстрирована возможность успешного гликозилирования в закрепленном на носителе пептиде обычно трудно гликозилируемого остатка серина, находящегося по соседству с остатками пролина.

Еще одним примером прямого гликозилирования является синтез *N*-гликопептидов, в которых к остатку аспарагина гексапептида Asn-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu *N*-гликозидной связью присоединены различные моно- и олигосахаридные остатки (до гексасахаридов включительно). Для их получения гексапептид, закрепленный на носителе и содержащий *N*-концевую аспарагиновую кислоту, модифицировали путем превращения карбоксильной группы в остатке аспарагиновой кислоты в пентафторфениловый эфир. Этот активированный эфир вводили во взаимодействие с соответствующими гликозиламинами в присутствии гидроксibenзотриазола и амина и получали *N*-гликозиласпарагины.⁵⁵

Необходимо отметить, что метод прямого гликозилирования иммобилизованной пептидной цепи не получил развития в синтетической практике. Основным методом получения гликопептидов, содержащих моносахаридный остаток или короткую олигосахаридную цепь, по существу является классический твердофазный пептидный синтез (см., например, работы⁵⁶⁻⁹⁰) с использованием соответствующих гликозилированных аминокислот.

Правда, для того, чтобы твердофазный синтез гликопептидов можно было проводить в автоматическом режиме

пептидного синтеза, необходимо было решить ряд проблем. Так, особого внимания требовал подбор носителей и линкеров, которые призваны обеспечить как оптимальные условия для реакции конденсации при наращивании пептидной цепи, так и мягкое бездеструктивное снятие готового гликопептида с носителя. В качестве носителя часто использовали смолу Меррифилда,⁵⁶ модифицированную введением остатков бензилового спирта HOCH₂C₆H₄OCH₂-P,⁵⁸ а в качестве линкеров — производное, в котором сочетаются фрагменты бензгидриламина и феноксиуксусной кислоты (линкер Ринка);⁶¹ соединения, содержащие β -гидроксиаллильные группировки (линкеры Нусрон и Нусграм);^{62, 63} оксим нитробензофенона.⁶⁵

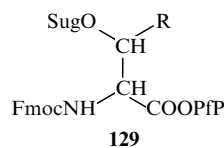


Наряду с выбором линкера для разработки общей методики гликопептидного синтеза, необходимо было стандартизировать процедуры введения в пептидную цепь остатка гликозилированной аминокислоты.

Были разработаны эффективные методы, позволяющие включать гликозилированное аминокислотное звено в пептидную цепь, а также предложены удобные методы синтеза таких звеньев.[§]

Наконец, подробному исследованию подвергся вопрос о защите гидроксильных групп углеводных звеньев и функциональных групп аминокислот, введении, снятии и манипулировании этими защитными группами в ходе синтеза.

Для синтеза *O*-гликопептидов наиболее удобным оказалось использование Fmoc/PfP-стратегии. В этом случае в производных серина или треонина (**129**) аминогруппу защищают Fmoc-группировкой, легко удаляемой под действием мягких оснований, а карбоксильную группу активируют превращением в пентафторфениловый эфир (PfP).



R = H, Me.

Использование этих производных позволяет вводить гликозилированную аминокислоту в цепь в автоматическом режиме стандартного пептидного синтеза.

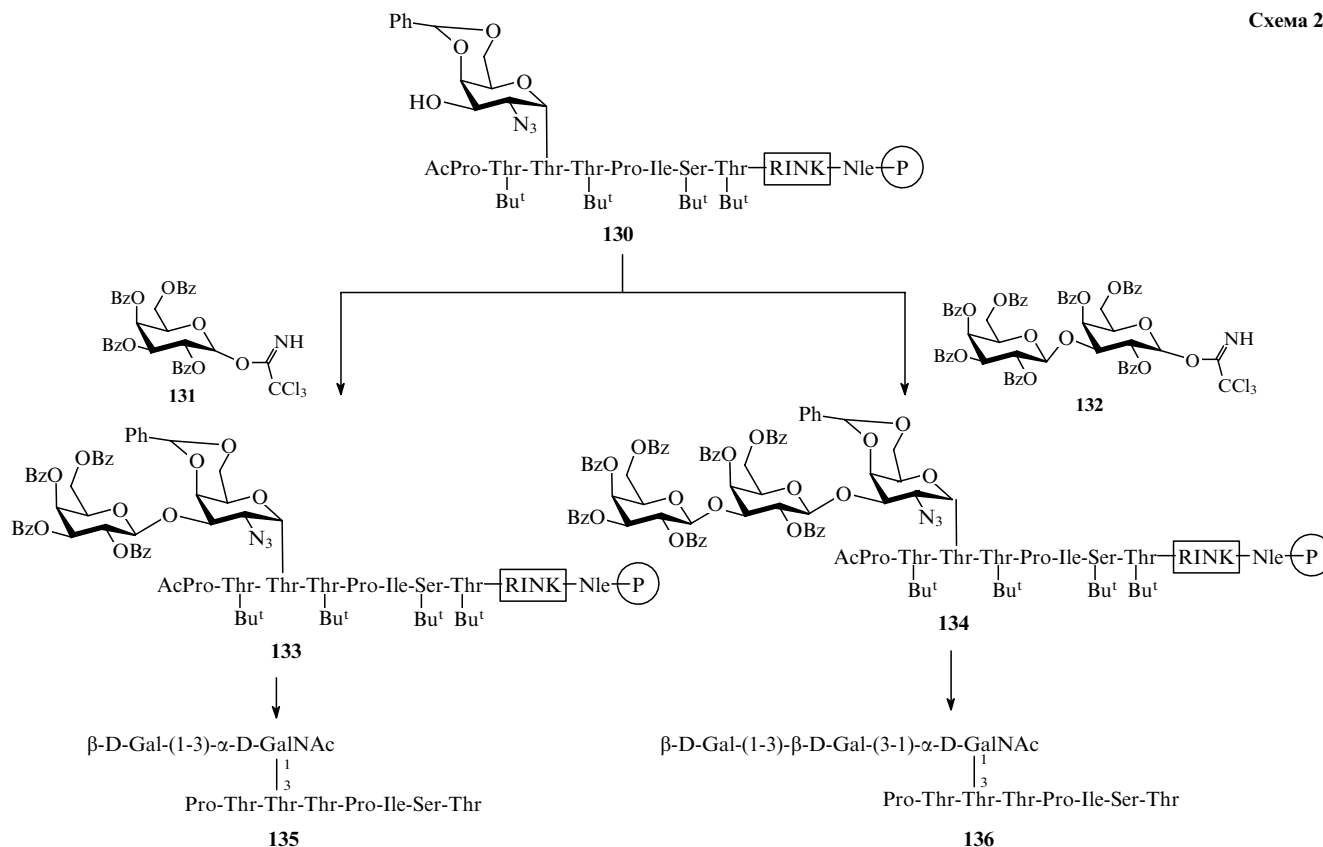
Альтернативным подходом к синтезу гликопептидов со сложной углеводной цепочкой является наращивание олигосахаридной цепи на моносахаридный остаток, уже введенный в иммобилизованную на носителе пептидную цепь. В этом случае важное значение приобретает, как и при синтезе олигосахаридов в растворе, выбор защитных групп в моносахаридных остатках и выбор метода гликозилирования, обеспечивающие оптимальную регио- и стереоспецифичность реакции. Особым обстоятельством, в значительной мере определяющим успех этого варианта синтеза гликопептидов, является выбор носителя, который позволяет обеспечить в единой системе (носитель + линкер) — растворитель достаточно эффективный синтез как пептидной, так и олиго-

[†] О прямом *O*-гликозилировании в растворе пептидов, содержащих остатки серина и треонина, см. в работах^{51, 52}.

[‡] Попытка ввести первое моносахаридное звено в иммобилизованный пептид прямым гликозилированием трихлорацетимидами не удалась.

[§] Такими звеньями являются *O*-гликозилированные треонин и серин в синтезе *O*-гликопептидов и *N*-гликозилированный аспарагин в синтезе *N*-гликопептидов.

Схема 24



сахаридной частей. Условия проведения пептидного и олигосахаридного синтезов могут различаться (например, синтез олигосахаридной части исключает присутствие следов воды или других гидроксилсодержащих компонентов), в связи с чем может потребоваться проведение дополнительных технических операций при смене растворителей в ходе синтеза.

