



УДК 547.458.2'466.23'466.64.057

СИНТЕЗ

N-[O-(N-АЦЕТИЛ-β-D-ГЛЮКОЗАМИНИЛ)-(1→6)- N-АЦЕТИЛ-D-МУРАМОИЛ]-L-АЛАНИЛ- D-ИЗОГЛУТАМИНА

*Земляков А. Е., Чирва В. Я., Хорлин А. Я.**

Симферопольский государственный университет им. М. В. Фрунзе;

**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемлякина Академии наук СССР, Москва*

Оксазолиновым синтезом с последующим ацетилированием получен полностью O-ацетилированный дисахарид O-(N-ацетил-β-D-глюкозаминил)-(1→6)-(бензиловый эфир α-бензилгликозида N-ацетил-D-мурамовой кислоты). Исходя из него был синтезирована N-[O-(N-ацетил-β-D-глюкозаминил)-(1→6)-N-ацетил-D-мурамоил]-L-аланил-D-изоглутамин — дисахаридный аналог мурамоилдипептида.

Дисахариддипептид GlcNAc(β1-4)MDP (GMDP), являющийся фрагментом пептидогликана клеточных стенок бактерий и обладающий большей активностью, чем сам MDP [1], привлек внимание к синтезу дисахаридных аналогов мурамоилдипептида. За последние годы разработаны способы получения GMDP [2-5] и некоторых его модификаций: MDP(β1-4)GlcNAc [5, 6], MDP(β1-4)MDP [5], MDP(β1-6)GlcNAc [7]. Все эти соединения обладают сравнимой иммуноадьювантной активностью [5, 7], в то же время такие гликопептиды, как Glc(β1-4)MDP [5, 8] и GlcβNAc(β1-4)MDP [5], показали малую активность. С целью изучения взаимосвязи между строением и биологической активностью нами осуществлен синтез позиционного изомера GMDP — O-[2-ацетамидо-6-O-(2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-2-дезоксид-D-глюкопиранозид]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (I).

Гликозирование бензил-2-ацетамидо-3-O-[D-1-(бензилоксикарбонил)-этил]-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид избытком 2-метил-(3,4,6-три-O-ацетил-1,2-дидезокси-α-D-глюкопирано)-[2,1-d]-2-оксазолина позволило получить дисахарид (II) с высоким выходом. Свободную гидроксильную группу у C-4 ацетилировали. В ПМР-спектре перацетата (III) наблюдаются сигналы протонов бензильных, O- и N-ацетильных групп, а также метильной группы лактильного остатка, что согласуется с его строением. Селективный гидрогенолиз сложноэфирной бензильной защитной группы привел к свободной кислоте (IV), которую активировали N-оксисукцинимидом под действием N,N'-дициклогексилкарбодиимида. Активированный эфир конденсировали с бензиловым эфиром L-аланил-D-изоглутамин. Дипептидное производное (V) выделили колоночной хроматографией с выходом 65%, его строение подтверждает ПМР-спектр (см. «Экспериментальную часть»).

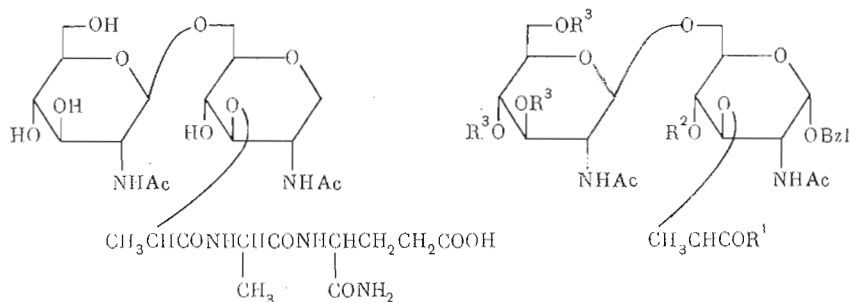
Снятие защитных групп в гликопептиде (V) проводили ступенчато. Сложноэфирную бензильную группу в остатке изоглутамин удаляли каталитическим гидрогенолизом, а полученную кислоту дезацетилировали метилатом натрия в метаноле. Общий выход бензилгликозида (VI) после такой обработки составил 76%. Данные ¹³C-ЯМР-спектра α-бензилгликозида изо-GMDP подтвердили его структуру (см. таблицу). Бензилгликозидную защиту удаляли гидрогенолизом. В ИК- и ПМР-спектрах дисахариддипептида (I) отсутствуют сигналы бензильной группы.

