



ПОЛУЧЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ГЛИКОЛИПИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТЕТРАСАХАРИД А (ТИП 2)¹

© 2023 г. Д. О. Петракова*, М. С. Савченко*, И. С. Попова*, А. Б. Тузиков*, А. С. Парамонов*,
А. О. Чижев**, Н. В. Бовин*, И. М. Рыжов*,#

*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**ФГБУН “Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского” РАН,
Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 12.12.2022 г.

Принята к публикации 14.12.2022 г.

Гликолипиды — компоненты клеточной мембраны, способные к транспорту как из нее, так и в обратном направлении — из межклеточного пространства в мембрану. Последнее открывает возможность изучать функционирование гликолипидов путем их встраивания в мембрану клетки. На практике для такой цели намного удобнее использовать не природные гликолипиды, выделение которых представляет собой отдельную задачу, а их синтетические аналоги, т.к. можно варьировать их свойства, модифицируя структуру, а также вводить в их состав другие биоактивные компоненты, помимо гликанов. В данной работе описан синтез восьми синтетических аналогов гликолипидов, содержащих одну и ту же углеводную часть — тетрасахарид А (тип 2), но отличающихся строением липидной части, а также синтетических аналогов гликолипидов, несущих несколько одинаковых углеводных фрагментов. Полученная серия синтетических аналогов гликолипидов открывает возможность исследовать презентацию гликанового антигена в его узнавании антителами в условиях реального микроокружения (гликокаликса) живой клетки.

Ключевые слова: гликолипид, гликокластер, диолеилфосфатидилэтаноламин, дистеароилфосфатидилэтаноламин, дифитаноилфосфатидилэтаноламин, холестерин

DOI: 10.31857/S013234232304036X, **EDN:** ODKLJF

ВВЕДЕНИЕ

Гликолипиды (ГЛ) входят в состав плазматической мембраны, их липидный фрагмент заякоривается в липидном бислое мембраны, а гликан экспонируется наружу во внеклеточное пространство. Гликаны, входящие в состав гликолипидов, выступают частью гликокаликса клетки [1]. Гликолипиды могут покидать мембрану клетки, ранее было показано, что такой перенос происходит в основном по везикулярному механизму (отпочковывание везикул, содержащих гликолипид, от мембраны) [2]. Возможен и обратный процесс, в результате которого клетки обмениваются гликолипидами [3]. Встраивание ГЛ, при-

родных или синтетических, в мембрану открывает широкие возможности для модификации клеточного гликоландшафта [4].

Один из основных классов гликолипидов в организме человека — гликосфинголипиды (гликозилцерамиды) [5]. Размер их углеводной части может варьироваться от моносахаридов до больших разветвленных гликанов, включающих до 40 моносахаридных звеньев [6, 7]. Липидная часть гликосфинголипидов представляет собой аминокспирт сфингозин, в котором к одной из гидроксигрупп гликозидной связью присоединен гликан, а аминоксигруппа ацилирована остатком какой-либо жирной кислоты.

Ввиду значительного разнообразия (как по углеводной части, так и по жирной кислоте) гликосфинголипидов, а также, как правило, низкого содержания в плазматической мембране, выделение таких соединений в индивидуальном виде в значительных количествах крайне затруднительно. Химический синтез полностью природных гликосфинголипидов в отдельных случаях возможен [8], но практически нереален, если необходима серия таких молекул. Более того, гликосфин-

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Вадима Тихоновича Иванова.

Сокращения: Ad — адипиноил; Av — аминвалериановая кислота; Chol — холестерин; CMG — *N*-карбоксиметилглицин; DOPE — диолеилфосфатидилэтаноламин; DSPE — дистеароилфосфатидилэтаноламин; DPE — дифитаноилфосфатидилэтаноламин; ГЛ — гликолипид; нГЛ — неогликолипид.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-03-00; эл. почта: imryzhov@gmail.com).

голипиды часто плохо растворимы в водной среде (совместимой с живыми клетками), что затрудняет их использование для модификации клеток.

Для того чтобы обойти описанные выше проблемы, были предложены синтетические аналоги гликолипидов (нГЛ, неогликолипиды; иногда их называют FSL [9]), которые содержат такую же или аналогичную углеводную часть, а вот липидная часть и связка между гликаном и липидом (т.е. спейсер) варьируются [10]. Такие модификации позволяют значительно упростить синтез гликолипидов за счет применения известных и эффективных методов конъюгации, а также улучшить физико-химические свойства получаемых молекул, например, растворимость в водных средах за счет введения в их структуру гидрофильных фрагментов [4, 9, 11].

Одним из семейств гликанов, на основе которых в лаборатории углеводов ИБХ РАН были синтезированы нГЛ, выступают антигены системы групп крови АВ0 [12], в частности тетрасахарид А (тип 2) $\text{GalNAc}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta$, представленный на эритроцитах группы крови А [13] и детерминирующий принадлежность человека к этой группе крови. Первыми нГЛ, в состав которых входит этот тетрасахарид, выступают производные (1) [14] и (2) [15] (рис. 1). Оба включают 3-аминопропилгликозид тетрасахарида А (тип 2) в качестве гликановой компоненты, диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE) в качестве липидной компоненты, но отличаются мостиком (спейсером), соединяющим эти две части.

В соединении (1) для связи гликановой и липидной частей используется остаток адипиновой кислоты (короткий Ad-спейсер), а в соединении (2) – олигопептидный спейсер, построенный из глицина и *N*-карбоксиметилглицина (так называемый CMG(2)-спейсер) [4]. Второй вариант спейсера обладал рядом преимуществ по сравнению с первым: помимо увеличения растворимости в водной среде, CMG(2)-спейсер улучшал доступность гликана для связывания с антителами, отдаляя его от экранирующего действия молекул, локализованных непосредственно на клеточной мембране [14]. Поэтому именно CMG(2)-нГЛ (2) оказался наиболее востребован в практическом применении: он использовался для определения точной углеводной специфичности антител, применяемых в гематологической практике для типирования групп крови [15], а также на его основе был разработан метод определения анти-А-антител перед АВ0-несовместимыми операциями по пересадке органов [16].

Цель данного исследования – синтез серии новых неогликолипидов, отличающихся липидной частью и спейсерной группой. Как и производные (1) и (2), все они содержат тетрасахарид А (тип 2) в качестве углеводной части, что позволило использовать всю серию нГЛ для изучения анти-А-антител. Работа выполнена в рамках дальнейшего развития технологии получения и применения нГЛ в нашей лаборатории.

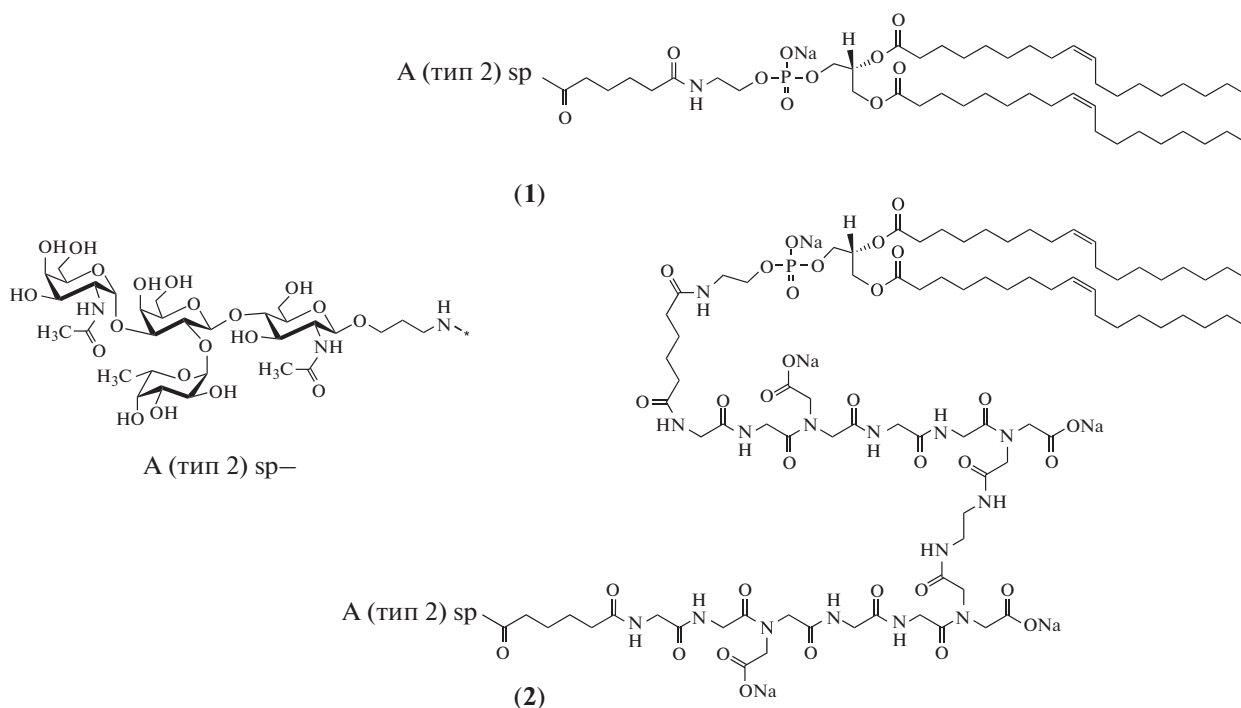


Рис. 1. Ранее синтезированные нГЛ (1) и (2) с тетрасахаридом А (тип 2) (углеводная часть) и DOPE (липидная часть). В соединении (1) использован короткий адипиновый спейсер, в соединении (2) – длинный CMG(2)-спейсер.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа посвящена получению серии новых нГЛ, имеющих общую углеводную часть — тетрасахарид А (тип 2). Проведенные структурные изменения по сравнению с двумя ранее полученными и широко используемыми неогликолипидами (1) и (2) (рис. 1) можно разделить на два типа: 1) синтез мультивалентных нГЛ с гликокластерами на основе аспарагиновой кислоты, несущими несколько остатков А (тип 2); 2) модификация липидной части — синтез нГЛ с диацилфосфатидилэтаноламинами, включающими жирные кислоты, отличные от олеиновой, а также синтез нГЛ с холестерином в качестве липидной части.