Синтез гликопептидов посредством наращивания олигосахаридной цепи химическим путем подробно описан в фундаментальной работе Паульсена и др.⁹¹

Для получения фрагментов кора (core) муцинов — гликопептидов **130**, содержащих цепь из восьми аминокислот и дили трисахаридный остаток (схема 24), — были использованы линкер Ринка и норлейцин (Nle) как внутренний стандарт. Один из остатков треонина, введенный в иммобилизованную на смоле ПЭГА (сополимер полиэтиленгликоля с производными акриламида) пептидную цепь, содержал связанный *O*-гликозидной связью остаток замещенной 2-азидо-2-дезоксид- α -D-галактозы. В иммобилизованном гликопептиде **130** имелась единственная свободная гидроксильная группа у атома C(3) остатка сахара, которую гликозилировали действием соответствующих *O*-гликозилтрихлорацетимидатов. Как уже отмечалось выше, этот метод гликозилирования используется для создания β -гликозидной связи с хорошими выходами и приемлемой стереоспецифичностью. Так, при взаимодействии гликопептида **130** с *O*-(тетра-*O*-бензоил-D-галактопиранозил)- (**131**) и *O*-(пербензоил- β -D-галактопиранозил-(1-3)-D-галактопиранозил)трихлорацетимидатами (**132**) в присутствии триметилсилилтрифлата были получены производные гликопептидов **133** и **134** соответственно. Последние снимали с носителя действием трифторуксусной кислоты (выходы 67 и 33%), при этом снимались также *O*-трет-бутильные защитные группы. Азидную группу в полученных соединениях превращали в ацетамидную, а затем снимали *O*-бензоильные защитные группы. В результате были получены гликопептиды **135** и **136**, содержащие в узле углеводпептидной связи остаток *N*-ацетилгалактозамина.

Попытка провести этот синтез на других носителях, а также замена *O*-бензоильных групп в трихлорацетимидатах **131** и **132** на ацетильные привела к снижению выходов соответствующих гликопептидов **133** и **134**.

С использованием тех же носителя и линкера была получена группа изомерных гликопептидов с (1-3) и (1-6)-гликозидными связями. Исходный моногликозилированный пептид содержал остаток треонина, гликозилированный 2-азидо-2-дезоксид-3,4-*O*-изопропилиден- α -D-галактопиранозой (схема 25). При гликозилировании пептида **137** трихлорацетимидатами **131** и **132** были получены производные гликопептидов **138** и **139** (выходы 69 и 53% соответственно), которые после превращения азидогрупп в ацетамидные, снятия с носителя и удаления защитных групп были превращены в соответствующие *O*-гликопептиды.

По этой схеме были получены также *O*-гликопептиды с разветвленной олигосахаридной цепью. Для их синтеза с иммобилизованного на носителе гликопептида **133**, содержащего защищенный дисахарид, мягким кислотным гидролизом удаляли защитную бензильденную группировку и гликозилировали гликопептид **140** по первичноспиртовой группе трихлорацетимидатом **131**. В результате был получен гликопептид **141** с разветвленной олигосахаридной цепью.

Описанный подход позволил получить также гликопептиды, содержащие углеводные цепи, построенные из аминокислот. Иммобилизованные гликопептиды **142** и **143**, родственные производным **130** и **137**, но содержащие на N-конце дополнительный остаток глутаминовой кислоты, гликозилировали избытком *O*-(3,4,6-три-*O*-бензоил-2-дезоксид-2-трихлорэтоксикарбониламино- α -D-глюкопиранозил)трихлорацетимидата **144** (схема 26). В полученных производных гликопептидов **145** и **146** *N*-трихлорэтоксикарбониламино- и азидную группы превращали в ацетиламиногруппы, удаляли защитные группы в остатках аминокислот и сахаров и снимали с носителя. Соответствующие гликопептиды — фрагменты кора муцина — были выделены с выходом 62%.