MDP — N-(N-ацетил-D-мурамоил)-L-аланил-D-изоглутамин (мурамоилдипептид
MurNAc(-Ala-₁-Glu-NH₂)).

Химические сдвиги ^{13}C в спектрах производных N-ацетилглюкозаминна и соединения (VI) (растворы в $^2\text{H}_2\text{O}$)

Атом	VI	$\alpha\text{MeGlcNAc}$ [9]	$\beta\text{MeGlcNAc}$ [9]	αMDP [10]
C-1	96,73	98,6	102,3	91,0
C-2	53,82	54,2	56,1	53,8
C-3	80,14	71,9	74,6	79,5
C-4	70,41	70,4	70,9	69,2
C-5	70,84	72,2	76,3	71,6
C-6	69,16	61,4	61,4	60,7
C-1'	102,30			
C-2'	56,32			
C-3'	74,57			
C-4'	70,27			
C-5'	76,54			
C-6'	61,59			
C $^{\alpha}$ Lac	78,14			77,7
C $^{\beta}$ Lac	19,16			18,7
C $^{\alpha}$ Ala	50,22			49,7
C $^{\beta}$ Ala	17,30			17,0
C $^{\alpha}$ Glu-NH $_2$	53,51			52,1
C $^{\beta}$ Glu-NH $_2$	27,27			26,0
C $^{\gamma}$ Glu-NH $_2$	31,73			30,1
C $^{\delta}$ Glu-NH $_2$	178,70			176,8

По предварительным результатам, синтезированный нами гликопептид обладает адъювантной активностью, сопоставимой с активностью MDP; противоопухолевое действие у этого аналога не обнаружено*.



(I)

- (II) $\text{R}^1 = \text{OBzl}$, $\text{R}^2 = \text{H}$, $\text{R}^3 = \text{Ac}$
- (III) $\text{R}^1 = \text{OBzl}$, $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{Ac}$
- (IV) $\text{R}^1 = \text{OH}$, $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{Ac}$
- (V) $\text{R}^1 = \text{L-Ala-D-Glu(OBzl)-NH}_2$, $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{Ac}$
- (VI) $\text{R}^1 = \text{L-Ala-D-Glu-NH}_2$, $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$

Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на нагреваемом столике, оптическое вращение при 22°C — на поляриметрах Polamat-A (ГДР) и Perkin — Elmer 141 (США). Спектры ПМР получены на приборах Bruker WM-250 (250 МГц, ФРГ) и Varian SC-300 (300 МГц, США), внутренний стандарт Me_4Si . Спектр ^{13}C -ЯМР снят на спектрометре Bruker WM-250 с рабочей частотой по углероду 62,9 МГц, внутренний эталон — CH_3OH (49,6 м.д. от Me_4Si). ИК-спектры записаны на спектрофотометре Specord IR-75 (ГДР, таблетки KBr). ТСХ проводили на пластинках Silufol NV-254 (ЧССР), системы растворителей: хлороформ — этанол, 9:1 (А); бутанол — уксусная кислота — вода, 3:1:1 (Б). Зоны обнаруживали обугливанием при 400°C . Колоночную хроматографию проводили на промытом силикагеле 100–250 мкм (ЧССР). Данные элементного анализа (на С, Н и N) для всех соединений соответствуют расчетным значениям.

В работе использовали $\text{N,N'$ -дидицилогексилкарбодимид (Ferak, ФРГ), N-оксисукцинимид и 10% Pd/C (Merck, ФРГ). Дихлорметан и 1,2-дихлорэтан перегоняли над CaH_2 , диметилформамид — над BaO. Растворители досушивали ситами 4 А. Безводную n-толуолсульфокислоту получали азеотропной отгонкой воды с толуолом из моногидрата.