Структуру целевых неогликолипидов и промежуточных соединений подтверждали методами ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Получение кластерных нГЛ на основе аспарагиновой кислоты, несущих два, три и четыре остатка тетрасахарида А (тип 2). Поскольку гликаны природных гликофинголипидов нередко представляют собой разветвленные остатки, несущие два и более одинаковых антигенных гликана, мы синтезировали их аналоги, содержащие сразу несколько фрагментов тетрасахарида А (тип 2), т.е. мультивалентные нГЛ. Для получения таких нГЛ необходимо модифицировать спейсерную часть молекулы-предшественника так, чтобы она содержала сразу несколько потенциальных точек присоединения углеводных фрагментов (например, карбоксильные группы для конъюгации с аминопропилгликозидами) и одну потенциальную (ортогональную группам для присоединения гликанов) точку соединения с липидной частью (например, аминогруппу). Один из способов такого разветвления — использование аспарагиновой кислоты (содержит две карбоксильные и одну аминогруппу), а также дипептида и трипептида на ее основе (содержат три и четыре свободные карбоксильные группы соответственно и всегда одну аминогруппу).

В качестве исходных соединений для получения мультивалентных нГЛ использовали производные аспарагиновой кислоты [17] (3–5) (рис. 2), в которых амин был защищен бензилок-

сикарбонильной (*Z*) защитной группой. Конъюгация этих производных с 3-аминопропилгликозидом тетрасахарида А (тип 2) (6) (рис. 2) в присутствии дициклогексилкарбодиимида (DCC) и 1-гидроксibenзотриазола (HOBT) приводила к получению соответствующих гликокластеров с двумя (7), тремя (8) и четырьмя (9) остатками тетрасахарида А (тип 2) с выходами 94, 80 и 41% соответственно. На рис. 3 приведены формулы гликокластеров и целевых нГЛ, а на рис. 4 — схема получения целевых нГЛ на примере гликокластера (8) с тремя остатками тетрасахарида А (тип 2). Выделение продуктов проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле с последующей гель-хроматографией.

Полученные гликокластеры (7–9) далее подвергали гидрогенолизу для деблокирования аминогруппы удалением *Z*-защиты (рис. 4, показано на примере получения амина (11)). Соответствующие амины (10–12) (рис. 3) выделяли с выходами 84, 87 и 65% соответственно.

Целевые нГЛ, содержащие синтезированные гликокластеры, получали конъюгацией аминов (10–12) с активированным эфиром (16) [4] в смеси CH_2Cl_2 –DMF (1 : 1) в присутствии Et_3N (рис. 4, показано на примере получения нГЛ (14)) и выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле с последующей гель-хроматографией. Выходы производных (13–15) составили 64, 67 и 55% соответственно.

Получение нГЛ с DSPE и DPyPE в качестве липидной части. Липидной частью большинства нГЛ, синтезированных нами ранее, выступает диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE) [9], который позволяет проводить встраивание нГЛ в клетку эффективно и дозируемо. Чтобы изучить зависимость топологии встраивания (в какой именно участок плазматической мембраны оно происходит), легкость выхода встроенных нГЛ из клетки в составе микровезикул и некоторые другие факторы, были синтезированы нГЛ с другими липидными фрагментами, а именно диацилфосфатидилэтаноламины: дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE) и дифитаноилфосфатидилэтаноламин (DPyPE), а также холестерином. DSPE содержит два остатка стеариновой кислоты —

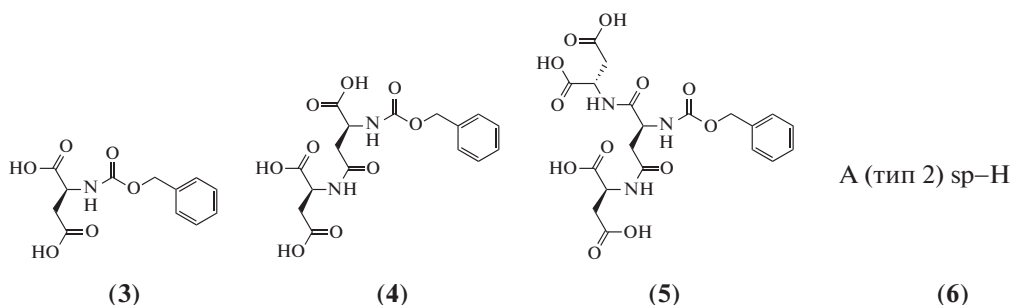
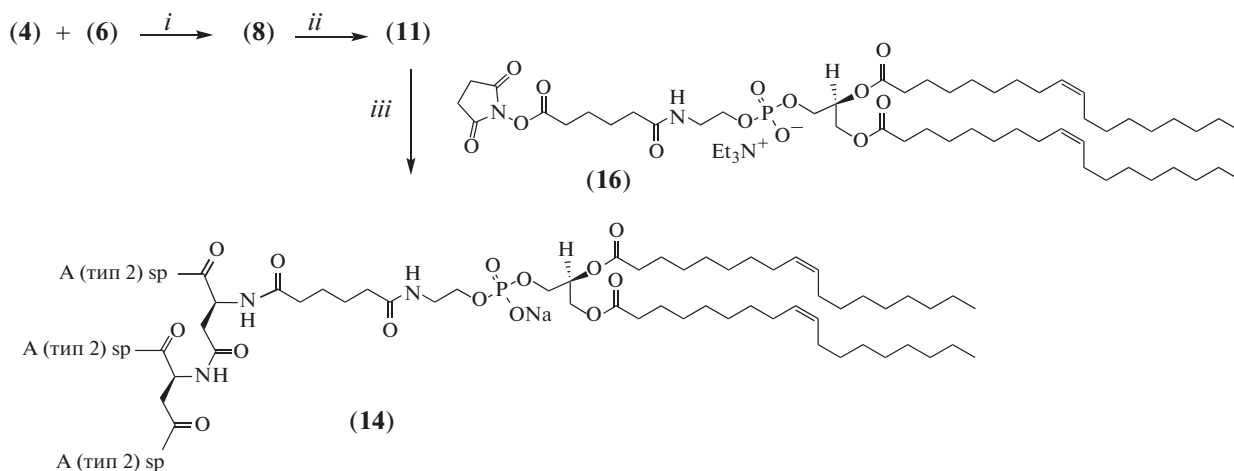
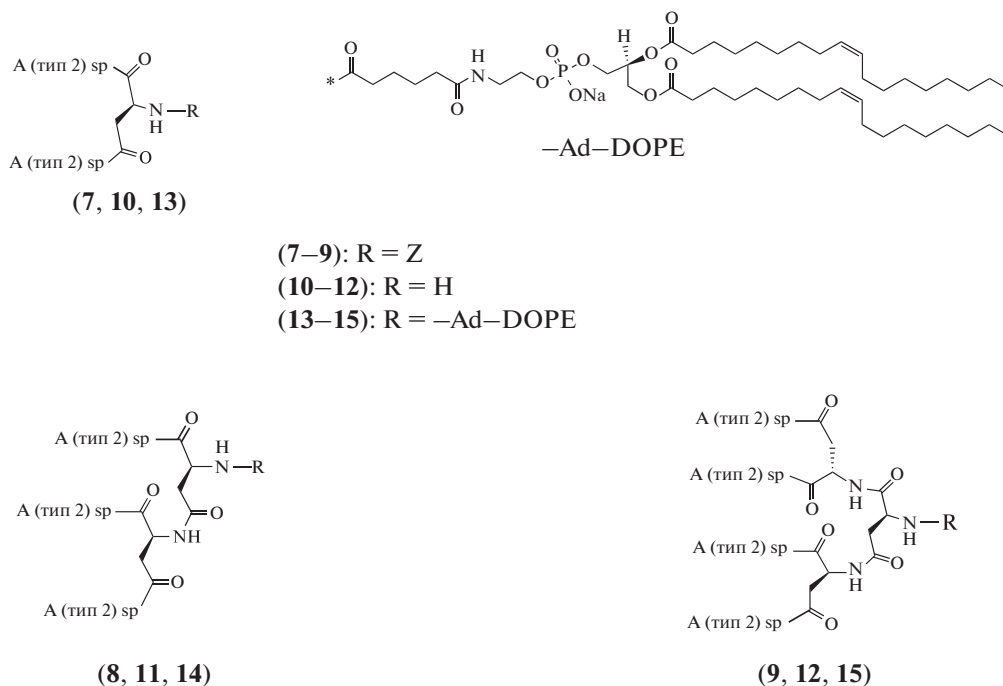


Рис. 2. Исходные соединения для получения гликокластеров: производные аспарагиновой (3), диаспарагиновой (4), триаспарагиновой кислоты (5) и 3-аминопропилгликозид тетрасахарида А (тип 2) (6).



