



УДК 547.455.623'233.1'472.3'466.23'64.057

СИНТЕЗ β -(ω -АМИНОАЛКИЛ)ГЛИКОЗИДОВ N-АЦЕТИЛМУРАМОИЛ-L-АЛАНИЛ-D-ИЗОГЛУТАМИНА

Земляков А. Е., Какаян Е. С., Чирва В. Я.

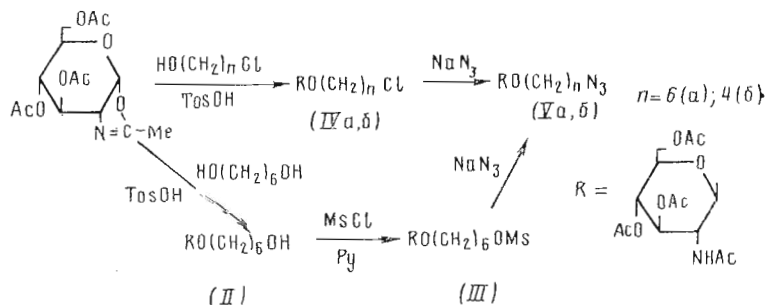
Симферопольский государственный университет им. М. В. Фрунзе

Осуществлен синтез β -(6-аминогексил)- и β -(4-аминобутил)гликозидов MDP. Оксазолиновым методом получили перацетилированные β -(6-гидроксигексил)-, β -(6-хлоргексил)- и β -(4-хлорбутил)гликозиды GlcNAc, которые были превращены в соответствующие β -(ω -азидоалкил)гликозиды GlcNAc. Последовательное бензилиденирование гликозидов, алкилирование α -L-хлорпропионовой кислотой, конденсация с дипептидом и деблокирование привели к целевым соединениям.

N-Ацетилмурамоил-L-аланил - D - изоглутамиин (мурамоилдипептид, MDP) и ряд его производных обладают высокой адъювантной, противоопухолевой и антиинфекционной активностью [1, 2]. Широкое применение нашли спейсерные производные MDP. Они были использованы для получения высокоактивных «макромолекулярных» мурамоилдипептидов [3, 4], усиления иммуногенности природных и синтетических антигенов [5–8], синтеза комбинаций аналогов MDP и синтетических фрагментов липида A [9] и селективного введения в молекулу мурамоилдипептида различных ацильных компонентов (высшие карбоновые кислоты, изопреноиды, производные витаминов A, K, Q) [10–12]. Спейсеры были присоединены к MDP по карбоксильной группе остатка изоглутамина [4–6], первичному гидроксилу [8–12] и гликозидному центру [7, 13]. Последний вариант обладает тем преимуществом, что отпадает необходимость временной защиты аномерного гидроксила.

В литературе описан синтез β -(6-аминогексил)гликозида N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина (Ia) [7]. В качестве «преспейсера» в этом методе была использована 6-(бензилоксикарбониламино)гексильная группа [14]. Мы разработали новый способ получения гидрохлорида гликозида (Ia). «Преспейсером» в этом случае послужила 6-азидогексильная группа, которая устойчива в условиях реакции получения гликопептида и легко восстанавливается до соответствующего амина. Ключевое соединение — (6-азидогексил)-2-ацетамидо-3,4,6-три-O-ацетил-2-дезоксиглюкопиранозид (Va) — было синтезировано двумя способами (схема 1).

Схема 1



В первом случае из 1,6-гександиола оксазолиновым синтезом с выходом 40% получили β -(6-гидроксигексил)гликозид (II), строение которого

Сокращения: DCC — N,N'-дициклогексилкарбодиимид, MDP — N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамиин, Py — пиридин, Ms — мезил-.