Схема 25

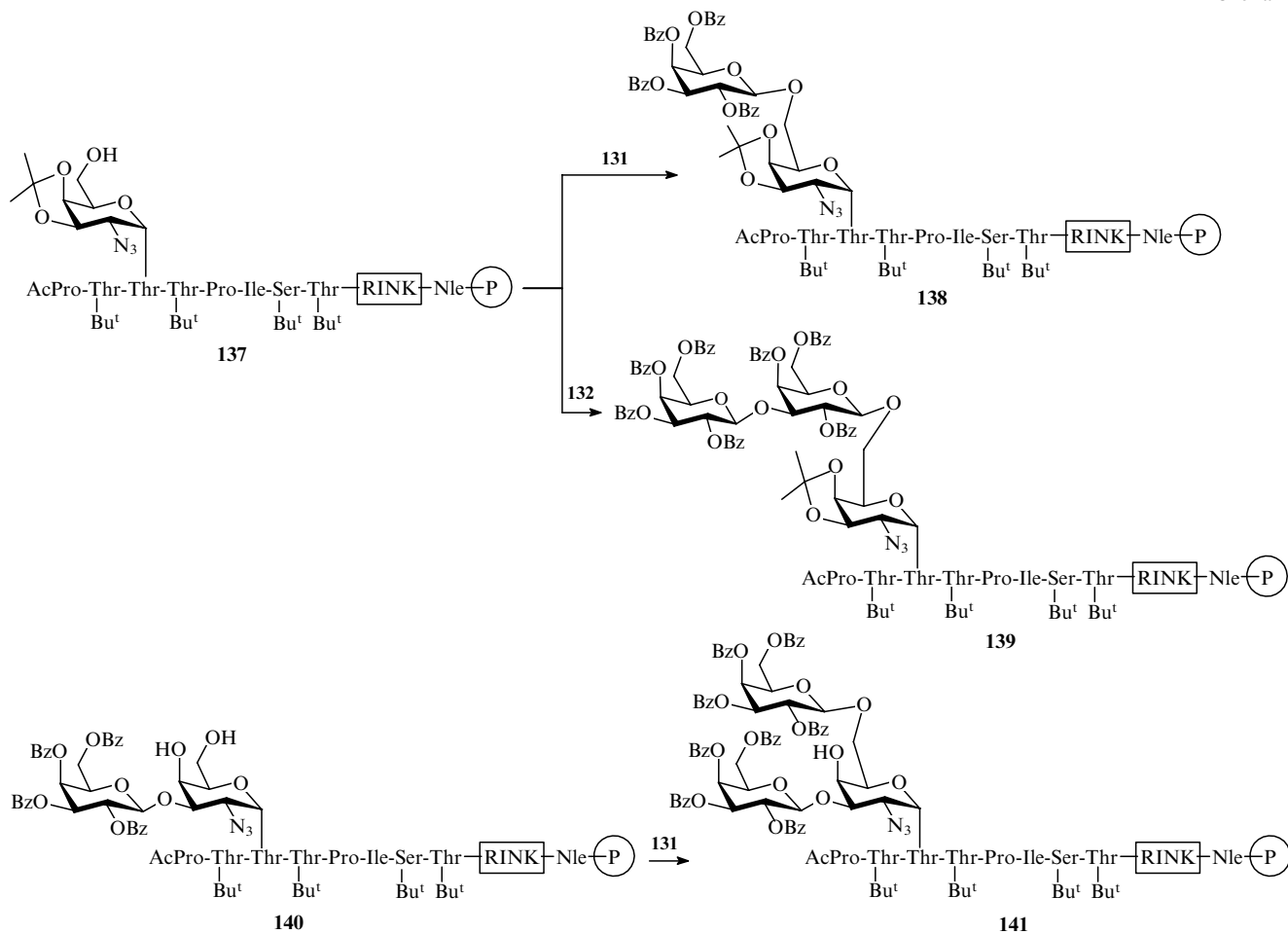


Схема 26

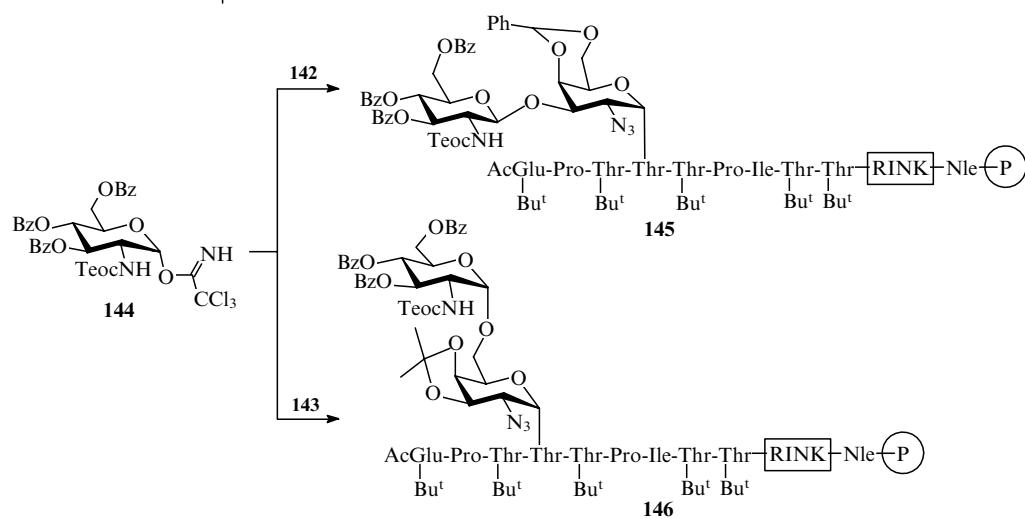
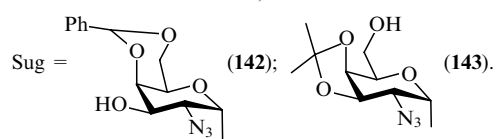
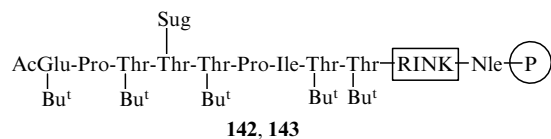
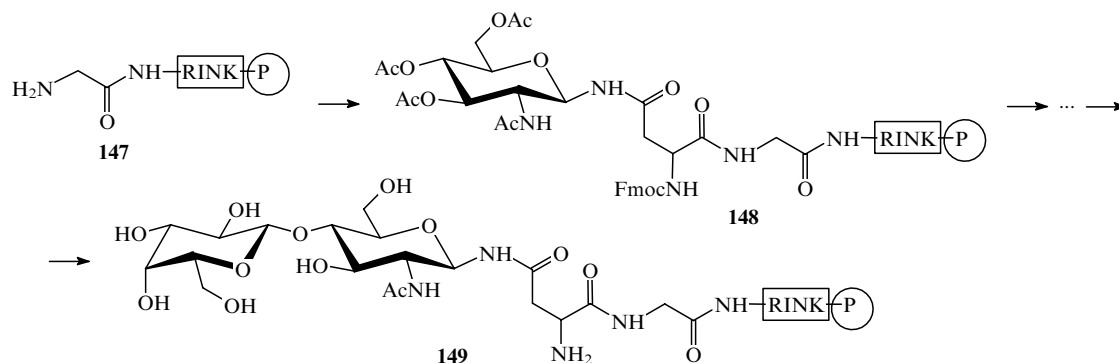


Схема 27



Очевидно, что наращивание олигосахаридной цепи в иммобилизованном на носителе гликопептиде, уже содержащем моносахаридный остаток, является, несмотря на трудоемкость, гибким и надежным методом получения сложных гликопептидов. Этот метод наращивания олигосахаридной цепи может быть значительно облегчен, если использовать в качестве гликозилирующих агентов гликозилтрансферазы. Применение ферментов избавляет от необходимости использовать защищенные моносахариды и гарантирует высокую регио- и стереоселективность образования гликозидных связей. При получении гликопептидов с использованием гликозилтрансфераз последовательным наращиванием пептидной и олигосахаридной цепей на едином носителе последний должен обеспечивать необходимые условия как для синтеза пептидной цепи, так и для переноса моносахаридных остатков под действием гликозилтрансфераз.[¶] Проблема была решена благодаря применению комплексных носителей ПЭГА, которые способны набухать как в воде, так и в органических растворителях, или минеральных носителей СКП, модифицированных введением аминокрупп.

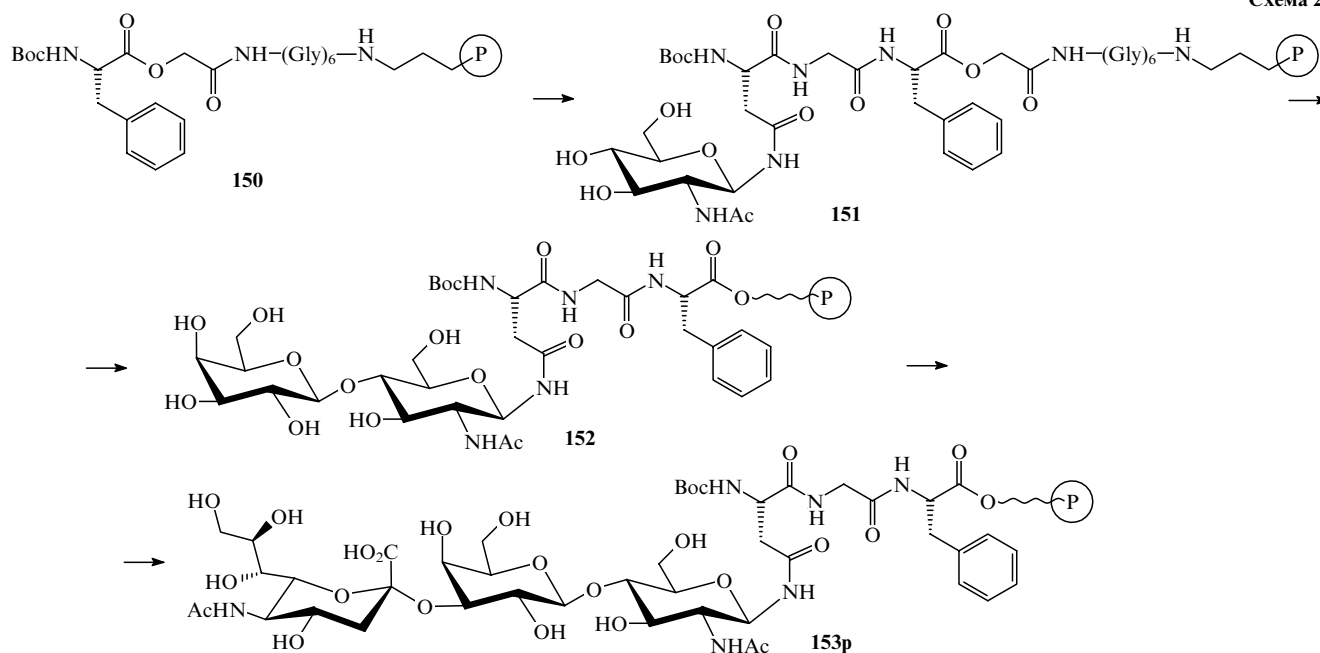
Получение модельного *N*-гликопептида [β -D-Galp-(1-4)- β -D-GlcNAc(1-N(4))]-Asn-Gly на носителе типа ПЭГА, модифицированном линкером Ринка, представлено на схеме 27.¹⁸ На модифицированный носитель закрепляют

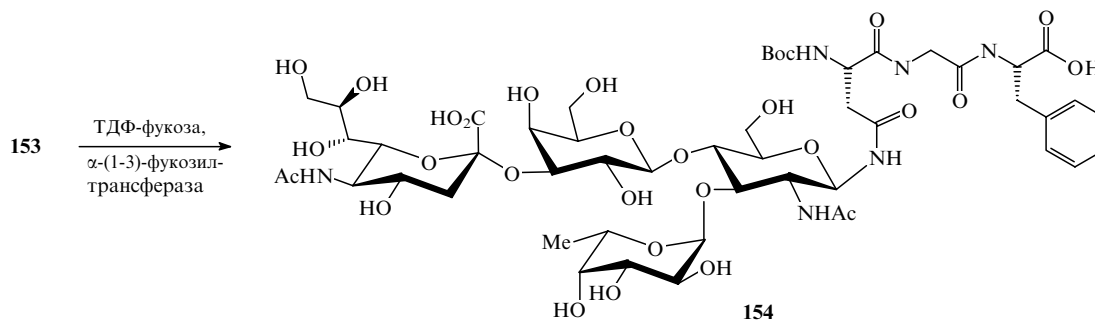
[¶] При выборе такого носителя следует учитывать, что пептидный синтез проводится в органическом растворителе, а наращивание олигосахаридной цепи — в водной среде.

С-концевую аминокислоту — *N*-Fmoc-замещенный глицин. После снятия Fmoc-группы иммобилизованный глицин **147** взаимодействует с *N*(4)-гликозилированным *N*(2)-Fmoc-аспарагином, давая гликопептид **148**. После удаления Fmoc-и ацетильных защитных групп проводят инкубацию с УДФГал и β -(1-4)-галактозилтрансферазой. Образующийся гликопептид **149** может быть снят с носителя действием трифторуксусной кислоты или использован далее в иммобилизованной форме. Контроль за ходом гликозилирования осуществляли с помощью спектроскопии ЯМР ^1H .