насыщенного аналога олеиновой кислоты. В состав DРyPE входят остатки фитиновой кислоты — насыщенной жирной кислоты, основная цепь которой имеет четыре дополнительные метильные группы, равномерно распределенные по длине молекулы. Холестерин — один из компонентов клеточной мембраны. За счет наличия гидрофобного углеводородного остова он способен встраиваться в мембранный бислой [18, 19], что дает возможность использовать его в качестве липидной компоненты нГЛ.

Из-за наличия двух остатков насыщенной жирной кислоты DSPE, в отличие от DOPE, плохо растворяется в полярных органических раство-

рителях или смесях, содержащих такие растворители. Поэтому для получения производного **(19)** (рис. 5) была выбрана синтетическая схема, в которой DSPE **(18)** вводили на последней стадии, конъюгируя с активированным эфиром **(17)**, уже содержащим тетрасахарид А (тип 2) и адипиновый спейсер, как было описано ранее для синтеза нГЛ **(1)** [14]. В данном случае в качестве растворителя вместо смеси DMF–CH₂Cl₂ (1 : 1) использовали тройную смесь DMF–CH₂Cl₂–CH₃CN (1 : 1 : 1) для увеличения растворимости DSPE. Целевой продукт был выделен методом колоночной хроматографии на силикагеле с выходом 75%.

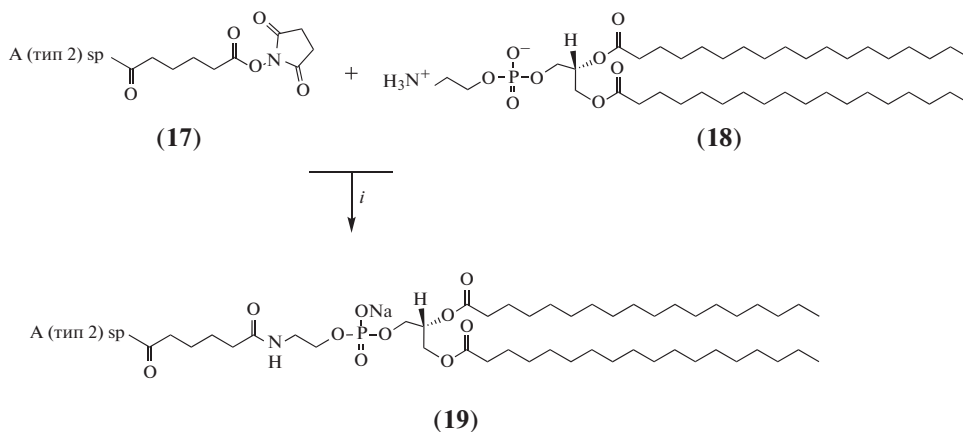


Рис. 5. Получение нГЛ (19). Реагенты и условия: *i* — а — DMF/CH₂Cl₂, Et₃N, б — NaHCO₃ водн., 75%.

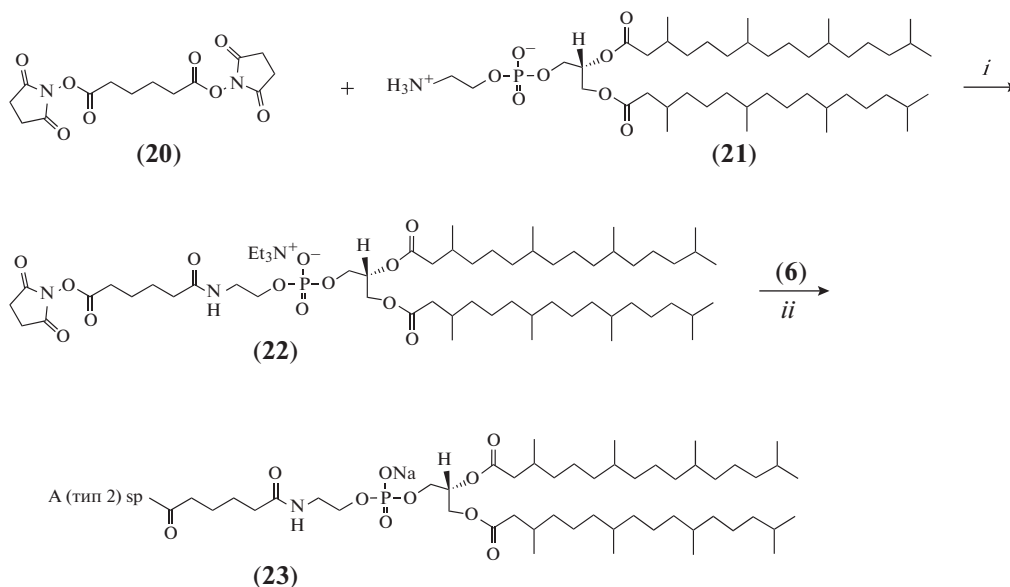


Рис. 6. Получение нГЛ (23). Реагенты и условия: *i* — DMF/CHCl₃, Et₃N; *ii* — а — DMSO/CH₂Cl₂, Et₃N, б — NaHCO₃ водн., 54%.

В отличие от DSPE, амин DPyPE (21) хорошо растворим в смесях DMSO (или DMF) с CHCl₃ (или CH₂Cl₂). Поэтому для получения производного (24) применяли подход, отличный от получения соединения (19): сначала DPyPE (21) обрабатывали значительным (10 экв.) избытком дисукцинимидного эфира адипиновой кислоты Ad(ONSu)₂ (20), чтобы получить активированный эфир (22), который выделяли гель-хроматографией с выходом 95% (рис. 6). Избыток соединения (20) был необходим для предотвращения реакции амина (21) по обоим активированным карбоксильным группам в соединении (20), т.е. образования димера DPyPE-Ad-DPyPE. Активированным эфиром (22) ацилировали аминогруппу 3-аминопропилгликозида (6). Неогликолипид (23) выделяли методом колоночной хроматогра-

фии на силикагеле и гель-хроматографией с выходом 54%.

Получение нГЛ с холестерином в качестве липидной части. В рамках данного исследования мы синтезировали три неогликолипида на основе холестерина. В наиболее простом из них, производном (25), тетрасахарид присоединен непосредственно к гидроксигруппе холестерина через карбамильную связь, что имитирует часто встречающуюся для природных ГСЛ ситуацию максимально тесного приближения гликановой части ГСЛ к плазматической мембране. Его получали конъюгацией производного (6) с хлорформиатом холестерина (24) в смеси DMF—CH₂Cl₂ в присутствии Et₃N и выделяли колоночной хроматографией на силикагеле с выходом 95% (рис. 7).

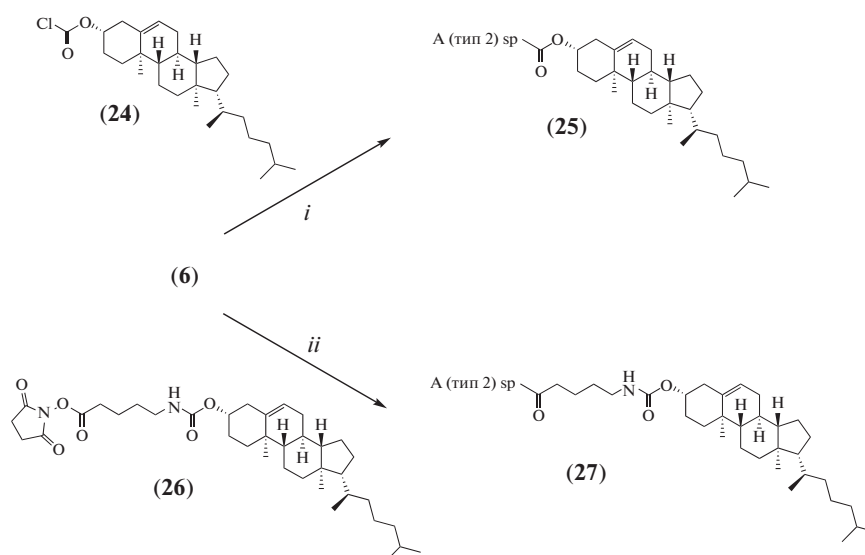


Рис. 7. Синтез нГЛ (25) и (27). Реагенты и условия: *i* – DMF/CH₂Cl₂, Et₃N, 95%, *ii* – DMF, Et₃N, 71%.