¹H-ЯМР-спектры соединений (II), (IVa, б) (IXa, б) [δ, м. д. (J, Гц)]

Соединение	(CH ₂) _n	ОAc	NAc	MeCH (J _{MeCH})	γ-CH ₂ Glu-NH ₂	CHPh	COOR	H-1 (J _{1,2})	NH	Ph	Раствори- тель	Рабочая частота, МГц
(II)	4,38м; 4,56м; 1,81м	2,02с; 2,03с; 2,09с	1,95с					4,67д (9)	5,71д		C ² HCl ₃	500
(IVa)	4,39м; 4,68м; 1,76м	2,03с; 2,05с; 2,10с	1,96с					4,68д (8,5)	5,52д		C ² HCl ₃	250
(IVб)	4,23м; 4,63м; 1,81м	2,06с (6H); 2,11с	1,98с					4,68д (8)	5,48д		C ² HCl ₃	100
(IXa)	4,30м; 4,49м; 1,76м		1,80с	1,20д; 1,23д (7)	2,3/г	5,68с	5,07с	4,46т (8)	7,08с; 7,43д; 7,91д; 8,10д	7,35м	DMSO-d ₆	500
(IXб)	4,54м; 4,74м		1,81с	1,21д; 1,25д (7)	2,29г	5,69с	3,57с	4,48д (8)	7,09с; 7,47д; 7,92д; 8,10д	7,37м	DMSO-d ₆	500

Выходы, физико-химические характеристики синтезированных соединений

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	[α] _D ²⁰ , град (c; растворитель)	Данные ИК-спектров, ν, см ⁻¹					R _f (система)	
				ОН, NH, NH	CH ₂	N ₃	Сл. эфир C=O	Амид		
(II)	40	90–94	–18 (0,87; EtOH)	3400, 3300	2930, 2860		1750, 1240	1670, 1540	0,40 (Б)	
(III)	85	95–97	–15 (0,73; CHCl ₃)	3310	2930, 2840		1730, 1220	1650, 1540	0,50 (Б)	
(IVa)	57	89–90	–14 (0,60; CHCl ₃)	3320	2930		1740, 1230	1670, 1550	0,45 (А)	
(IVb)	59	103–104	–18 (0,70; CHCl ₃)	3280	2940, 2850		1730, 1240	1660, 1530	0,38 (А)	
(Va)	98	85–86	–17 (0,70; CHCl ₃)	3290	2930, 2850	2100	1740, 1240	1660, 1550	0,68 (Б)	
(Vb)	94	95–96	–17 (0,87; CHCl ₃)	3320	2930	2090	1750–1240	1660, 1550	0,40 (А)	
(VIa)	100	142–143	–25 (0,54; EtOH)	3340–3220	2910, 2830	2080		1640, 1530	0,24 (Б)	
(VIb)	98	140–141	–28 (0,90; EtOH)	3380–3270	2920	2090		1650, 1570	0,12 (Б)	
(VIIa)	92	255–258 с разл.	–67 (0,55; CHCl ₃)	3410, 3250	2930, 2860	2100		1630, 1570	0,62 (Б)	750, 700
(VIIb)	91	244–245	–103 (0,66; CHCl ₃)	3430, 3250	2930, 2850	2090		1630, 1570	0,46 (Б)	750, 700
(VIIIa)	91	197–199	–7 (0,54; CHCl ₃)	3290	2940, 2870	2110	1720	1670, 1570	0,68 (Б)	710, 680
(VIIIb)	82	218–220 с разл.	–14 (0,70; CHCl ₃)	3250	2930, 2850	2090	1720	1660, 1570	0,51 (Б)	750, 700
(IXa)	85	—	–7 (0,54; DMF)	3390, 3260	2920, 3260	2090	1720, 1230	1640, 1540	0,62 (Б)	740, 690
(IXb)	95	—	–13 (0,80; DMF)	3400, 3300	2960	2100	1740	1660, 1580	0,18 (Б)	740, 690
(Xa)	98	—	+12 (0,69; DMF)	3370–3280	2910, 2840	2080	1710, 1230	1640, 1530	0,10 (Б)	730, 690
(Xb)	97	—	+4 (0,60; EtOH)	3400–3290	2960	2090	1740	1660, 1580	0,67 (Г)	
(Ia)	90	—	+3 (0,62; EtOH)	3450–3200	2910			1640, 1530	0,50 (Д)	
(Ib)	88	—	+28 (1,20; EtOH)	3430–3200	2930		1740	1670, 1550	0,45 (Д)	