* Биологические испытания проведены в группе иммунохимии ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР Т. И. Барковой и М. В. Астаповой.

Бензил-2-ацетамидо-6-О-(2-ацетамидо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-3-О-[D-1-(бензилоксикарбонил)этил]-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид (II). Раствор 1,4 г (3,06 ммоль) бензил-2-ацетамидо-3-О-[D-1-(бензилоксикарбонил)этил]-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид [11], 1,5 г (4,56 ммоль) 2-метил-(3,4,6-три-О-ацетил-1,2-дидезокси-α-D-глюкопирано)-[2,1-d]-2-оксазолина [12] и 20 мг безводной *p*-толуолсульфонокислоты в 12 мл сухого дихлорэтана нагревали с обратным холодильником 4 ч при 85–90° С (температура бани). После охлаждения реакционную смесь нейтрализовали 0,02 мл пиридина и осадили дисахарид 200 мл смеси эфира с гексаном (3:1). Осадок отфильтровали и перекристаллизовали из 50 мл смеси этанол – эфир (5:1). Фильтрат и маточный раствор упарили и выделили колоночной хроматографией (хлороформ → хлороформ – этанол, 25:1) дополнительную порцию дисахарида. Общий выход 1,9 г (79%), R_f (II) 0,49, R_f (диол) 0,45, R_f (оксазолин) 0,76 (А), т. пл. 199–200° С, $[\alpha]_{546}^{20} +96^\circ$ (с 1,0; хлороформ). $\nu_{\text{КВг}}^{\text{max}}$ 3400 (ОН), 3310 (NH), 1740, 1720, 1240 (сложный эфир), 1640, 1540 (амид), 720, 690 (Ph).

Бензил-2-ацетамидо-6-О-(2-ацетамидо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-4-О-ацетил-3-О-[D-1-(бензилоксикарбонил)этил]-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид (III). Раствор 1,53 г (1,95 ммоль) производного (II) в смеси 7 мл уксусного ангидрида и 8 мл пиридина выдержали 5 ч при 20° С и вылили в 100 мл холодной воды. Осадок отфильтровали, высушили и перекристаллизовали из 30 мл этанола – эфира (5:1). Выход продукта (III) 1,56 г (97%), R_f 0,53 (А), т. пл. 230–233° С, $[\alpha]_{546}^{20} +69^\circ$ (с 1,0; хлороформ): $\nu_{\text{КВг}}^{\text{max}}$ 3300 (NH), 1750, 1230 (сложный эфир), 1660, 1550 (амид), 720, 690 (Ph). ПМР (300 МГц, C²H₂Cl₂): 1,34д (3H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}}$ 6,8 Гц, CH₃CH); 1,86с, 1,92с, 1,98с, 2,05с, 2,12с (18H, 4 AcO и 2 AcN); 4,47д и 4,66д (2H, J_{gem} 12,0 Гц, OCH₂Ph); 5,13д и 5,23д (2H, J_{gem} 12,0 Гц, COOCH₂Ph); 7,34с (10 H; 2 Ph).

Бензил-2-ацетамидо-6-О-(2-ацетамидо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-4-О-ацетил-2-дезоксид-3-О-(D-1-карбоксиэтил)-α-D-глюкопиранозид (IV). Раствор 1,50 г (1,81 ммоль) соединения (III) в 25 мл 90% водной уксусной кислоты подвергали гидрогенолизу при 20° С в присутствии 0,4 г 10% Pd/C. Через 1 ч катализатор отфильтровали, промыли 5 мл 90% уксусной кислоты. Фильтрат упарили досуха, остаток затерли с эфиром, отфильтровали. Получили 1,29 г (96%) кислоты (IV), R_f 0,37 (А), т. пл. 240–244° С (с разл.), $[\alpha]_{546}^{20} +72^\circ$ (с 0,93; хлороформ). $\nu_{\text{КВг}}^{\text{max}}$ 3400 (ОН), 330 (NH), 1750, 1230 (сложный эфир), 1660, 1550 (амид), 730, 700 (Ph).