Об использовании в качестве носителя СКП, модифицированного 3-аминопропильными группами, в химико-ферментативном синтезе гликопептидов сообщается в работе¹⁴ на примере получения гликопептида сиалил-Льюис-Х (схема 28). К аминокруппам модифицированного СКП присоединяют остаток гексаглицина, непрореагировавшие аминокруппы носителя ацетируют, чтобы исключить их участие в дальнейших превращениях, а концевую аминокруппу гексапептида ацилируют *O*-(*N*-Вос-фенилаланил)-гликолевой кислотой. Образующаяся при этом сложноэфирная связь чувствительна к химотрипсину и удобна для снятия продукта реакции с носителя. После освобождения аминокруппы в эфире **150** стандартными приемами твердофазного пептидного синтеза вводят остатки глицина и *N*(4)-гликозилированного аспарагина. Иммобилизованный гликопептид **151** инкубируют с УДФГал и β -(1-4)-галактозилтрансферазой и получают иммобилизованный гликопептид **152**. Затем гликопептид **152** вводят в реакцию с цитидин-5'-фосфат-*N*-

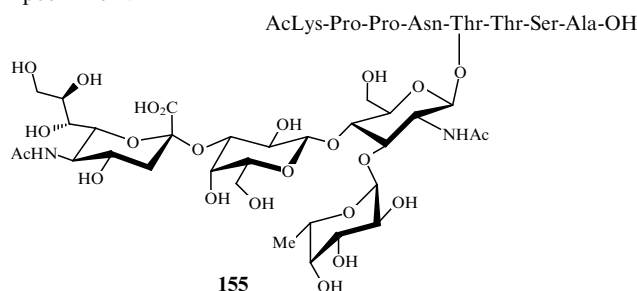
Схема 28





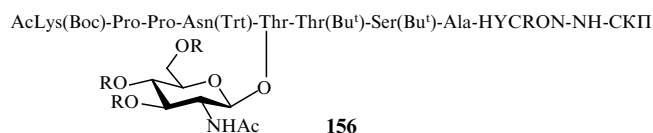
ацетилнейраминной кислотой (ЦМФ-*N*-ацетилнейраминная кислота, активированная форма *N*-ацетилнейраминной кислоты) и α -(2-3)-сиалилтрансферазой, продуктом которой является гликопептид **153p** с трисахаридной цепью, без затруднения снимающийся с носителя при обработке α -химотрипсином. Снятый с носителя *N*-гликопептид **153** далее гликозилируют в растворе тимидин-5'-дифосфатфукозой (ТДФ-фукозой) в присутствии α -(1-3)-фукозилтрансферазы, в результате чего образуется разветвленный *N*-гликопептид **154**.

Аналогичным образом был осуществлен синтез более сложного биологически важного *O*-гликопептида **155** с тем же тетрасахаридным остатком — фрагмента гликопротеина MAdSAM-1 муцинового типа (лиганда селектинов).⁹² Определенные проблемы при его синтезе были связаны с лабильностью *O*-гликозидной связи *N*-ацетилглюкозамина с треонином.



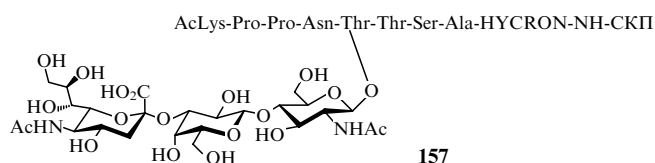
Синтез гликопептида **155** проводили на модифицированных аминопропильными группами ПЭГА и СКП. Носитель СКП оказался более удобным, чем органические носители типа ПЭГА. Для иммобилизации пептидной цепи использовали линкер «Нусон» с аллильной гидроксильной группой, к которой присоединяли концевую аминокислоту — *N*-Фмос-защищенный аланин.

После удаления Фмос-группы в полимере Фмос-Ala-HYCRON-NH-СКП на остаток аланина наращивали пептидную цепь по стандартной методике с использованием *N*-Бос/ОБу^t-техники. В данном случае моносахаридом, лежащим в узле углевод-пептидной связи, был *N*-ацетилглюкозамин, связанный с треонином. Иммобилизованный моногликозилотептид **156**



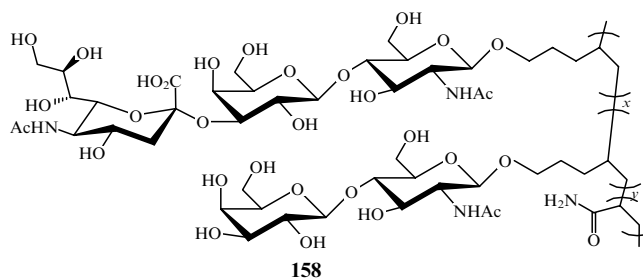
после снятия *N*- и *O*-защитных кислотоллабильных группировок (действием трифторуксусной кислоты в присутствии этандитиола) инкубировали последовательно с УДФГал в присутствии галактозилтрансферазы и с ЦМФ-*N*-ацетилнейраминной кислотой в присутствии α -(2-3)-сиалилтрансферазы. Полученное производное тригликозилпептида **157** снимали с носителя в присутствии катализатора Pd(0). Выход снятого с носителя гликопептида **157**, считая на иммобили-

зованный аланин, составил 9%. Гликопептид **157** в растворе превращали в гликопептид **155** ферментативным фукозилрованием, как описано выше.



Синтез гликопептида **155** был проведен также в растворе. Выход конечного продукта был выше, но время реакции значительно увеличивалось и составило 9 дней. По мнению авторов,⁹² намного более короткое время проведения твердофазного синтеза вполне компенсирует более низкий выход конечного продукта.

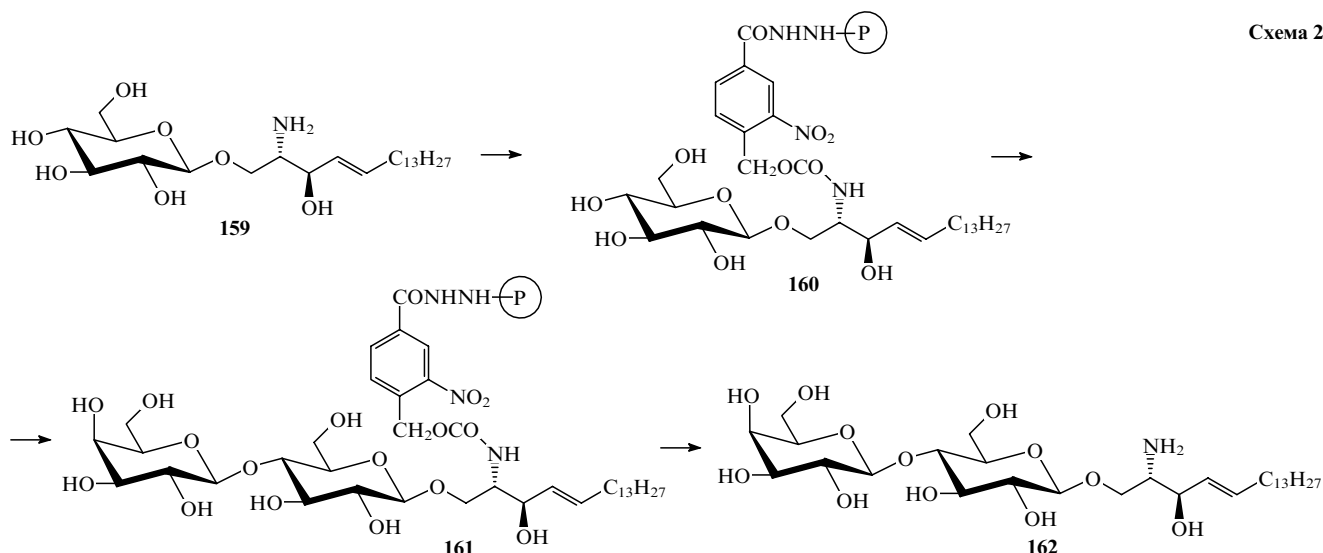
Ферментативное наращивание углеводной цепи было также применено при синтезе гликоконъюгатов, используемых для создания диагностических средств (искусственных антигенов). Таким путем был получен полимер, содержащий цепочки α -NeuNAc-(2-3)- β -D-Galp-(1-4)- β -D-GlcNAc, присоединенные к полиакриламидному носителю.⁹³ Полиакриламид, содержащий моносахаридные звенья, получали сополимеризацией *n*-пент-4-енил-2-ацетиамидо-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозидом и акриламида⁹⁴ и инкубировали его последовательно с УДФГал в присутствии β -(1-4)-галактозилтрансферазы и с *n*-нитрофениловым эфиром *N*-ацетилнейраминной кислоты в присутствии Тс-Тс-транссиазидазы, в результате чего был получен синтетический гликоконъюгат **158**, содержащий трисахаридные звенья наряду с некоторым количеством несиалилированных звеньев.