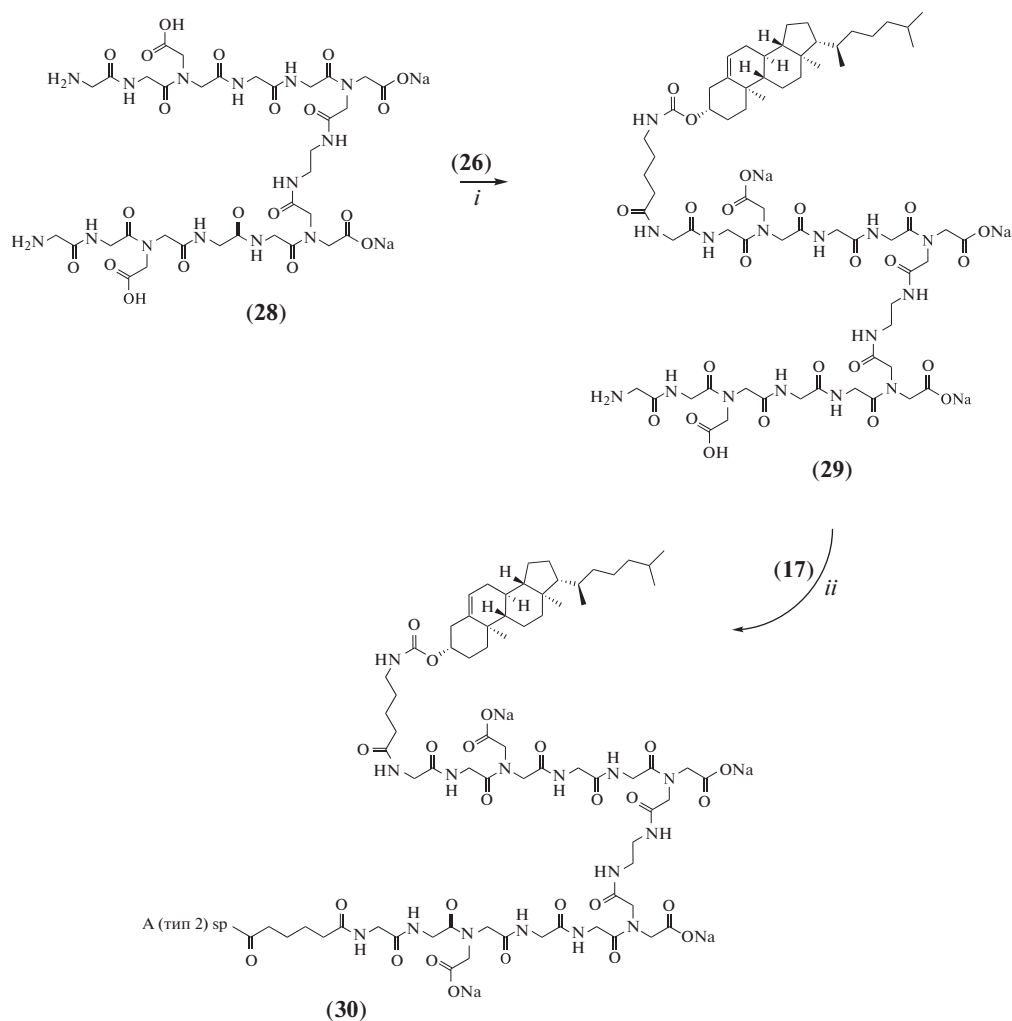


Рис. 8. Синтез нГЛ (30). Реагенты и условия: *i* – эфир (26) в DMF/CHCl₃, диамин (28) в H₂O/*i*-PrOH, Et₃N, 41%; *ii* – а – DMSO, Et₃N, б – NaHCO₃ водн., 53%.

Аналогично был получен неогликолипид (27) с короткой спейсерной группой (аминовалериановая кислота, Av) между гликаном и холестерином. Данный нГЛ был получен конъюгацией аминопропилгликозида (6) с активированным эфиром (26) [20], включающим аминовалериановую кислоту и присоединенный по ее аминогруппе холестерин, в ДМФА в присутствии Et_3N (рис. 7). Выделение неогликолипида (27) осуществляли гель-хроматографией, выход составил 71%.

Также был получен нГЛ (30), в котором тот же тетрасахарид с холестерином связывал олигопептидный CMG(2)-спейсер [4]. Синтез этого неогликолипида осуществляли в два этапа (рис. 8). Сначала активированный эфир (26) вводили в реакцию с CMG(2) диамином (28). Диамин (28) использовали в значительном избытке (4 экв.) для того, чтобы конденсация эфира (26) протекала преимущественно с одной из двух аминогрупп в диамине (28) (и минимизировалось образование димера Chol-Av-CMG-Av-Chol). В качестве основания в реакционную смесь добавляли водный раствор NaHCO_3 . Продукт (29) выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле и гель-хроматографии с выходом 41%, после чего вводили в реакцию с активированным эфиром тетрасахарида (17). Реакцию проводили в DMSO в присутствии Et_3N , целевой нГЛ (30) был выделен гель-хроматографией с выходом 53%.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Тетрасахарид А (тип 2) (6) [13, 21], его активированный эфир (17) [14], активированный эфир (16) [4], активированный эфир (26) [20] и CMG(2)-диамин (28) [4] были получены в лаборатории углеводов ИБХ РАН по опубликованным методикам. Аспарагиновые производные (3–5) были синтезированы в филиале ИБХ в Пущино (ФИБХ) [22]. Были использованы следующие коммерчески доступные липидные производные: DOPE (Corden Pharma, Швейцария), DSPE (18) (Matreya LLC, США), DPE (21) (Avanti Polar Lipids, США), хлорформиат холестерина (24) (Sigma, США). Остальные реагенты также были коммерчески доступны (Acros Organics, США; Sigma-Aldrich, Германия). Растворители (Химмед, Реахим, Экос, Россия) перед использованием очищали стандартными методами.

Тонкослойную хроматографию проводили на алюминиевых пластинках Silica gel 60 (1.05554.0001; Merck, Германия), вещества обнаруживали обработкой пластинок 7%-ным водным раствором ортофосфорной кислоты и прогревом при 200–300°C (обугливание) или раствором нингидрина (для аминов, 3 г/л в смеси бутанол/уксусная кислота, 30 : 1). Колоночную хроматографию проводили на пластинках Silica gel 60 0.040–0.063 мм (Merck, Германия). Растворители упаривали на ротаторном испарителе в вакууме при 40–45°C.

^1H -ЯМР-спектры регистрировали на приборе Avance I (700 МГц; Bruker, Германия) при 30°C. Значения химических сдвигов в ^1H -ЯМР-спектрах (δ , м.д.) приведены с использованием для калибровки сигналов остаточных протонов растворителей HOD ($\delta = 4.750$), CD_2HOD ($\delta = 3.306$ в CD_3OD ; $\delta = 3.341$ в $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{OD}$ 2 : 1; $\delta = 3.354$ в $\text{CDCl}_3-\text{CD}_3\text{OD}$, 1 : 1; $\delta = 3.34$ в $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3-\text{D}_2\text{O}$, 6 : 3 : 2), константы спин-спиновой взаимодействия измерены в герцах. Спектры всех полученных соединений, содержащих тетрасахарид А (тип 2), включали следующие сигналы, соответствующие спейсерированному тетрасахариду (с интегральной интенсивностью, кратной количеству гликановых фрагментов): δ 5.37 (д, $J_{1,2}$ 4.2, 1H, H-1 Fuc α), 5.20 (д, $J_{1,2}$ 3.8, 1H, H-1 GalNAc α), 4.61 (д, $J_{1,2}$ 7.7, 1H, H-1 Gal β), 4.51 (д, $J_{1,2}$ 8.5, 1H, H-1 GlcNAc β), 4.33 (кв, $J_{5,6}$ 6.6, 1H, H-5 Fuc α), 4.28–4.20 (м, 3H, кольцевые протоны), 4.06–3.99 (м, 4H, 3 кольцевых протона, $-\text{OCHHCH}_2\text{CH}_2-$), 3.94–3.90 (м, 2H, кольцевые протоны), 3.85–3.66 (м, 13H, 12 кольцевых протонов, $-\text{OCHHCH}_2\text{CH}_2-$), 3.48 (ддд, $J_{4,5}$ 10.0, $J_{5,6a}$ 6.1, $J_{5,6b}$ 2.1, 1H, H-5 GlcNAc β), 3.12–3.09 (м, 2H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2.07 (с, 3H, $\text{NC}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.06 (с, 3H, $\text{NC}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.00–1.93 (м, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.27 (д, $J_{5,6}$ 6.6, 3H, H-6 Fuc α).

^{13}C -ЯМР-спектры регистрировали на приборе Avance III (600 МГц; Bruker, Германия) при 30°C. Значения химических сдвигов в ^{13}C -ЯМР-спектрах (δ , м.д.) приведены с использованием для калибровки сигналов растворителей CD_3OD ($\delta = 48.0$) и $\text{DMSO}-d_6$ ($\delta = 48.0$).

Отнесение сигналов в ЯМР-спектрах осуществляли сопоставлением зарегистрированных спектров со спектрами охарактеризованных исходных и промежуточных соединений. Дополнительная информация о взаимном расположении сигналов в спектрах тетрасахарида А (тип 2) взята из работы Meloncelli et al. [23].

Масс-спектры высокого разрешения (HR MS) были зарегистрированы на масс-спектрометре micrOTOF II (Bruker, Германия) с использованием техники ионизации электроспреем (ESI).

Получение нГЛ (13–15). Общая методика получения гликокластеров (7–9): к раствору тетрасахарида А (тип 2) (6) в 0.5 мл DMF добавляли раствор $\text{HOBT} \cdot \text{H}_2\text{O}$ в 0.1 мл DMF, раствор одного из аспарагиновых производных (3), (4) или (5) в 0.1 мл DMF и раствор DCC в 0.1 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 48 ч при комнатной температуре, после чего добавляли 0.5 мл воды. Выпадавшую *N,N*-дициклогексилмочевину удаляли фильтрованием, реакционную смесь упаривали, соупаривали с 1 мл толуола 2–3 раза до полного удаления DMF. Полученный остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле. Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали гель-хроматографии (Sephadex LH-20, элюция $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$, 1 : 1).