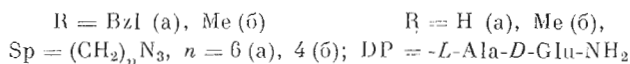
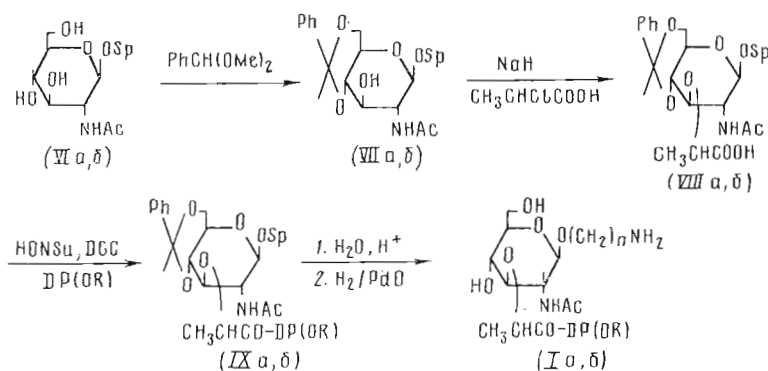
подтверждено ^1H -ЯМР-спектром (табл. 1). Наличие однопротонного дублета (δ 4,67 м.д.) с константой расщепления 9 Гц свидетельствует о β -конфигурации гликозидного центра. Гидроксил в соединении (II) обрабатывали хлористым мезилом в пиридине. В ИК-спектре мезилата (III) присутствуют полосы поглощения 1350 и 1160 см^{-1} , характерные для сульфонатов. Мезилокислородную группу практически количественно заменили на азид обработкой сульфоната (III) азидом натрия в DMF при 80° С. В ИК-спектре соединения (Va) наблюдается интенсивная полоса поглощения 2100 см^{-1} , свойственная азидной группе (табл. 2).

В альтернативном методе в качестве агликона в оксазолиновом синтезе использовали 6-хлоргексанол [15], что позволило получить гликозид (IVa) с выходом 57%. Его ^1H -ЯМР-спектр аналогичен спектру соединения (II) (см. табл. 1). Хлорид (IVa) действием избытка азидата натрия превратили в азид (Va).

Деацетилированный продукт (VIa) бензилидировали диметилацеталем бензальдегида без растворителя по методу, приведенному в работе [16] (схема 2). Полученную алкилированием ацетала (VIIa) α -L-хлорпропионовой кислотой защищенную мурамовую кислоту (VIIIa) конденсировали с бензиловым эфиром L-аланил-D-изоглутамина, используя HONSu-DCC-метод. В ^1H -ЯМР-спектре гликопептида (IXa) наряду с сигналами протонов углеводной части были определены сигналы протонов дипептидного фрагмента (см. табл. 1). Бензилиденовую защиту удаляли кислотным гидролизом. Гидрирование диола (Xa) проводили над оксидом палладия в присутствии хлороформа, что позволило выделить соединение (Ia) в виде гидрохлорида. Строение спейсерного мурамоилдипептида согласуется с данными ^{13}C -ЯМР-спектра (см. «Экспериментальную часть»). Общий выход целевого продукта составил 29% (через интермедиат (II) — 21%) по сравнению с 7% в известном методе [7, 14].

Аналогично из (4-хлорбутил)гликозида (IVб), используя метиловый эфир L-аланил-D-изоглутамина, синтезировали гликопептид (Iб) с меньшей длиной спейсера. Строение соединений (IVб) и (IXб) доказывали ^1H -ЯМР-спектрами (см. табл. 1). Общий выход спейсерного мурамоилдипептида (Iб) сравним с выходом аналога (Ia) и составил 33%.

Схема 2



Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на приборе ПТП (СССР), удельное вращение при 20–22° С — на поляриметре Polamat-A (ГДР). Спектры ^1H -ЯМР получены на спектрометрах Bruker WM-500 (500 МГц), Bruker WM-250 (250 МГц), Varian XL-100 (100 МГц), 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 Spesord 75-IR (ГДР, таблетки KBr). ТСХ проводили на пластинах Silufol UV-254 (ЧССР) в системах растворителей: хлороформ — этанол, 15 : 1 (А); хлороформ — этанол, 10 : 1 (Б); хлороформ — этанол, 5 : 1 (В); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 3 : 1 : 1 (Г); этанол — *n*-бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота, 100 : 10 : 10 : 10 : 3 (Д). Хроматограммы проявляли обугливанием при 300° С. Колоночную хроматографию проводили на промытом силикагеле L100—250 мкм (ЧССР). Данные элементного анализа для синтезированных соединений соответствуют расчетным значениям. Выходы, физико-химические константы и ИК-спектры синтезированных соединений приведены в табл. 2.