Таким образом, иногда при ферментативном наращивании углеводной цепи твердофазный синтез используется лишь на стадии синтеза гликопептида, содержащего один моносахарид в узле углевод-белковой связи. В дальнейшем гликопептид снимается с носителя и ферментативное наращивание цепи проводится уже в растворе. Примером может служить получение большой группы *N*-гликопептидов, содержащих в цепях с различной аминокислотной последовательностью два остатка аспарагина, гликозилированных *N*-ацетилглюкозамином, *N*-ацетиллактозамином и сиалил-(2-6')-*N*-ацетиллактозамином.⁹⁵

Известен также пример (пока единственный) ферментативного наращивания углеводной цепи в ряду гликолипидов. Синтез лактозилкерамида был осуществлен с использова-

Схема 29



нием растворимого носителя и фоточувствительного линкера.⁹⁶ Синтетический (2*S*,3*R*,4*E*)-2-амино-1-(β-D-глюкопиранозилокси)-3-гидроксиоктадец-4-ен (**159**, глюкозилсфингозин) переводили в уретановое производное 4-гидроксиметил-3-нитробензойной кислоты и иммобилизовали на носителе — сополимере акриламида и *N*-акрилоилоксисукцинимид (схема 29). Иммобилизованный гликолипид **160** инкубировали с УДФГал и галактозилтрансферазой. Полученное дисахаридное производное **161** очищали от низкомолекулярных соединений диализом, и продукт реакции **162** снимали с носителя фотолизом.

VI. Синтез фосфогликанов

Синтез на носителях был успешно использован и для получения фрагментов фосфогликанов — биополимеров регулярного строения, состоящих из повторяющихся углеводных звеньев, соединенных между собой фосфодиэфирными связями. Биополимеры этого класса, например теиховые кислоты, широко распространены в микроорганизмах, где они выполняют функции антигенов.

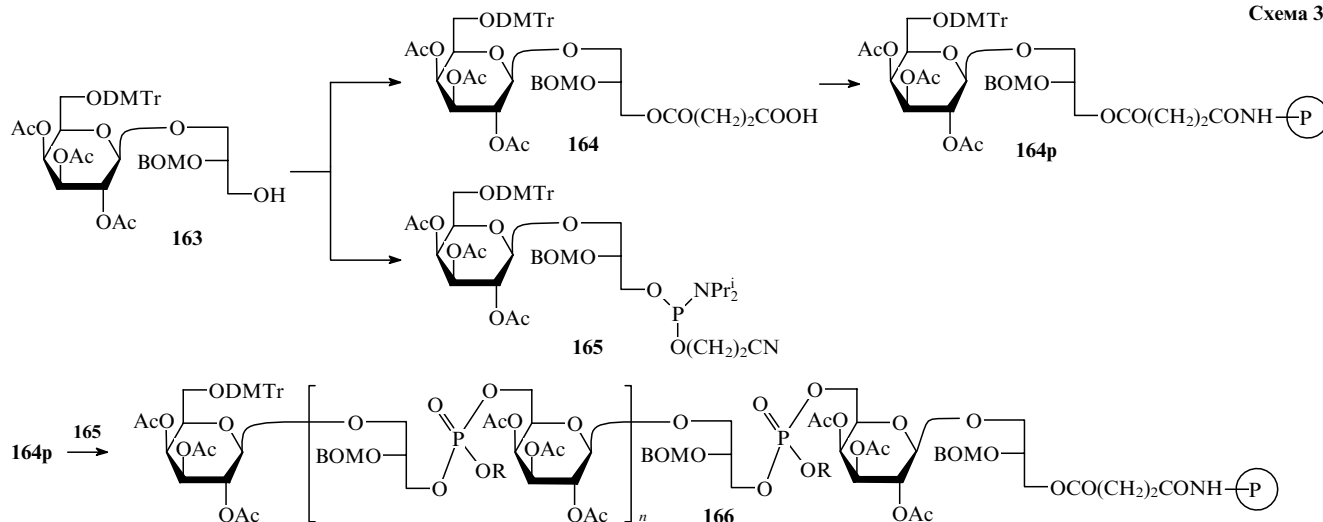
Синтез фосфогликанов в растворе позволяет получать лишь низкомолекулярные соединения, содержащие не более двух-трех повторяющихся звеньев биополимера. По-видимому, для получения высокомолекулярных фрагментов фосфогликанов удобно использовать твердофазный синтез.

К настоящему времени известно несколько примеров такого синтеза.

По существу, синтез фосфогликанов близок к синтезу полинуклеотидов. Его отличия связаны с особенностями строения повторяющегося звена, включающего более или менее сложные углеводные структуры.

Первым примером твердофазного синтеза фосфогликана является, по-видимому, синтез фрагмента теихоевой кислоты из *Bacillus licheniformis*. Этот биополимер состоит из повторяющихся звеньев 1-*O*-(β-D-галактопиранозил)глицерина, которые связаны (6'-3)-фосфодиэфирными связями. Твердофазный синтез тримера повторяющегося звена этого биополимера был осуществлен на модифицированном СКП с использованием фосфорамидитного метода формирования фосфодиэфирной связи (схема 30).⁹⁷ Производное галактопиранозилглицерина **163** — фрагмента повторяющегося звена биополимера, — полученное синтезом в растворе, действием янтарного ангидрида превращали в моноэфир янтарной кислоты **164**, который иммобилизовали на модифицированном СКП. То же производное **163** взаимодействием с $\text{Pr}_2\text{N}^i\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})\text{Cl}$ превращали в (галактозилглицерил)(2-цианэтил)-*N,N*-диизопропиламидофосфит **165**, который использовали затем как фосфорилирующий агент. После этого проводили наращивание олигомерной цепи в автоматическом синтезаторе по хорошо известной методике синтеза олигонуклеотидов, которая включала повторяю-

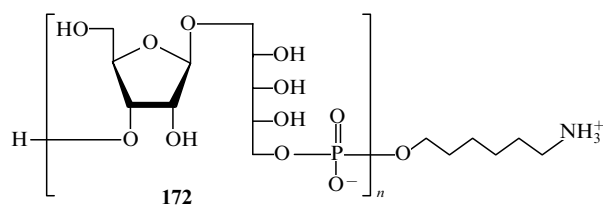
Схема 30



DMTr — диметокситритил; BOM — бензилоксиметил.

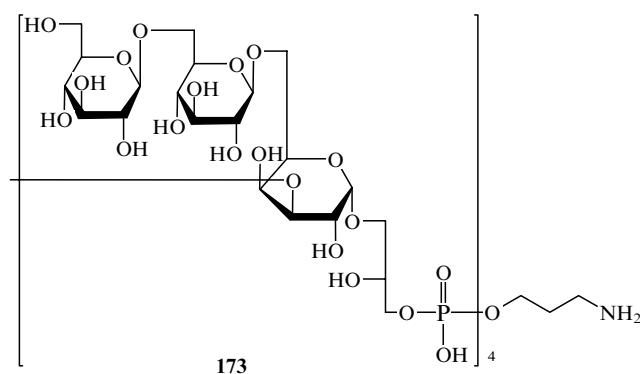
щийся цикл реакций: освобождение первичного гидроксила в остатке галактозы в полимере **164p** отщеплением 6'-диметокситритильной группы, взаимодействие с фосфорамидитом **165** в присутствии 1*H*-тетразола, ацелирование не вступивших в реакцию свободных гидроксильных групп (для исключения их реакций на следующих стадиях) и окисление иодом трехвалентного фосфора в пентавалентный (см. схему 30). Каждый цикл проходил с эффективностью 95%. Полученный продукт **166** ($n = 3$) отщепляли от носителя аммонолизом, одновременно удаляли *O*-ацетильные и цианоэтильные защитные группировки. Структура полученного фрагмента тейхоевой кислоты была подтверждена методами спектроскопии ЯМР ^1H и ФАВ-масс-спектрометрией.