Леофильной сушкой из воды получали продукты (7), (8) или (9) в виде белой пены.

Соединение (7), исходные количества реагентов в реакционной смеси: тетрасахарид А (тип 2) (6) (15 мг, 0.019 ммоль), Z-D (3) (1.9 мг, 0.007 ммоль), HOBT · H₂O (4.3 мг, 0.022 ммоль), DCC (6.0 мг, 0.03 ммоль). Элюент для колоночной хроматографии: *i*-PrOH–CH₃CN–H₂O, 4 : 3 : 2, выход 94% (11.9 мг), *R_f* 0.43 (*i*-PrOH–CH₃CN–H₂O, 4 : 3 : 2). ¹H-ЯМР (700 МГц, D₂O, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 7.49–7.39 (м, 5H, ArH), 5.19–5.11 (м, 2H, PhCH₂–), 4.51–4.43 (м, 1H, α-H(D)), 2.80–2.69, 2.65–2.56 (2м, 2H, –CH₂– (D)).

Соединение (8), исходные количества реагентов в реакционной смеси: тетрасахарид А (тип 2) (6) (7.6 мг, 9.6 мкмоль), Z-D(D) (4) (0.90 мг, 2.4 мкмоль), HOBT · H₂O (2.2 мг, 14.4 мкмоль), DCC (3.7 мг, 18 мкмоль). Элюент для колоночной хроматографии: *i*-PrOH–CH₃CN–H₂O, 4 : 3 : 2.5, выход 80% (5.2 мг), *R_f* 0.43 (*i*-PrOH–CH₃CN–H₂O 4 : 3 : 2.5). ¹H-ЯМР (700 МГц, D₂O, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 7.49–7.40 (м, 5H, ArH), 5.19–5.13 (м, 2H, PhCH₂–), 4.65–4.53 (м, 1H, α-H(D)), 4.52–4.48 (м, 1H, α-H(D-Z)), 2.88–2.76, 2.75–2.65, 2.65–2.54 (3м, 4H, 2 –CH₂– (D)).

Соединение (9), исходные количества реагентов в реакционной смеси: тетрасахарид А (тип 2) (6) (20 мг, 0.025 ммоль), Z-D(D)D (5) (2.5 мг, 0.005 ммоль), HOBT · H₂O (5.7 мг, 0.038 ммоль), DCC (9.3 мг, 0.045 ммоль). Элюент для колоночной хроматографии: *i*-PrOH–CH₃CN–H₂O, 4 : 3 : 3, выход 41% (7.3 мг), *R_f* 0.21 (*i*-PrOH–CH₃CN–H₂O, 4 : 3 : 3). ¹H-ЯМР (700 МГц, D₂O, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 7.48–7.40 (м, 5H, ArH), 5.19–5.14 (м, 2H, PhCH₂–), 4.65–4.57 (м, 2H, 2 α-H(D)), 4.51–4.47 (м, 1H, α-H(D-Z)), 2.92–2.79, 2.77–2.67, 2.67–2.54 (3м, 6H, 3 –CH₂– (D)).

Общая методика удаления Z-группы: к раствору одного из гликокластеров (7) (12.0 мг, 6.63 мкмоль), (8) (4.9 мг, 1.8 мкмоль) или (9) (7.0 мг, 2.0 мкмоль) в 1.5 мл смеси H₂O–MeOH (1 : 1) добавляли 30 мкл NH₃ водн. (конц.), 25 мг 10% Pd/C и подвергали гидрогенолизу в атмосфере H₂ (1 атм.). Через 3 ч смесь фильтровали, фильтрат тщательно промывали смесью H₂O–MeOH (1 : 1), маточный раствор концентрировали и фильтровали через плотный слой ваты, чтобы удалить остатки Pd/C. Полученный раствор концентрировали и подвергали леофильной сушке из воды, в результате получили продукты (10), (11) или (12) в виде белой пены.

Соединение (10): выход 84% (9.3 мг), *R_f* 0.37 (MeOH–1 М Py · HOAc водн., 4 : 1). ¹H-ЯМР (700 МГц, D₂O с добавлением эквимолярного соединения (10) количества CF₃COOH, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 4.29 (дд, *J* 6.9, 6.0, 1H, α-H(D)), 2.93–2.86 (м, 2H, –CH₂– (D)); HRESIMS: найдено *m/z* 1676.7004, рассчитано для C₆₆H₁₁₃N₇O₄₂, [*M* + H]⁺ 1676.6994; найдено *m/z* 838.8545, рассчитано для C₆₆H₁₁₃N₇O₄₂, [*M* + 2H]²⁺ 838.8534; найдено *m/z* 849.8454, рассчитано для C₆₆H₁₁₃N₇O₄₂, [*M* + H + Na]²⁺ 849.8443; найдено *m/z* 857.8321, рассчитано для C₆₆H₁₁₃N₇O₄₂, [*M* + H + K]²⁺ 857.8313; найдено *m/z* 860.8359, рассчитано для C₆₆H₁₁₃N₇O₄₂, [*M* + 2Na]²⁺ 860.8353; найдено *m/z* 868.8227, рассчитано для C₆₆H₁₁₃N₇O₄₂, [*M* + Na + K]²⁺ 868.8223.

Соединение (11): выход 87% (4 мг), *R_f* 0.18 (*i*-PrOH–CH₃CN–H₂O, 4 : 3 : 4). ¹H-ЯМР (700 МГц, D₂O с добавлением эквимолярного соединения (11) количества CF₃COOH, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 4.68–4.65 (м, 1H, α-H(D)), 4.32–4.29 (м, 1H, α-H(D-H)), 3.02–2.91, 2.77–2.72, 2.69–2.64 (3м, 2H, 1H, 1H, 2 –CH₂– (D)); HRESIMS: найдено *m/z* 1282.5324, рассчитано для C₁₀₁H₁₇₁N₁₁O₆₄, [*M* + 2H]²⁺ 1282.5321; найдено *m/z* 855.3580, рассчитано для C₁₀₁H₁₇₁N₁₁O₆₄, [*M* + 3H]³⁺ 855.3572.

Соединение (12): выход 65% (4.4 мг), *R_f* 0.31 (MeOH–1 М Py · HOAc водн., 5 : 1), ¹H-ЯМР (700 МГц, D₂O с добавлением эквимолярного соединения (12) количества CF₃COOH, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 4.71–4.64 (м, 2H, 2 α-H(D)), 4.29–4.26 (м, 1H, α-H(D-H)), 2.97–2.64 (м, 6H, 3 –CH₂– (D)); HRESIMS: найдено *m/z* 1150.8095, рассчитано для C₁₃₆H₂₂₉N₁₅O₈₆, [*M* + 3H]³⁺ 1150.8086; найдено *m/z* 1725.7089, рассчитано для C₁₃₆H₂₂₉N₁₅O₈₆, [*M* + 2H]²⁺ 1725.7092.

Общая методика конъюгации кластеров активированным эфиром (16): к раствору одного из кластеров (10), (11) или (12) в 0.5 мл DMF добавляли раствор активированного эфира (16) в 0.5 мл CH₂Cl₂ и Et₃N. После окончания реакции смесь концентрировали, соупаривали с 1 мл толуола 3–4 раза до полного удаления DMF и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле. Фракции, содержащие требуемый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали гель-хроматографии (Sephadex LH-20, элюция CH₃CN–H₂O 1 : 1). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали леофильной сушке из воды. Полученный остаток растворяли в 1 мл H₂O, титровали 50 мМ водным раствором NaHCO₃ до pH 6.5–6.7 и снова подвергали

лиофильной сушке, в результате получили целевой нГЛ (**13**), (**14**) или (**15**) в виде белой пены.