(6-Гидроксигексил)-2-ацетамидо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксиг-β-*D*-глюкопиранозид (II). К раствору 1,9 г (16,1 ммоль) гександиола-1,6 в 20 мл сухого нитрометана, содержащему 60 мг безводной *p*-толуолсульфокислоты (TosOH), при перемешивании и нагревании (температура бани 80—85° С) тремя порциями в течение 6 ч добавляли раствор 5,3 г (16,1 ммоль) 2-метил-(3,4,6-три-*O*-ацетил-1,2-дидезокси-α-*D*-глюкопирано)-[2,1-*d*]-2-оксазолина в 25 мл нитрометана. По окончании реакции (контроль ТСХ в системе А) реакцию смесь нейтрализовывали пиридином и упаривали. Колоночной хроматографией (градиентное элюирование хлороформ→хлороформ-этанол, 30 : 1) выделили 2,9 г гликозида (II).

(6-Мезилоксигексил)-2-ацетамидо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксиг-β-*D*-глюкопиранозид (III). Гликозид (II) (2,4 г, 5,4 ммоль) растворяли в 25 мл сухого пиридина и при охлаждении льдом прибавляли 0,62 мл (8,05 ммоль) хлористого мезила. Через 2 ч в реакционную смесь добавляли 1 мл воды и упаривали. Колоночной хроматографией (градиентное элюирование хлороформ→хлороформ-этанол, 50 : 1) выделили 2,4 г мезилата (III).

(6-Хлоргексил)-2-ацетамидо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксиг-β-*D*-глюкопиранозид (IVa). К раствору 0,4 г (1,22 ммоль) 2-метил-(3,4,6-три-*O*-ацетил-1,2-дидезокси-α-*D*-глюкопирано)-[2,1-*d*]-2-оксазолина в 4 мл сухого дихлорэтана добавляли 0,32 мл (2,44 ммоль) 6-хлор-1-гексанола [15] и 10 мг TosOH . Смесь выдерживали при 80—85° С до полного разложения оксазолина (контроль ТСХ в системе А). Раствор нейтрализовывали пиридином и упаривали. После колоночной хроматографии (элюент — хлороформ) получили 0,32 г гликозида (IVa).

Аналогично из 1,74 г (5,28 ммоль) оксазолина и 1,06 мл (10,56 ммоль) 4-хлор-1-бутанола [15] синтезировали 1,36 г (4-хлорбутил)гликозида (IVб).

(6-Азидогексил)-2-ацетамидо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксиг-β-*D*-глюкопиранозид (Va). В раствор 2,35 г (4,48 ммоль) мезилата (II) в 15 мл DMF вносили 1,45 г (22,4 ммоль) азидата натрия и перемешивали 1 ч при 80° С. Реакционную смесь упаривали и остаток очищали колоночной хроматографией (элюент — хлороформ). Получили 2,07 г азидата (Va).

Аналогично 0,24 г (0,52 ммоль) хлорида (IVa) и 2,04 г (4,67 ммоль) хлорида (IVб) обрабатывали 3 экв. азидата натрия и выделили 0,20 г (82%) азидата (Va) и 1,95 г (94%) азидата (Vб).

(6-Азидогексил)-2-ацетамидо-2-дезоксиг-β-*D*-глюкопиранозид (VIa). Раствор 2,0 г (4,24 ммоль) азидата (Va) в 20 мл метанола дезацетилювали 2 мл 0,1 *n*. раствора метилата натрия в метаноле. Через 6 ч раствор нейтрализовали катионитом КУ-2 (H^+), смолу отфильтровывали, фильтрат упаривали. Получили 1,47 г соединения (VIa).

Соответственно из 1,95 г (4,40 ммоль) азидата (Vб) синтезировали 1,36 г продукта (Vб).