Более сложным оказался синтез фрагмента фосфогликана, капсульного полисахарида *Haemophilus influenza* типа b, возбудителя менингита у детей. Этот синтез (схема 31)⁹⁸ был предпринят для последующего использования фосфогликана в качестве искусственного антигена при создании синтетической вакцины. Он был осуществлен по методике олигонуклеотидного синтеза, в качестве носителя использовали модифицированное СКП. Исходным соединением послужил замещенный рибозилрибит **167**, в котором обработкой Bu_4NF удаляли дисилоксандиильную группировку, после чего первичноспиртовую группу избирательно защищали силированием, а вторичную гидроксильную группу при C(3') превращали в моноэфир янтарной кислоты. Образовавшийся эфир **168** иммобилизовали на СКП и детритилировали с целью получения полимера **169**. Тот же рибозилрибит **167** превращали в 2-цианоэтил-*N,N*-диизопропиламидофосфит **170**, который затем вводили в реакцию с полимером **169**. Реакцию проводили в условиях нуклеотидного синтеза в автоматическом синтезаторе. Указанный цикл операций повторяли требуемое число раз. К полученному таким путем олигомеру **171** ($n = 6$) присоединяли (6-аминогексил)фосфатный спейсер для последующего превращения олигомера в синтетический антиген (за счет связывания его с белком). Продукт реакции снимали с носителя аммонолизом, защитные группы удаляли действием Bu_4NF и гидрогенолизом. Олигомер **172** ($n = 6$) был выделен с общим выходом 24%.



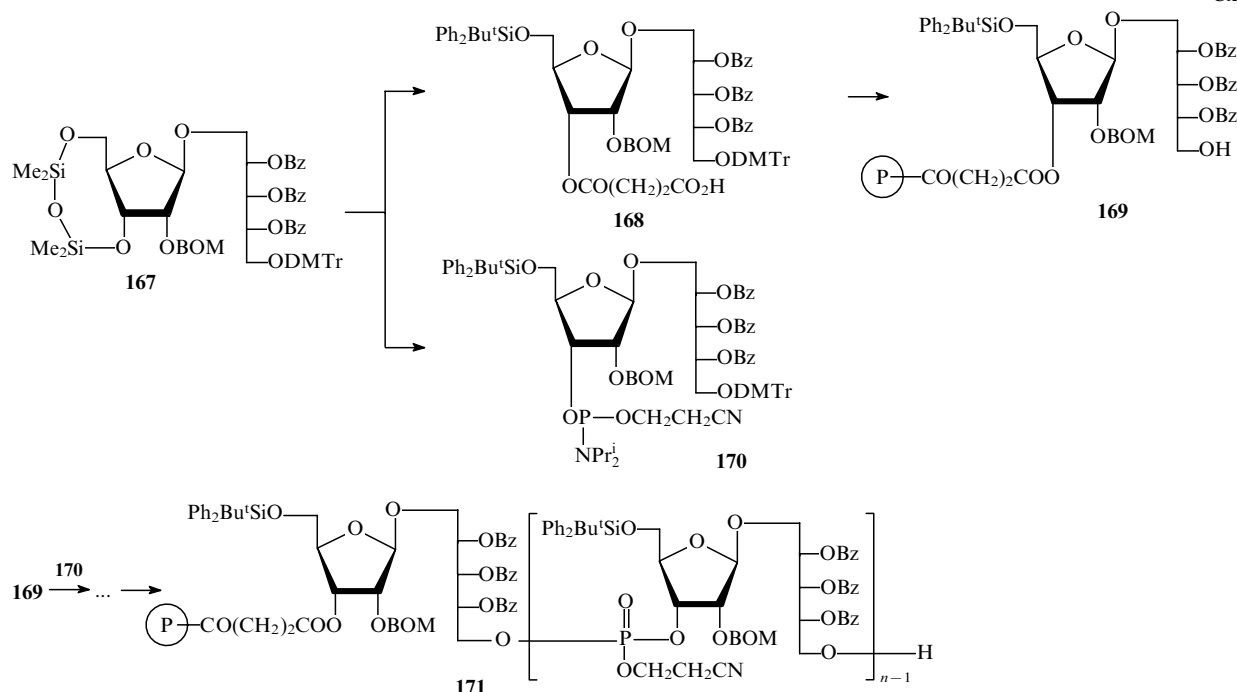
Более эффективным и пригодным для практического применения является синтез фосфогликана, выполненный на растворимом носителе ПЭГА⁹⁹ по аналогичной схеме с использованием *O*-бензильных защитных групп. В этом случае нагрузка полимера была выше, чем в предыдущем (109 ммоль $\cdot \text{г}^{-1}$ вместо 34 ммоль $\cdot \text{г}^{-1}$); высшие олигомеры получили с выходом 35%.

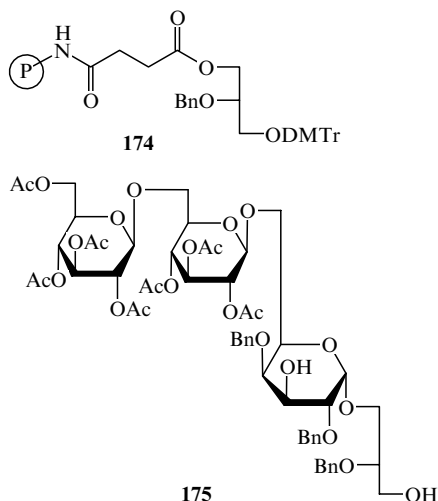
По той же стандартной методике синтезировали¹⁰⁰ фрагмент фосфогликана **173** из *Haemophilus pleuropneumoniae* (серотипа 2) — микроорганизма, вызывающего заболевание у свиней. Фосфогликан **173** построен из повторяющихся звеньев β -D-глюкопиранозил-(1-6)- β -D-глюкопиранозил-(1-6)- α -D-галактопиранозил-(1-3)-глицерина, связанных (1-3')-фосфодиэфирными связями.



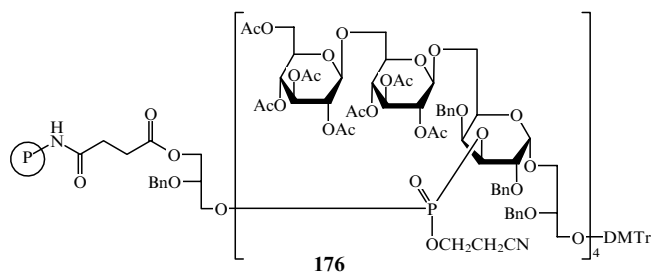
Синтез тетрамера повторяющегося звена¹⁰⁰ осуществляли по схеме, близкой к схемам предыдущих синтезов, с использованием модифицированного аминопропильных группами СКП в качестве нерастворимого носителя и фосфорамидитного метода образования фосфодиэфирной связи.

Схема 31





2-*O*-Бензил-3-*O*-диметокситритилглицерин превращали в моноэфир янтарной кислоты и иммобилизовали на пористом стекле, как в предыдущих случаях. Полученный продукт **174** детритилировали и использовали как первое звено для наращивания цепи. В повторяющемся звене — тригликозилглицерине **175** — первичноспиртовую гидроксильную группу в остатке глицерина защищали в виде диметокситритилового эфира, а гидроксильную группу у атома C(3) остатка галактозы превращали в (2-цианоэтил)-*N,N*-диэтилфосфорамидит и использовали как фосфорилирующий агент в условиях автоматического олигонуклеотидного синтеза. После проведения четырех циклов был получен иммобилизованный тетрамер повторяющегося звена фосфогликана **176**. Его детритилировали и вводили фосфорилированный спейсер. Продукт снимали с носителя аммонолизом, при этом происходило удаление сложноэфирных защитных групп. После гидрогенолиза получили соединение **173**, которое можно применять для создания синтетической вакцины.



Приведенные данные показывают, что твердофазный синтез фосфогликанов типа тейхоевых кислот, используя известные методики нуклеотидного синтеза, достаточно эффективен.

VII. Заключение

Рассмотренные выше примеры твердофазного синтеза соединений углеводного ряда свидетельствуют о том, что пока в этой области достигнуты довольно скромные успехи. Проблемы, возникающие при синтезе углеводных структур в растворе, связанные с полифункциональностью моносахаридов и стерической неоднозначностью формирования гликозидной связи, не исчезают и в случае твердофазного синтеза, что препятствует автоматизации процесса.

Естественно, что «технология» твердофазного синтеза в углеводном ряду нуждается в дальнейшем совершенствовании и процесс этот будет продолжаться. Так, при использовании химических методов построения углеводной цепи желательно стандартизировать процедуру создания активной гликозил-донорной структуры или высвобождения

гидроксильной группы, проводимую после каждой стадии наращивания цепи. Решение этой задачи открыло бы путь к автоматизации процесса.