Бензиловый эфир О-[бензил-2-ацетамидо-6-О-(2-ацетамидо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-4-О-ацетил-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (V). К раствору 1,21 г (1,64 ммоль) соединения (IV) в 7 мл DMF при охлаждении до 0° С и перемешивании добавили 0,24 г (2,09 ммоль) N-оксисукцинимид и 0,45 г (2,20 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодимид. Через 3 ч осадок N,N'-дициклогексилмочевины отфильтровали и промыли 5 мл DMF. К раствору активированного эфира прилили раствор 0,84 г (2,09 ммоль) бензилового эфира трифторацетата L-аланил-D-изоглутамин [3], предварительно нейтрализованного триэтиламином, в 9 мл DMF. По завершении конденсации дипептидное производное осадили 10 мл эфира и очистили колоночной хроматографией (хлороформ → хлороформ – этанол, 10:1). Выход производного (V) 1,10 г (65%), R_f 0,28 (А), т. пл. 268–271° С, $[\alpha]_{546}^{20} +61^\circ$ (с 0,67; уксусная кислота). $\nu_{\text{КВг}}^{\text{max}}$ 3300 (NH), 1740, 1240 (сложный эфир), 1640, 1550 (амид), 730, 695 (Ph). ПМР (300 МГц, DMSO-d₆): 1,11д и 1,20д (6H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}}$ 7,0 Гц, 2 CH₃CH); 1,74с и 1,76с (6H, 22 AcN); 1,90с, 1,96с, 2,01с, 2,08с (12H, 4 AcO); 2,35т (2H, γ-CH₂); 4,43д и 4,65д (2H, J_{gem} 12 Гц, OCH₂Ph); 5,08с (2H, COOCH₂Ph); 7,16с (2H, CONH₂); 7,36с (10H, 2 Ph); 7,56д, 7,91д, 8,12д, 8,21д (4H, 4 NH).

О-[Бензил-2-ацетамидо-6-О-(2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изо-

глутамин (VI). Гидрогенолиз 0,67 г (0,65 ммоль) соединения (V), растворенного в 7 мл 90% водного этанола, проводили при 20°С на 0,3 г 10% Pd/C. Через 1,5 ч катализатор отфильтровали и промыли 5 мл 90% этанола. Фильтрат упарили досуха, остаток растворили в смеси 5 мл метанола и 2 мл дихлорметана. В раствор добавили 1 М раствор метилата натрия в метаноле до pH 8–9. После окончания реакции (контроль ТСХ в системе Б) раствор нейтрализовали катионитом КУ-2 (H⁺). Смолу отфильтровали и промыли в 10 мл метанола, фильтрат упарили и очистили колоночной хроматографией (хлороформ – этанол, 10:1 → хлороформ – этанол, 1:1). Выход глакозида (VI) 0,38 г (76%), R_f 0,35 (Б), т.пл. 196–198°С (с разл.) [α]_D²⁵ +55° (с 0,67; вода). ν_{KBr}^{max} 3400 (ОН), 3300 (NH), 1650, 1560 (амид), 720 (Ph). ¹³C-ЯМР (²H₂O): 17,30 (C^β Ala), 19,16 (C^β Lac), 22,59 и 23,00 (2CH₃ AcN), 27,27 (C^β Glu-NH₂), 31,73 (C^γ Glu-NH₂), 50,22 (C^α Ala), 53,51 (C^α Glu-NH₂), 53,86 (C-2), 56,32 (C-2'), 61,59 (C-6'), 69,16 (C-6), 70,11 (C-4), 70,27 (C-4'), 70,84 (C-5), 71,73 (CH₂ Bzl), 74,57 (C-3'), 76,54 (C-5'), 78,14 (C^α Lac), 80,14 (C-3), 96,73 (C-1α), 102,30 (C-1'β), 129,13; 129,40 и 137,70 (Ph), 174,40; 174,96; 175,37; 176,20 и 176,43 (5CO), 178,70 (C^δ Glu-NH₂).