(6-Азидогексил)-2-ацетамидо-4,6-*O*-бензилиден-2-дезоксиг-β-*D*-глюкопиранозид (VIIa). К суспензии 1,40 г (4,05 ммоль) производного (VIa) в 3 мл диметилацетата бензальдегида добавляли 5 капель 10% раствора серной кислоты в метаноле и нагревали 5 мин на масляной бане (95—100° С). Реакционную смесь охлаждали и прибавляли 100 мл гексана. Отфильтровывали 1,61 г ацетата (VIIa).

Таким же способом из 1,09 г (3,43 ммоль) соединения (VIб) получили 1,27 г производного VIIб).

(6-Азидогексил)-2-ацетамидо-4,6-О-бензилиден-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид-3-ил - D - 1-карбоксиэтил-β-D-глюкопиранозид (VIIIa). К раствору 1,60 г (3,7 ммоль) соединения (VIIa) в 60 мл сухого диоксана при перемешивании добавляли 0,33 г (11,1 ммоль) гидрида натрия (80% суспензия в масле). Реакционную смесь выдерживали 1 ч при 90°С, после чего охлаждали до 65°С и приливали 0,68 мл (7,4 ммоль) α-L-хлорпропионовой кислоты. Выдержав смесь 3 ч при 65°С, добавляли 0,11 г (3,7 ммоль) гидрида натрия и перемешивали 1 ч. Избыток гидрида натрия разлагали добавлением 3 мл этанола. Реакционную смесь выливали в 800 мл холодной воды. Раствор подкисляли 2 н. серной кислотой до pH 2–3 и экстрагировали хлороформом выпавшую кислоту. Экстракт сушили Na₂SO₄ и упаривали. Кристаллизация из смеси хлороформ – эфир дала 1,72 г кислоты (VIIIa).

Подобным образом из 0,52 г (1,28 ммоль) производного (VIIб) синтезировали 0,50 г кислоты (VIIIб).

Бензиловый эфир О-[(6-азидогексил)-2-ацетамидо-4,6-О-бензилиден-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил - D - изоглутамина (IXa). Кислоту (VIIIa) (0,70 г, 1,37 ммоль) растворяли в 50 мл сухого диоксана и при перемешивании и охлаждении льдом активировали 0,35 г (1,71 ммоль) DCC и 1,19 г (1,64 ммоль) HONSu. Через 4 ч отфильтровывали осадок дициклогексимочевины и к фильтрату прибавляли 0,63 г (1,51 ммоль) трифторацетата бензилового эфира L-аланил-D-изоглутамина и 0,21 мл триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали 24 ч, упаривали и колоночной хроматографией (градиентное элюирование хлороформ → хлороформ-этанол, 10:1) выделили 0,93 г гликопептида (IXa).

Аналогично из 0,26 г (0,55 ммоль) кислоты (VIIIб) и трифторацетата метилового эфира L-аланил-D-изоглутамина (получен обработкой трифторуксусной кислотой 0,20 г (0,60 ммоль) метилового эфира трет-бутилоксикарбонил-L-аланил-D-изоглутамина) получили 0,36 г метилового эфира О-[(4-азидобутил)-2-ацетамидо-4,6-О-бензилиден-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамина.

Бензиловый эфир О-[(6-азидогексил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамина (Ха). Гликопептид (IXa) (0,40 г, 0,5 ммоль) растворяли при нагревании на кипящей водяной бане в 10 мл 80% уксусной кислоты. Раствор упаривали и осаждали эфиром 0,35 г диола (Ха).

По этой же методике из 0,29 г (0,42 ммоль) соединения (IXб) получили 0,25 г диола (Хб).