Соединение (**13**): исходные количества реагентов: соединение (**10**) (7.2 мг, 4.3 мкмоль), соединение (**16**) (4.2 мг, 4.3 мкмоль), Et₃N (0.65 мкл, 4.7 мкмоль), время протекания реакции 18 ч, элюент для колоночной хроматографии CH₂Cl₂–EtOH–H₂O, 3 : 5 : 1, выход 64% (7.0 мг), *R_f* 0.27 (CH₂Cl₂–EtOH–H₂O, 3 : 5 : 1). ¹H-ЯМР (700 МГц, CD₃OD–CDCl₃–D₂O, 6 : 3 : 2, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.40–5.34 (м, 4Н, 2 HC=CH), 5.29–5.25 (м, 1Н, –OCH₂–CHO–CH₂O–), 4.68 (дд, *J* 8.1, 6.1, 1Н, α-Н(D)), 4.59 (дд, *J* 7.8, 11.5, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.22 (дд, *J* 7.6, 12.2, 1Н, м, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.01–3.84 (м, 4Н, PO–CH₂–CH₂–NH–, CH₂–OP), 2.71 (дд, 1Н, *J* 14.7, 6.1, –СНН– (D)), 2.60 (дд, 1Н, *J* 14.7, 8.1, –СНН– (D)), 2.39–2.33 (м, 4Н, 2 CH₂–C(O), 2.32–2.25 (м, 4Н, C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 2.09–1.98 (м, 8Н, 2 CH₂CH=CHCH₂), 1.69–1.58 (м, 8Н, 2 CH₂–CH₂–C(O), C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 1.40–1.27 (м, 40Н, –CH₂–), 0.91 (т, *J* 7.0, 6Н, 2 –CH₃). ¹³C-ЯМР (151 МГц, DMSO-*d*₆–D₂O 4 : 1): δ 173.0, 172.2, 171.9, 171.3, 171.2, 170.4 (C=O), 130.0 и 129.9 (C=C DOPE), 101.5 и 101.4 (C-1 Galβ), 101.2 и 101.1 (C-1 GalNAcα), 99.4 и 99.3 (C-1 GlcNAcβ), 92.5 и 92.4 (C-1 GalNAcα), 78.2, 76.5, 75.9, 75.7, 73.8, 72.7, 72.2, 71.7, 71.0, 70.3, 69.4, 69.1, 68.4, 67.8, 67.3, 66.6, 63.4, 61.9, 60.9, 60.4, 59.6, 55.6, 50.0, 39.5 (DMSO), 32.0, 29.8, 29.6, 29.4, 29.3, 27.3, 27.2, 25.3, 25.0, 23.3, 23.2, 23.0, 22.8, 21.3, 16.7 (C-6 Fucα), 14.3 (CH₃ DOPE); HRESIMS: найдено *m/z* 2529.2753, рассчитано для C₁₁₃H₁₉₇N₈O₅₂P, [*M* – H][–] 2529.2714; найдено *m/z* 1264.1338, рассчитано для C₁₁₃H₁₉₇N₈O₅₂P, [*M* – 2H]^{2–} 1264.1321; найдено *m/z* 842.4213, рассчитано для C₁₁₃H₁₉₇N₈O₅₂P, [*M* – 3H]^{3–} 842.4190.

Соединение (**14**): исходные количества реагентов: соединение (**11**) (4.0 мг, 1.6 мкмоль), соединение (**16**) (1.5 мг, 1.6 мкмоль), Et₃N (0.25 мкл, 1.7 мкмоль), время протекания реакции 18 ч, элюент для колоночной хроматографии CH₂Cl₂–EtOH–H₂O, 2 : 5 : 1, выход 67% (3.7 мг), *R_f* 0.5 (CH₂Cl₂–EtOH–H₂O, 2 : 5 : 1). ¹H-ЯМР (700 МГц, CD₃OD–CDCl₃–D₂O, 6 : 3 : 2, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.40–5.34 (м, 4Н, 2 HC=CH), 5.29–5.25 (м, 1Н, –OCH₂–CHO–CH₂O–), 4.71–4.65 (м, 2Н, 2 α-Н(D)), 4.60–4.57 (м, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.22 (дд, *J* 7.6, 12.3, 1Н, м, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.03–3.84 (м, 4Н, PO–CH₂–CH₂–NH–, CH₂–OP), 2.84–2.78, 2.76–2.67, 2.66–2.59 (3м, 4Н, 2 –CH₂– (D)), 2.40–2.33 (м, 4Н, 2 –CH₂–C(O)), 2.32–2.25 (м, 4Н, C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 2.08–2.01 (м, 8Н, 2 CH₂CH=CHCH₂), 1.68–1.60 (м, 8Н,

2 CH₂–CH₂–C(O), C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 1.41–1.28 (м, 40Н, –CH₂–), 0.91 (т, *J* 7.1, 6Н, 2 –CH₃); HRESIMS: найдено *m/z* 1707.3105, рассчитано для C₁₄₈H₂₅₅N₁₂O₇₄P, [*M* – 2H]^{2–} 1707.3093.

Соединение (**15**): исходные количества реагентов: соединение (**12**) (3.0 мг, 0.87 мкмоль), соединение (**16**) (0.84 мг, 0.87 мкмоль), Et₃N (0.13 мкл, 0.96 мкмоль), время протекания реакции 48 ч, элюент для колоночной хроматографии CHCl₃–MeOH–H₂O, 2 : 6 : 1, выход 55% (2.1 мг), *R_f* 0.43 (CHCl₃–MeOH–H₂O, 2 : 6 : 1). ¹H-ЯМР (700 МГц, CD₃OD–CDCl₃–D₂O, 6 : 3 : 2, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.40–5.34 (м, 4Н, 2 HC=CH), 5.29–5.25 (м, 1Н, –OCH₂–CHO–CH₂O–), 4.71–4.64 (м, 3Н, 3 α-Н(D)), 4.60–4.57 (м, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.22 (дд, *J* 7.5, 12.1, 1Н, м, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.02–3.84 (м, 4Н, PO–CH₂–CH₂–NH–, CH₂–OP), 3.10–3.04, 2.95–2.85, 2.78–2.59 (3м, 6Н, 3 –CH₂– (D)), 2.40–2.33 (м, 4Н, 2 –CH₂–C(O), 2.32–2.25 (м, 4Н, C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 2.09–2.01 (м, 8Н, 2 CH₂CH=CHCH₂), 1.68–1.59 (м, 8Н, 2 CH₂–CH₂–C(O), C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 1.41–1.28 (м, 40Н, –CH₂–), 0.91 (т, *J* 7.1, 6Н, 2 –CH₃); HRESIMS: найдено *m/z* 2150.9899, рассчитано для C₁₈₃H₃₁₃N₁₆O₉₆P, [*M* – 2H]^{2–} 2150.9880; найдено *m/z* 1433.6585, рассчитано для C₁₈₃H₃₁₃N₁₆O₉₆P, [*M* – 3H]^{3–} 1433.6563; найдено *m/z* 1074.9926, рассчитано для C₁₈₃H₃₁₃N₁₆O₉₆P, [*M* – 4H]^{4–} 1074.9904.

Получение нГЛ (19**).** К смеси 4.4 мг (5.9 мкмоль) DSPE (**18**) и 0.5 мл CH₂Cl₂ добавляли раствор 5.5 мг (5.4 мкмоль) активированного эфира тетрасахарида А (тип 2) (**17**) в 0.5 мл DMF, 0.1 мкл (0.8 мМ) Et₃N и 0.5 мл CH₃CN. Через 48 ч смесь концентрировали и соупаривали с 1 мл толуола 4 раза до полного удаления DMF. Полученный остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (элюция CHCl₃–EtOH–H₂O, 6 : 5 : 0.7). Фракции, содержащие чистый продукт, концентрировали, подвергали лиофильной сушке из воды, полученный остаток растворяли в 1 мл H₂O, титровали 50 мМ водным раствором NaHCO₃ до pH 6.5 и снова подвергали лиофильной сушке, в результате получили целевой нГЛ (**19**) в виде белой пены с выходом 75% (6.7 мг), *R_f* 0.29 (CHCl₃–EtOH–H₂O, 6 : 5 : 0.7). ¹H-ЯМР (700 МГц, CD₃OD–CDCl₃ 1 : 1, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.26–5.23 (м, 1Н, –OCH₂–CHO–CH₂O–), 4.45 (дд, *J* 12.1, 3.2, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.20 (дд, *J* 6.7, 12.0, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.04–3.93 (м, 2Н, PO–CH₂–CH₂–NH–), 3.96–3.89 (м, 2Н, CH₂–OP), 2.36–2.30 (м, 4Н, 2 –CH₂–C(O), 2.28–2.22 (м, 4Н, C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 1.68–1.59 (м, 8Н,

2 $\text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—C(O)}$, $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)}$, 1.37–1.25 (м, 56H, $-\text{CH}_2-$), 0.89 (т, J 7.1, 6H, 2 $-\text{CH}_3$); HRESIMS: найдено m/z 1645.9442, рассчитано для $\text{C}_{78}\text{H}_{143}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} - \text{H}]^-$ 1645.9452; найдено m/z 822.4696, рассчитано для $\text{C}_{78}\text{H}_{143}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} - 2\text{H}]^{2-}$ 822.4690.

Получение нГЛ (23). К раствору 31 мг (0.091 ммоль) дисукцинимидного эфира адипиновой кислоты (20) и 2.5 мкл (0.018 ммоль) Et_3N в смеси 2 мл CHCl_3 и 50 мкл DMF при перемешивании по каплям добавляли раствор DPyPE (21) (10 мг, 0.012 ммоль) в 0.2 мл CHCl_3 . Через 2 ч смесь концентрировали, а остаток подвергали гель-фильтрации (Sephadex LH-20, элюция $\text{CHCl}_3\text{—MeOH}$, 1 : 1, 0.1% AcOH), в результате получили 12.1 мг (95%) активированного эфира (22) в виде белой пены, R_f 0.70 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{—EtOH—H}_2\text{O}$, 6 : 5 : 0.5).