O-[2-Ацетамидо-6-O-(2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-2-дезоксид-D-глюкопирано-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (I). Раствор 0,24 г (0,31 ммоль) производного (VI) в 5 мл 90% водного этанола подвергали каталитическому гидрогенолизу при 20°С над 0,2 г 10% Pd/C. Через 48 ч катализатор отфильтровали и промыли 5 мл 90% этанола. Фильтрат упарили и остаток очистили колоночной хроматографией (хлороформ – этанол, 10:1 → хлороформ – этанол, 1:1). Выделили 0,12 г (57%) аморфного гликопептида (I), [α]_D²² +5° (с 0,87; вода), R_f 0,13 (Б). ν_{KBr}^{max} 3400–3300 (ОН, NH), 1660, 1550 (амид). ПМР (250 МГц, ²H₂O): 1,42д и 1,47д (6H, J_{CH₃, CH} 6,6 и 7,1 Гц, 2CH₃CH); 2,02с и 2,12с (6H, 2AcN); 2,48г (2H, J_{β,γ} 7,1 Гц, γ-CH₂); 4,60д (J_{1,2} 8,3 Гц, H-1β); 5,19д (J_{1,2} 3,3 Гц, H-1α).

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsujimoto M., Kinoshita F., Okunaga T., Katani S., Kusumoto S., Yamamoto K., Shiba T. *Microbiol. Immunol.*, 1979, v. 23, № 9, p. 933–936.
2. Kusumoto S., Yamamoto K., Shiba T. *Tetrahedron Lett.*, 1978, № 45, p. 4407–4410.
3. Ростовцева Л. Г., Андропова Т. М., Малькова В. П., Сорокина Н. Б., Иванов В. Т. *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 12, с. 1843–1858.
4. Durette P. L., Meitzner E. P., Shen T. Y. *Carbohydr. Res.*, 1979, v. 77, с1–с4.
5. Kiso M., Kaneda Y., Shimizu R., Hasegawa A., Azuma I. *Carbohydr. Res.*, 1982, v. 104, p. 253–269.
6. Durette P. L., Meitzner E. P., Shen T. Y. *Tetrahedron Lett.*, 1979, № 42, p. 4013–4016.
7. Hasegawa A., Ozaki M., Yasuhiko G., Kiso M., Azuma I. *Carbohydr. Res.*, 1982, v. 100, p. 235–245.
8. Hasegawa A., Kaneda Y., Amano M., Kiso M., Azuma I. *Agric. Biol. Chem.*, 1978, v. 42, № 11, p. 2187–2189.
9. Шашков А. С., Евсугинеев А. Ю., Деревицкая В. А. *Биоорг. химия*, 1978, т. 4, № 11, с. 1495–1505.
10. Lefrancier P., Lederer E. *Prog. Chem. Org. Natur. Products*, 1981, v. 40, p. 1–47.
11. Osawa T., Sinay P., Halford M., Jeanloz R. W. *Biochemistry*, 1969, v. 8, № 8, p. 3369–3375.
12. Lemieux R. U., Driguez H. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1975, v. 97, № 14, p. 4069–4075.

Поступила в редакцию

24.II.1986

После доработки

14.IV.1986

SYNTHESIS OF N-[O-(N-ACETYL-β-D-GLUCOSAMINYL)-(1→6)-N-ACETYL-D-MURAMOYL]-L-ALANYL-D-ISOGLUTAMINE

ZEMLYAKOV A. E., CHIRVA V. Ya., KHORLIN A. Ya*

*M. V. Frunze State University, Simferopol; *M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Peracetylated disaccharide O-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)-(1→6)-(α-benzylglycoside-N-acetylmuramic acid benzyl ester) was obtained by oxazoline synthesis with following acetylation. This compound was utilized in the synthesis of a disaccharide analogue of MDP, N-[O-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)-(1→6)-N-acetyl-D-muramoyl]-L-alanyl-D-isoglutamine.