Один из примеров решения этой проблемы приведен в настоящем обзоре в разделе, посвященном гликальному методу синтеза олигосахаридов. Следует отметить, что наращивать олигосахаридную цепь удобнее от восстанавливающего конца к невосстанавливающему, так как в этом случае перед наращиванием следующего звена на иммобилизованном реагенте необходимо лишь избирательно освободить нужную гидроксильную группу, что сделать легче, чем воссоздать активированный гликозидный центр.

Еще одна проблема, требующая решения, заключается в подборе оптимальных носителей и сочетающихся с ними линкеров. Широкая доступность таких носителей и линкеров сильно упростит синтез и откроет путь к автоматизации процесса.

Уже сейчас очевидно, что твердофазный синтез может быть с успехом использован для получения низших олигосахаридов, но его преимущество перед синтезом в растворе в этом случае незаметно. Однако при переходе к более высокомолекулярным олигосахаридам и гликоконъюгатам преимущества твердофазного синтеза становятся очевидными. Это особенно хорошо видно на примере синтеза гликоконъюгатов — гликопептидов и фосфогликанов (именно этому направлению в последние годы уделяется все большее внимание). Наибольшие успехи достигнуты в тех случаях, когда наращивание углеводной цепи проводилось ферментативным методом. Ферментативное наращивание цепи практически исключает проблему избирательной защиты гидроксильных групп и ее изменения на каждом этапе синтеза.

Значительный интерес представляет возможность модифицирования иммобилизованных моносахаридов. Этому есть несколько примеров.

Особенно серьезные перспективы открываются при использовании твердофазного синтеза в комбинаторной химии — при поиске углеводных структур с оптимальной биологической активностью. Преимущества твердофазного метода для получения «коллекций» близких по структуре многофункциональных олигосахаридных структур, отличающихся огромным разнообразием, проявляются особенно сильно.

Поиск лекарственных препаратов и других соединений со специфической биологической активностью среди углеводсодержащих соединений потребовал быстрого стандартизированного получения большого количества фрагментов биополимеров и их аналогов и выявления среди них наиболее активных. В этой связи понадобилось синтезировать «коллекции» соединений методами комбинаторной химии с тем, чтобы затем их изучить.

Известно, что в основе «комбинаторной химии» лежит принцип одновременного синтеза группы родственных соединений посредством взаимодействия близких по структуре соединений-акцепторов с родственными между собой соединениями-донорами, причем этот принцип может последовательно использоваться на нескольких стадиях многостадийного синтеза.¹⁰¹ Из полученной таким путем «коллекции» соединений отбирают наиболее активные.

Эта стратегия привлекла большое внимание специалистов, работающих в области химии биополимеров, которые для синтеза таких «коллекций» пептидов и олигонуклеотидов широко используют синтез на носителях, при этом отбор активных компонентов часто проводится без снятия их с носителя. Преимущества этого подхода для поиска биологически активных олигосахаридов особенно заметны, если учесть огромное структурное разнообразие последних, реализующееся благодаря полифункциональности входящих в них моносахаридов. В работе¹⁰² рассмотрена возможность использования твердофазного синтеза для получения

«коллекций» олигосахаридов. В качестве примера можно указать на синтез «коллекции» (содержащей ~1300 соединений) производных дисахарида β -D-галактопиранозил-(1-3)-2-дезоксид-2-N-ациламиногалактопиранозид, состоящей из ди- и трисахаридов, отличающихся природой и последовательностью моносахаридных звеньев, характером межмолекулярных гликозидных связей и заместителями у гидроксильных групп и аминогруппы.¹⁰³ В качестве носителя использовали полимер типа «Тентагель», а в качестве гликозил-доноров — гликозил-сульфоксиды. Полученная «коллекция» олигосахаридов (закрепленных на носителе) была испытана на специфичность углевод-белкового взаимодействия. Для отбора наиболее активных соединений использовали взаимодействие с одним из лектинов.

В настоящее время принципы комбинаторной химии, в том числе и в области химии углеводов, все чаще применяются крупными коммерческими фирмами.¹⁰⁴

В заключение упомянем опубликованный в 1999 г. обзор,¹⁰⁵ посвященный синтезу олигосахаридов на носителях, появление которого свидетельствует о том, что интерес к этому методу не ослабевает.

Литература

1. R.B.Merrifield. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149 (1963)
2. V.Varki. *Glycobiology*, **3**, 97 (1993)
3. R.A.Dwek. *Chem. Rev.*, **96**, 683 (1996)
4. J.Frechet, C.Schuerch. *Carbohydr. Res.*, **22**, 399 (1972)
5. R.D.Guthrie, A.D.Jenkins, G.A.F.Roberts. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2414 (1973)
6. D.Obrecht, J.Villalgorido. *Solid Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small Molecular Weight Compounds Library*. Pergamon Press, Oxford, 1998. P. 24
7. K.C.Nicolaou, N.Winssinger, J.Pastor, F.DeRoose. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 449 (1997)
8. S.-H. Lee Chiu, L.Andersen. *Carbohydr. Res.*, **50**, 227 (1976)
9. J.Hunt, W.Roush. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 9998 (1996)
10. J.T.Randolph, K.F.McClure, S.J.Danishefsky. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5712 (1995)
11. J.Rademann, R.Schmidt. *J. Org. Chem.*, **62**, 3650 (1997)
12. J.Rademann, A.Geyer, R.R.Schmidt. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **37**, 1241 (1998)
13. U.Zehavi, S.Sadeh, M.Herchman. *Carbohydr. Res.*, **124**, 23 (1983)
14. M.Schuster, P.Wang, J.C.Paulson, C.-H.Wong. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1135 (1994)
15. R.L.Halcomb, H.Huang, Ch.-H.Wong. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 11315 (1994)
16. R.Eby, C.Schuerch. *Carbohydr. Res.*, **39**, 151 (1975)
17. S.P.Douglas, D.M.Whitefield, J.J.Krepinsky. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2116 (1995)
18. M.Meldal, F.-I.Auzanneau, O.Hindsgaul, M.M.Palcic. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1849 (1994)
19. M.Adinolfi, G.Barone, L.DeNapoli, A.Iadonisi, G.Piccialli. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 5007 (1996)
20. N.K.Kochetkov. In *Studies of Natural Products Chemistry. Vol. 14*. (Ed. Atta-ur Rachman). Elsevier, Amsterdam, 1994. P. 201
21. K.Toshima, K.Tatsuta. *Chem. Rev.*, **93**, 1503 (1993)
22. N.K.Kochetkov, A.F.Bochkov. In *Recent Developments of Chemistry of Natural Carbon Compounds. Vol. 4*. Akademiai Kiado, Budapest, 1971. P. 77
23. R.Eby, C.Schuerch. *Carbohydr. Res.*, **34**, 79 (1974)
24. Lin Yan, C.M.Taylor, R.Goodnow Jr., D.Kahne. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 6953 (1994)
25. R.Schmidt, W.Kinzy. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **50**, 21 (1994)
26. S.J.Danishefsky, K.F.McClure, J.T.Randolph, R.B.Ruggeri. *Science*, **260**, 1307 (1993)
27. H.J.M.Giisen, L.Qiao, W.Fitz, C.-H.Wong. *Chem. Rev.*, **96**, 443 (1996)
28. J.M.Frechet, C.Schuerch. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 492 (1971)
29. G.Excoffier, D.Gagnaire, M.Vignon. *Carbohydr. Res.*, **51**, 280 (1976)
30. S.Douglas, D.Whitefield, J.J.Krepinsky. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 5095 (1991)
31. D.M.Whitefield, S.P.Douglas, J.J.Krepinsky. *Tetrahedron Lett.*, **33**, 6795 (1992)
32. U.Zehavi, A.Patchornik. *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 5673 (1973)
33. U.Zehavi, M.Herchman. *Carbohydr. Res.*, **128**, 160 (1984)
34. U.Zehavi, M.Herchman, S.Köpper. *Carbohydr. Res.*, **228**, 255 (1992)
35. T.Wiemann, N.Taubken, U.Zehavi, J.Thiem. *Carbohydr. Res.*, **257**, C1 (1994)
36. S.-I.Nishimura, K.Matsuoka, Y.C.Lee. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 5657 (1994)
37. N.K.Kochetkov. *Tetrahedron*, **41**, 2389 (1987)
38. Н.К.Кочетков. *Синтез полисахаридов*. Наука, Москва, 1994
39. J.Rademann, R.Schmidt. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 3989 (1996)
40. A.Heckel, E.Mross, K.-H.Yung, J.Rademann, R.R.Schmidt. *Synlett*, 171 (1998)
41. S.Mehta, D.Whitefield. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 5907 (1998)
42. Y.Ito, O.Kanie, T.Ogawa. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 2510 (1996)
43. K.Suzuki, H.Maeta, T.Matsumoto. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 4853 (1989)
44. G.H.Veeneman, S.Notermans, R.M.J.Liskamp, G.A.van der Marel, J.H.van Boom. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 6695 (1987)
45. R.Madsen, B.Fraser-Reid. In *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis*. (Eds R.A.O'Neill, Sh.H.Kan). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1996. Ch. 7
46. R.Rodebaugh, S.Joshi, B.Fraser-Reid, H.M.Geysen. *J. Org. Chem.*, **62**, 5660 (1997)
47. J.T.Randolph, S.J.Danishefsky. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **33**, 1470 (1994)
48. D.A.Griffith, S.J.Danishefsky. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 5811 (1990)
49. S.J.Danishefsky, K.Koseki, D.A.Griffith, J.J.Gervay, M.E.Peterson, F.McDonald, T.Oriyama. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 8331 (1992)
50. R.Verdun, P.A.M.van der Klein, M.Douwes, G.A.van der Marel, J.H.van Boom. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **112**, 464 (1993)
51. N.J.Maeji, Y.Inoue, R.Chujo. *Carbohydr. Res.*, **146**, 174 (1986)
52. H.G.Garg, T.Hasenkamp, H.Paulsen. *Carbohydr. Res.*, **151**, 225 (1986)
53. M.Hollósi, E.Kollát, I.Laszko, K.F.Medzihradzky, J.Thurin, L.Otvös. *Tetrahedron Lett.*, **32**, 1531 (1991)
54. S.Nakabayashi, C.D.Warren, R.W.Jeanloz. *Carbohydr. Res.*, **150**, C7 (1986)
55. D.Vetter, D.Tumelty, S.K.Singh, M.A.Gallop. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34**, 60 (1995)
56. S.Lavielle, N.C.Ling, R.Saltman, R.C.Guillemin. *Carbohydr. Res.*, **89**, 229 (1981)
57. J.Jezek, R.Straka, V.Krchinák, M.Ryba, J.Rotta, P.Mayer, M.Zaoral. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **52**, 1609 (1987)
58. H.Paulsen, G.Merz, U.Weichert. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **27**, 1365 (1988)
59. P.Atherton, R.Sheppard. *Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, 1989
60. B.Lüning, T.Norberg, J.Teijbrant. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1267 (1989)
61. H.Rink. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 3787 (1987)
62. R.Polt, L.Szabo, J.Treiberg, Y.Li, V.J.Hruby. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10249 (1992)
63. H.Kunz, B.Dombo. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **27**, 711 (1988)
64. O.Seitz, H.Kunz. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34**, 803 (1995)
65. A.C.Bauman, J.S.Broderick, R.M.Dacus IV, D.A.Grover, L.S.Trzupek. *Tetrahedron Lett.*, **34**, 7019 (1993)
66. M.Meldal, K.J.Jensen. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 483 (1990)
67. A.M.Jansson, M.Meldal, K.Bock. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 6991 (1990)
68. A.M.Jansson, M.Meldal, K.Bock. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1699 (1992)
69. K.B.Reimer, M.Meldal, S.Kusumoto, K.Fukase, K.Bock. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 925 (1993)
70. J.Montreuil. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **37**, 137 (1980)
71. В.А.Деревицкая. *Биопог. химия*, **9**, 581 (1983); **14**, 1605 (1988)
72. T.Bielfeldt, S.Peters, M.Meldal, K.Bock, H.Paulsen. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **31**, 857 (1992)