Гидрохлорид О-[(6-аминогексил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамина (Ia). Раствор 0,10 г (0,14 ммоль) диола (Ха) в смеси 15 мл этанола и 1 мл хлороформа гидрировали 24 ч при комнатной температуре над 0,2 г оксида палладия (II) [17]. Катализатор отфильтровывали, промывали 5 мл этанола и фильтрат упаривали. Добавлением 20 мл ацетона осаждали 0,080 г спейсерного производного (Ia). ¹³C-ЯМР (MeOH-d₄): 18,4 (C_β Ala); 20,1 (C_β Lac); 23,6 (CH₃CO); 26,9 (C_β Glu-NH₂); 27,7 (C-4 Sp); 28,8 и 29,0 (C-2 и C-3 Sp); 31,8 (C_γ Glu-NH₂); 33,8 (C-5 Sp); 41,5 (C-6 Sp); 49,2 (C_α Ala); 52,5 (C_α Glu-NH₂); 54,4 (C-2); 57,0 (C-1 Sp); 63,4 (C-6); 71,9 (C-4); 78,3 (C-5); 78,9 (C_α Lac); 84,2 (C-3); 103,9 (C-1).

Подобным способом из 0,20 г (0,33 ммоль) диола (Хб) синтезировали 0,18 г гидрохлорида метилового эфира О-[(4-аминобутил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил - D - изоглутамина (Iб).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adam A., Petit J.-F., Lefrancier P., Lederer E. // *Molecul. Cell. Biochem.* 1981. V. 40. № 1. P. 27–47.
2. Ледерер Э. Перспективы биоорганической химии и молекулярной биологии. М.: Наука, 1986. С. 294–297.
3. Parant M., Damais C., Audibert F., Parant F., Chedid L., Sache E., Lefrancier P., Choay J., Lederer E. // *J. Infect. Dis.* 1978. V. 138. № 3. P. 378–386.

4. Хорлин А. Я., Абашев Ю. П. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. № 8. С. 1119–1125.
5. Carelli C., Audibert F., Gaillard J., Chedid L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 9. P. 5392–5395.
6. Юровский В. В., Бовин Н. В., Сафонова И. Г., Васильев Р. Г., Хорлин А. Я. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 100–105.
7. Ponpiron M. M., Rupprecht K. M. // Carbohydr. Res. 1983. V. 113. № 1. P. 57–62.
8. Ponpiron M. M., Rupprecht K. M. // Carbohydr. Res. 1983. V. 113. № 1. P. 45–56.
9. Hasegawa H., Seki E., Fujishima Y., Kigawa K., Kiso M., Ishida H., Azuma I. // J. Carbohydr. Chem. 1986. V. 5. № 3. P. 371–385.
10. Kobayashi S., Fukuda T., Yukimasa H., Imada I., Fujino M., Azuma I., Yamamura Y. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1980. V. 53. № 10. P. 2917–2920.
11. Fukuda T., Kobayashi S., Yukimasa H., Imada I., Fujino M., Azuma I., Yamamura Y. // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. № 8. P. 2215–2221.
12. Kobayashi S., Fukuda T., Yukimasa H., Fujino M., Azuma I., Yamamura Y. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1984. V. 57. № 11. P. 3182–3196.
13. Lefrancier P., Derrien M., Lederman I., Nief F., Choay J., Lederer E. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1978. V. 11. № 4. P. 289–296.
14. Matta K. L., Barlow J. J. // Carbohydr. Res. 1976. V. 51. № 2. P. 215–222.
15. Вейганд К., Хильгегат Г. Методы эксперимента в органической химии. М.: Химия, 1969. С. 944.
16. Гришковец В. И., Земляков А. Е., Чирва В. Я. // Химия природн. соедин. 1982. № 1. С. 119.
17. Руководство по неорганическому синтезу. Т. 5. М.: Мир, 1985. С. 360.

Поступила в редакцию
23.II.1989

SYNTHESIS OF β -(ω -AMINOALKYL)GLYCOSIDES OF N-ACETYLMURAMOYL-L-ALANYL-D-ISOGLUTAMINE

ZEMLYAKOV A. E., KAKAYAN E. S., CHIRVA V. Ya.

M. V. Frunze Simferopol State University

β -(6-Aminohexyl)- and β -(4-aminobutyl)glycosides of MDP have been synthesized. Peracetylated β -(6-hydroxyhexyl)-, β -(6-chlorohexyl)- and β -(4-chlorobutyl)glycosides of GlcNAc were obtained by the oxazoline synthesis. These compounds were converted in to corresponding β -(ω -azidoalkyl)glycosides of GlcNAc. Successive benzylidenation of the glycosides, alkylation by α -L-chloropropionic acid, coupling with dipeptide and deprotection led to the title compounds.