К раствору аминопропилгликозида тетрасахарида А (тип 2) (6) (7.7 мг, 0.010 ммоль) в 0.4 мл DMSO добавляли раствор активированного эфира (22) (12.1 мг, 0.012 ммоль) в 0.4 мл CH_2Cl_2 и Et_3N (1.7 мкл, 0.012 ммоль). Через 2 ч реакционную смесь подвергали гель-хроматографии (Sephadex LH-20, элюция $\text{CHCl}_3\text{—MeOH}$, 1 : 1), фракции, содержащие требуемый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (элюция $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{—EtOH—H}_2\text{O}$, 6 : 5 : 0.5). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали лиофильной сушке из воды. Полученный остаток растворяли в 1 мл воды, титровали 50 мМ водным раствором NaHCO_3 до pH 6.5 и снова подвергали лиофильной сушке, в результате получили целевой нГЛ (23) в виде белой пены с выходом 54% (9.2 мг), R_f 0.33 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{—EtOH—H}_2\text{O}$, 6 : 5 : 0.5). ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{CD}_3\text{OD—CDCl}_3$, 1 : 2, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.27–5.22 (м, 1H, $-\text{OCH}_2\text{—CHO—CH}_2\text{O—}$), 4.46–4.42 (м, 1H, $-\text{CCOONCH—CHO—CH}_2\text{O—}$), 4.21–4.16 (м, 1H, $-\text{CCOONCH—CHO—CH}_2\text{O—}$), 4.01–3.96 (м, 2H, $\text{PO—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH—}$), 3.95–3.89 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{—OR}$), 2.38–2.30 (м, 2H, 2 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{—CHN—C(O)}$), 2.28–2.19 (м, 4H, $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)}$), 2.16–2.08 (м, 2H, 2 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{—CHN—C(O)}$) 1.97–1.89 (м, 2H, 2 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{—CH}_2\text{—C(O)}$), 1.68–1.62 (м, 4H, $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)}$), 1.53 (дп, J 13.3, 6.7, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.41–1.04 (м, 40H, 18 $-\text{CH}_2-$, 4 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$), 0.96–0.92 (м, 6H, 2 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{—CHN—C(O)}$), 0.89–0.83 (м, 24H, 8 $-\text{CH}_3$); HRESIMS: найдено m/z 1702.0046, рассчитано для $\text{C}_{82}\text{H}_{151}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} - \text{H}]^-$ 1702.0078; найдено m/z 850.4993, рассчитано для $\text{C}_{82}\text{H}_{151}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} - 2\text{H}]^{2-}$ 850.5003; найдено m/z 1704.0192, рассчитано для $\text{C}_{82}\text{H}_{151}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1704.0224; найдено m/z 1726.0018, рассчитано для $\text{C}_{82}\text{H}_{151}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} +$

$+\text{Na}]^+$ 1726.0043; найдено m/z 1747.9830, рассчитано для $\text{C}_{82}\text{H}_{151}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} - \text{H} + 2\text{Na}]^+$ 1747.9862.

Получение нГЛ (25). К раствору аминопропилгликозида тетрасахарида А (тип 2) (6) (2.0 мг, 2.5 мкмоль) в 0.5 мл DMF добавляли раствор холестерилхлорформата (24) (1.4 мг, 3.0 мкмоль) в 0.2 мл CH_2Cl_2 и 0.4 мкл (3 мкмоль) Et_3N . Через час реакционную смесь концентрировали и соупаривали 2 раза с *o*-ксилолом до полного удаления DMF. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (элюция $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{—EtOH—H}_2\text{O}$, 6 : 5 : 1), фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали гель-хроматографии (Sephadex LH-20, элюция $\text{CHCl}_3\text{—MeOH}$, 1 : 1). Чистые фракции снова объединяли, концентрировали и подвергали лиофильной сушке из воды, в результате получили 95% (3.2 мг) продукта в виде белой пены, R_f 0.45 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{—EtOH—H}_2\text{O}$, 6 : 5 : 1). ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{CD}_3\text{OD—CDCl}_3$, 1 : 1, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.39 (м, 1H; $=\text{CH}$), 4.43 (м, 1H, OCH), 2.38–2.28 (м, 2H, $=\text{CH—CH}_2-$), 2.00 (м, 1H), 1.89 (м, 1H), 1.68–1.27 (м, 14H), 1.20–0.97 (м, 13H), 0.94 (д, 3H, J 6.6 Гц; CH_3), 0.88 (д, 3H, J 6.6 Гц; CH_3), 0.87 (д, 3H, J 6.6 Гц; CH_3), 0.71 (с, 3H; CH_3); HRESIMS: найдено m/z 1202.6785, рассчитано для $\text{C}_{59}\text{H}_{99}\text{N}_3\text{O}_{22}$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1202.6793; найдено m/z 1224.6604, рассчитано для $\text{C}_{59}\text{H}_{99}\text{N}_3\text{O}_{22}$, $[\text{M} + + \text{Na}]^+$ 1224.6612; найдено m/z 1240.6385, рассчитано для $\text{C}_{59}\text{H}_{99}\text{N}_3\text{O}_{22}$, $[\text{M} + \text{K}]^+$ 1240.6352.

Получение нГЛ (27). К раствору аминопропилгликозида тетрасахарида А (тип 2) (6) (5.8 мг, 7.3 мкмоль) в 0.5 мл DMF добавляли раствор активированного эфира (26) (4.7 мг, 7.5 мкмоль) в 0.2 мл DMF и 2.0 мкл (15 мкмоль) Et_3N . Через 3 ч реакционную смесь подвергали гель-хроматографии (Sephadex LH-20, элюция $\text{CHCl}_3\text{—MeOH}$, 2 : 1). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали лиофильной сушке из воды, в результате получили 8.6 мг (71%) продукта (27) в виде белой пены, R_f 0.23 ($\text{CHCl}_3\text{—MeOH—H}_2\text{O}$, 19 : 8 : 1). ^1H -ЯМР (700 МГц, CD_3OD , 30°C): δ 5.38 (м, 1H; $=\text{CH}$), 4.36 (м, 1H; OCH), 3.09 (т, 2H, J 6.9 Гц; CH_2N аминновалериановой кислоты), 2.20 (т, 2H, J 7.5 Гц; CH_2CO аминновалериановой кислоты), 2.05 (м, 1H), 1.97 (м, 1H), 1.87 (м, 1H), 1.73 (м, 1H), 1.64–1.27 (м, 16H), 1.12–0.97 (м, 13H), 0.94 (д, 3H, J 6.6; CH_3), 0.881 (д, 3H, J 6.6; CH_3), 0.877 (д, 3H, J 6.6; CH_3), 0.72 (с, 3H; CH_3); HRESIMS: найдено m/z 1301.7477, рассчитано для $\text{C}_{64}\text{H}_{108}\text{N}_4\text{O}_{23}$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1301.7477; найдено m/z 1323.7294, рассчитано для $\text{C}_{64}\text{H}_{108}\text{N}_4\text{O}_{23}$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 1323.7297; найдено m/z 1339.7034, рассчитано для $\text{C}_{64}\text{H}_{108}\text{N}_4\text{O}_{23}$, $[\text{M} + \text{K}]^+$ 1339.7036; найдено m/z 651.3777, рассчитано для $\text{C}_{64}\text{H}_{108}\text{N}_4\text{O}_{23}$, $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 651.3775.

Получение нГЛ (30). К тщательно перемешиваемому раствору активированного эфира (26) (46.7 мг, 0.0745 ммоль) в смеси DMF и CHCl_3 (1.5 мл и 0.5 мл) добавляли раствор CMG(2)-диамина (28) (304 мг, 0.298 ммоль) в смеси H_2O и *i*-PrOH (1.4 мл и 1 мл) и 1 М NaHCO_3 (0.596 мл, 0.596 ммоль). Смесь перемешивали в течение часа, затем нейтрализовали 34 мл AcOH и упаривали досуха. Колоночной хроматографией на силикагеле (элюция CHCl_3 – MeOH – H_2O , 2 : 6 : 1 $\rightarrow$ 1 : 3 : 1), гель-хроматографией (Sephadex LH-20, элюция MeOH – H_2O , 1 : 2) и лиофильной сушкой из воды получали 48 мг (41% в расчете на эфир (26)) амина (29) в виде белой пены, R_f 0.61 (CHCl_3 – MeOH – H_2O , 1 : 3 : 1). ^1H -ЯМР (700 МГц, D_2O – CD_3OD , 2 : 1): δ 5.40 (м, 1H; =CH холестерина), 4.40 (м, 1H; OCH холестерина), 4.29–3.90 (32H; 4 CH_2COO , 12 NCH_2CO ; CMG), 3.38 (м, 4H; $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.12 (т, J 6.5, 2H; CH_2N остатка аминовалериановой кислоты), 2.36 (т, J 7.5; CH_2CO остатка аминовалериановой кислоты), 2.33 (м, 2H; O–C– CH_2 –C=C холестерина), 2.06, 1.99 и 1.88 (м, 5H; холестерин и остаток аминовалериановой кислоты), 1.66–0.96 (31H; холестерин и остаток аминовалериановой кислоты), 0.90 (д, J 6.6, 3H; CH_3 холестерина), 0.89 (д, J 6.2, 3H; CH_3 холестерина), 0.73 (с, 3H; CH_3 холестерина); HRESIMS: m/z найдено 766.8646, рассчитано для $\text{C}_{67}\text{H}_{105}\text{N}_{15}\text{O}_{23}$ [$M + 2\text{Na}$] $^{2+}$ 766.8646.