73. H.Paulsen, T.Bielfeldt, S.Peters, M.Meldal, K.Bock. *Liebigs Ann. Chem.*, 369 (1994)
74. H.Paulsen, T.Bielfeldt, S.Peters, M.Meldal, K.Bock. *Liebigs Ann. Chem.*, 381 (1994)
75. J.Rademann, R.Schmidt. *Carbohydr. Res.*, **269**, 217 (1995)
76. S.Rio-Anneheim, H.Paulsen, M.Meldal, K.Bock. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1071 (1995)
77. B.Liebe, H.Kunz. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **36**, 618 (1997)
78. Yo.Nakahara, Yu.Nakahara, T.Ogawa. *Carbohydr. Res.*, **292**, 71 (1996)
79. Yo.Nakahara, Yu.Nakahara, Y.Ito, T.Ogawa. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 7211 (1997)
80. E.Meinjohns, A.Vargas-Berenguel, M.Meldal, H.Paulsen, K.Bock. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2165 (1995)
81. A.M.Jansson, K.J.Jensen, M.Meldal, J.Lomako, W.M.Lomako, C.E.Olsen, K.Bock. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1001 (1996)
82. S.Peters, T.L.Lowary, O.Hindsgaul, M.Meldal, K.Bock. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3017 (1995)
83. H.Hietter, M.Schultz, H.Kunz. *Synlett*, 1219 (1995)
84. M.K.Christensen, M.Meldal, K.Bock, H.Cordes, S.Mouritsen, H.Elsner. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1299 (1994)
85. S.Lavielle, N.C.Ling, R.C.Guillemin. *Carbohydr. Res.*, **89**, 221 (1981)
86. M.Meldal, K.Bock. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 6987 (1990)
87. L.L.Likhoshershtov, O.S.Novikova, V.A.Derevitskaya, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **146**, C1 (1986)
88. L.Otvos Jr., L.Urge, M.Hollosi, K.Wroblewski, G.Graczyk, G.D.Fasman, J.Thurin. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 5889 (1990)
89. Z.-W.Guo, Yu.Nakahara, Jo.Nakahara, T.Ogawa. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **36**, 1464 (1997)
90. M.Matsuo, Yu.Nakahara, Y.Ito, T.Nakada, Yo.Nakahara, T.Ogawa. *Bioorg. Med. Chem.*, **3**, 1455 (1995)
91. H.Paulsen, A.Schleyer, N.Mathieux, M.Meldal, K.Bock. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 281 (1997)
92. O.Seitz, C.-H.Wong. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8766 (1997)
93. S.Nishimura, K.B.Lee, K.Matsuoka, Y.C.Lee. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**, 249 (1994)
94. N.K.Kochetkov. *Pure Appl. Chem.*, **56**, 923 (1984)
95. C.Unverzagt, S.Kelm, J.C.Paulson. *Carbohydr. Res.*, **251**, 285 (1994)
96. U.Zehavi, M.Herchman, R.Schmidt, Th.Bar. *Glycoconjugate J.*, **7**, 229 (1990)
97. P.Westerduin, G.H.Veeneman, Y.Pennings, G.A.van der Marel, J.H.van Boom. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1557 (1987)
98. C.H.Elle, H.J.Muntendam, H.van der Elst, G.A.van der Marel, P.Hoogerhout, J.H.van Boom. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **108**, 219 (1989)
99. A.A.Kandil, N.Chang, P.Chong, M.Klein. *Synlett*, 555 (1992)
100. G.H.Veeneman, H.J.Brugge, H.van der Elst, J.H.van Boom. *Carbohydr. Res.*, **195**, C1 (1990)
101. G.Lowe. *Chem. Soc. Rev.*, 309 (1995)
102. T.Murata, T.Usui. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1059 (1997)
103. R.Liang, L.Yan, J.Loebach, M.Ge, Y.Uozumi, K.Sekanina, N.Horan, J.Gildersleeve, C.Thompson, A.Smith, K.Biswas, W.C.Still, D.Kahne. *Science*, **274**, 1520 (1996)
104. *Chem. Ind. News*, **76**, 14 (1998)
105. H.M.I.Osborn, T.H.Khan. *Tetrahedron*, **55**, 1807 (1999)

SOLID-PHASE SYNTHESIS OF OLIGOSACCHARIDES AND GLYCOCONJUGATES

N.K.Kochetkov

*N.D.Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences
47, Leninsky prosp., 117913 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)135-5328*

The use of polymeric substrates for targeted regiospecific assembling of oligosaccharide, glycoconjugate and phosphoglycan chains is considered. It is shown that, although the method for the synthesis of oligosaccharides on support still cannot compete with the synthesis in solution, it, nevertheless, has advantages in some cases. Particular examples of successful use of solid-phase synthesis of complex oligosaccharides and glycoconjugates are given. Attention is concentrated on the choice of optimal substrate, linker and glycosylation method.

Bibliography — 105 references.

Received 28th December 1999