К раствору активированного эфира (17) (11.3 мг, 0.0111 ммоль) в 1 мл DMSO добавляли производное (29) (13.3 мг, 8.56 мкмоль) и Et_3N (1.2 мкл, 8.6 мкмоль) тремя равными порциями каждые 2 ч. Через 14 ч после добавления последней порции (29) реакционную смесь подвергали гель-хроматографии (Sephadex LH-20, H_2O –*i*-PrOH, 2 : 1, 0.5% $\text{Py} \cdot \text{HOAc}$), выделенный продукт лиофилизировали из воды 2 раза, затем растворяли в 1 мл воды, титровали 50 мМ водным раствором NaHCO_3 до pH 6.5 и снова подвергали лиофильной сушке, в результате получали 53% (11.2 мг) целевого нГЛ (30) в виде белой пены, R_f 0.38 (CHCl_3 – MeOH – H_2O , 2 : 6 : 1). ^1H -ЯМР (700 МГц, D_2O – CD_3OD , 2 : 1, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.44 (с, 1H; =CH холестерина), 4.38 (м, 1H; OCH холестерина), 4.29–3.90 (м, 32 H; 4 CH_2COO , 12 NCH_2CO из CMG(2)), 3.13 (т, 2H, J 6.9, 6.9 Гц; CH_2N аминовалериановой кислоты), 2.36 (м, 5H; CH_2CO аминовалериановой кислоты и 3H холестерина), 2.27 (м, 2H), 2.02–1.76 (м, 6H), 1.67–1.29 (м, 17H), 1.22–0.95 (м, 13H), 0.887 (д, 3H, J 6.6; CH_3 холестерина), 0.883 (д, 3H, J 6.6; CH_3 холестерина), 0.72 (с, 3H; CH_3 холестерина). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, D_2O – CD_3OD , 2 : 1): δ 176.64, 176.62, 176.6, 176.0, 175.6, 175.0, 174.5, 174.0 (C=O), 171.8–170.6 (C=O CMG(2)), 157.6 (N(C=O)O), 147.7 (C=CH Chol), 130.0 (C=C Chol), 101.2 (C-1 Gal β), 100.3 (C-1

Fuc α), 98.7 (C-1 GlcNAc β), 91.5 (C-1 GalNAc α), 76.5, 75.8, 75.4, 75.3, 72.5, 72.3, 71.8, 71.2, 70.1, 68.7, 68.0, 67.9, 67.6, 66.8, 63.2, 61.4, 61.2, 60.2, 55.5, 53.0, 52.5, 52.4, 49.6, 48.0 (метанол), 42.3, 40.8, 39.4, 38.5 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 36.4, 36.1, 35.4, 35.1, 31.8, 28.6, 27.7, 25.0, 24.6, 22.4, 22.1, 21.9, 20.9, 18.9, 18.5, 15.2 (C-6 Fuc α), 14.2 (CH_3 Chol); HRESIMS: найдено m/z 1239.0330, рассчитано для $\text{C}_{104}\text{H}_{162}\text{N}_{18}\text{O}_{45}\text{Na}_4$, [$M + 2\text{H}$] $^{2+}$ 1239.0354; найдено m/z 1261.0159, рассчитано для $\text{C}_{104}\text{H}_{162}\text{N}_{18}\text{O}_{45}\text{Na}_4$, [$M + 2\text{Na}$] $^{2+}$ 1261.0174; найдено m/z 848.3431, рассчитано для $\text{C}_{104}\text{H}_{162}\text{N}_{18}\text{O}_{45}\text{Na}_4$, [$M + 3\text{Na}$] $^{3+}$ 848.3413.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирована серия из восьми аналогов гликолипидов, содержащих константный углеводный фрагмент – тетрасахарид А (тип 2), но отличающихся строением липидного участка и спейсера (его длины, что особенно важно); кроме того, синтезированы варианты гликолипидов с кластером из одинаковых углеводных фрагментов – 2–4 остатков тетрасахарида А (тип 2).

Столь представительный набор встраиваемых в мембрану проб дает возможность изучения функционирования природных гликосфинголипидов клетки – кинетики встраивания в клетку, распределения встроенных гликолипидов в мембране, включения их в клеточные микровезикулы и многого другого.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-23-00756 “Синтетические гликолипидные биоконъюгаты как инструменты исследования эукариотической клетки”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reitsma S., Slaaf D.W., Vink H., Van Zandvoort M.A.M.J., Oude Egbrink M.G.A. // Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 2007. V. 454. P. 345–359. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0212-8>
2. Rapoport E.M., Khasbiullina N.R., Komarova V.A., Ryzhov I.M., Gorbach M.M., Tuzikov A.B., Khaidukov S.V., Popova I.S., Korchagina E.Y., Henry S.M., Bovin N.V. // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2021. V. 1863. P. 183645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183645>

3. Marcus D.M., Cass L.E. // *Science*. 1969. V. 164. P. 553–555.
<https://doi.org/10.1126/science.164.3879.553>
4. Korchagina E., Tuzikov A., Formanovsky A., Popova I., Henry S., Bovin N. // *Carbohydr. Res.* 2012. V. 356. P. 238–246.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.03.044>
5. Miller-Podraza H. // *Chem. Rev.* 2000. V. 100. P. 4663–4681.
<https://doi.org/10.1021/cr990347o>
6. Koscielak J. // *Transfus. Med.* 2001. V. 11. P. 267–279.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3148.2001.00317.x>
7. Karlsson H., Johansson L., Miller-Podraza H., Karlsson K.A. // *Glycobiology*. 1999. V. 9. P. 765–778.
<https://doi.org/10.1093/glycob/9.8.765>
8. Morales-Serna J.A., Boutureira O., Díaz Y., Matheu M.I., Castillón S. // *Carbohydr. Res.* 2007. V. 342. P. 1595–1612.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.03.028>
9. Korchagina E.Y., Henry S.M. // *Biochem.* 2015. V. 80. P. 857–871.
<https://doi.org/10.1134/S0006297915070068>
10. Frame T., Carroll T., Korchagina E., Bovin N., Henry S. // *Transfusion*. 2007. V. 47. P. 876–882.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01204.x>
11. Henry S. // *ISBT Sci. Ser.* 2020. V. 15. P. 303–309.
<https://doi.org/10.1111/voxs.12545>
12. Ryzhov I.M., Bovin N.V. // *Mendelev Commun.* 2019. V. 29. P. 597–612.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.11.001>
13. Ryzhov I.M., Korchagina E.Y., Popova I.S., Tyrtyshev T.V., Paramonov A.S., Bovin N.V. // *Carbohydr. Res.* 2016. V. 430. P. 59–71.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.04.029>
14. Ryzhov I.M., Tuzikov A.B., Perry H., Korchagina E.Y., Bovin N.V. // *ChemBioChem*. 2019. V. 20. P. 131–133.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201800289>
15. Barr K., Korchagina E., Ryzhov I., Bovin N., Henry S. // *Transfusion*. 2014. V. 54. P. 2477–2484.
<https://doi.org/10.1111/trf.12661>
16. Perry H., Bovin N., Henry S. // *Transfusion*. 2019. V. 59. P. 2131–2140.
<https://doi.org/10.1111/trf.15247>
17. Lee R.T., Lee, Y.C. // *Bioconjug. Chem.* 1997. V. 8. P. 762–765.
<https://doi.org/10.1021/bc9700796>
18. Chiu S.W., Jakobsson E., Mashl R.J., Scott H.L. // *Biophys. J.* 2002. V. 83. P. 1842–1853.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73949-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73949-0)
19. Smondyrev A.M., Berkowitz M.L. // *Biophys. J.* 1999. V. 77. P. 2075–2089.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77049-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77049-9)
20. Henry S., Williams E., Barr K., Korchagina E., Tuzikov A., Ilyushina N., Abayezed S.A., Webb K.F., Bovin N. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 2845.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21186-3>
21. Tyrtyshev T.V., Korchagina E.Y., Ryzhov I.M., Bovin N.V. // *Carbohydr. Res.* 2017. V. 449. P. 65–84.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.06.014>
22. Азев В.Н., Байдакова Л.К., Чулин А.Н., Тузиков А.Б., Кислицын П.Г., Молчанов М.В., Мирошников А.И. // *Биоорг. химия*. 2023. Т. 49. № 4. С. 411–421.
<https://doi.org/10.31857/S0132342323040279>
23. Meloncelli P.J., Lowary T.L. // *Carbohydr. Res.* 2010. V. 345. P. 2305–2322.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.08.012>

Synthesis of Synthetic Analogs of Glycolipids Containing A (Type 2) Tetrasaccharide

D. O. Petrakova*, M. S. Savchenko*, I. S. Popova*, A. B. Tuzikov*, A. S. Paramonov*,
A. O. Chizhov**, N. V. Bovin*, and I. M. Ryzhov*,#

#Phone: +7 (495) 330-03-00; e-mail: imryzhov@gmail.com

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Zelinsky Institute of Organic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
Leninskiy prosp. 47, Moscow, 119991 Russia

Glycolipids are the components of cellular membrane containing glycan and lipid parts. Transport of glycolipids from membrane and *vice versa* from extracellular space into the membrane is possible. This opens opportunity for modification of cellular membrane via embedding of glycolipids. In practice, synthetic analogs of glycolipids are significantly more convenient than natural glycolipids for such application, as the properties of the synthetic analogs can be varied and other bioactive components besides glycans can be introduced into their structure. This research describes synthesis of the eight synthetic glycolipids containing the same glycan part – A (type 2) tetrasaccharide but varying in the composition of lipid part or including several glycan residues. Obtained set of synthetic glycolipids will allow to study the influence of structural variations on the ability to present tetrasaccharide antigen on the cellular surface.

Keywords: glycolipid, glycocluster, dioleoylphosphatidylethanolamine, distearoylphosphatidylethanolamine, diphytanoylphosphatidylethanolamine, cholesterol