



УДК 547.963.1.07

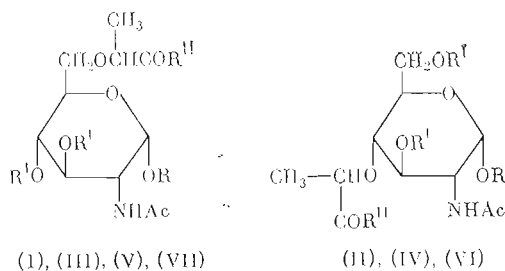
СИНТЕЗ ИЗОМЕРОВ N-АЦЕТИЛМУРАМИЛДИПЕПТИДА, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПОЛОЖЕНИЕМ ЛАКТИЛДИПЕПТИДНОЙ ЧАСТИ В САХАРНОМ ОСТАТКЕ

Абашев Ю. П., Андропова Т. М., Зурабян С. Э.,
Хорлун А. Я.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Синтезированы изомеры N-ацетилмурамилдипептида, в которых лактилдипептидная часть находится в положениях C₍₆₎ и C₍₄₎ остатка N-ацетил-D-глюкозамина.

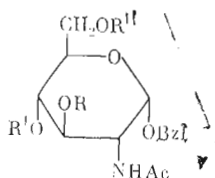
Для изучения связи между структурой N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина (мурамилдипептид — MDP) и его адьювантной активностью синтезированы изомеры MDP, различающиеся положением лактилдипептидной части: 2-(2-ацетамидо-2-дезоксид-D-глюкопираноз-6-илокси)-(R)-пропионил-L-аланил-D-изоглутамин (I) и 2-(2-ацетамидо-2-дезоксид-D-глюкопираноз-4-илокси)-(R)-пропионил-L-аланил-D-изоглутамин (II).



- (I), (II) R=R'=H, R''=-Ala-D-Glu-NH₂
 (III), (IV) R=R'=Bzl, R''=OH
 (V), (VI) R=R'=Bzl, R''=-Ala-D-Glu(OBzl)NH₂
 (VII) R=Bzl, R'=H, R''=-Ala-D-Glu-NH₂

Синтез производных (I) и (II) осуществлен по схеме, аналогичной для получения MDP [1-3], т. е. введением 1-(R)-карбоксиилгильного остатка в положениях C₍₆₎ или C₍₄₎ соответствующих бензилированных производных N-ацетил-D-глюкозамина (VIII) и (IX) реакцией с (S)-2-хлорпропионовой кислотой. Образующиеся при этом аналоги N-ацетилмурамовой кислоты (III) и (IV) конденсировали с бензиловым эфиром L-аланил-D-изоглутамина карбодимидным методом в присутствии N-оксисукцинимиды и полученные защищенные гликопептиды (V) и (VI) подвергали ка-

талитическому гидрированию до целевых соединений (I) и (II). Гидрирование производных (V) и (VI) протекает ступенчато, и в случае соединения (V) наряду с целевым продуктом был выделен его α -бензилгликозид (VII).



- (VII) $R=R'=BzI$, $R''=H$
 (IX) $R=R''=BzI$, $R'=H$
 (X) $R=H$, $R'=R''=BzI$
 (XI) $R=R'=H$, $R''=BzI$
 (XII) $R=R'=R''=BzI$

Исходное соединение (IX) получено в отличие от известных многостадийных схем синтеза [4, 5] в одну стадию частичным бензилированием бензил-2-ацетида-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозидом 3 экв. бромистого бензила в присутствии окиси и гидроокиси бария в диметилформамиде. Кроме целевого продукта (IX), выход которого составил 26%, хроматографией на колонке выделены его изомеры (VIII) (следы) и (X), а также пербензилированное (XII) и монобензилированное (XI) производные, причем последнее является основным продуктом реакции.

Состав целевых гликопептидов (I) и (II) и их предшественников (V) и (VI) подтвержден кислотным гидролизом (6 М HCl, 100°C, 16 ч) и идентификацией в гидролизате L-аланина, D-глутаминовой кислоты и соответствующих производных N-ацетил-D-глюкозамина в соотношении, близком к 1 : 1 : 1.

Когда настоящая работа была завершена и готовилась к публикации, появилось краткое сообщение японских авторов [6] о синтезе соединений (I) и (II), а также других аналогов MDP. Поскольку в цитируемой работе не приводится описание эксперимента и есть различия в схеме синтеза, мы сочли возможным представить наши результаты.

Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на приборе «Boetius» (ГДР). Оптическое вращение измеряли на поляриметре «Perkin-Elmer 141» (США) при 20–25°C. Спектры ПМР сняты на спектрометре «Varian XL-100» (США) при 100 МГц (шкала δ в м.д. от тетраметилсилана). ИК-спектры записаны на приборе UR-20 (ГДР) в вазелиновом масле. ТСХ проводили на пластинках «Silufol UV-254» (Chemapol, ЧССР) и на пластинках «Kieselgel F-60» (Merck, ФРГ). Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле L40–100 мкм (Chemapol, ЧССР). Растворители упаривали в вакууме при 30–40°C.

Бензилирование бензил-2-ацетида-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозидом. К раствору 3,0 г бензил-2-ацетида-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозидом [7] в 80 мл сухого диметилформамида добавляли 5,9 г BaO и 3,0 г Ba(OH)₂·8H₂O. При интенсивном перемешивании к суспензии добавляли 3,44 мл бромистого бензила и перемешивали 16 ч при 20°C. Реакционную массу разбавляли 100 мл хлороформа, промывали 20% HCl (для растворения осадка) и водой до pH 7. Органическую фазу сушили CaCl₂ и упаривали. Хроматографией на колонке остатка в системах бензол–хлороформ (1 : 4) и далее хлороформ–метанол (10 : 1) выделяли (в порядке элюции) следующие продукты: бензил-2-ацетида-2-дезоксид-3,4,6-три-O-бензил-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозид (XII), выход 7%, т. пл. 173–173,5°C (из смеси хлороформ–эфир), $[\alpha]_D^{20} +110^\circ$ (с 2,7; хлороформ), по данным [5]: т. пл. 175–176°C, $[\alpha]_D^{20} +111^\circ$ (с 1,1; хлороформ); бензил-2-ацетида-2-дезоксид-3,6-ди-O-бензил-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозид (IX), выход 26%, т. пл. 144–145°C (из смеси этилацетат–эфир), $[\alpha]_D +114^\circ$ (с 1,1; хлороформ), по данным [4]: т. пл. 144–144,5°C, $[\alpha]_D^{20} +114^\circ$ (с 1; хлороформ); бензил-2-ацетида-

до-4,6-ди-О-бензил-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозид (X), выход 19%, т. пл. 108–109° С (из спирта), $[\alpha]_D^{20} +120^\circ$ (с 1,4; хлороформ), по данным [8]: т. пл. 110–111° С, $[\alpha]_D^{20} +123^\circ$ (с 1; хлороформ); бензил-2-ацетиамидо-3,4-ди-О-бензил-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозид (VIII), выход 2%, т. пл. 200–202° С (из этилацетата), $[\alpha]_D^{20} +118^\circ$ (с 1,1; хлороформ), по данным [4]: т. пл. 204–205° С, $[\alpha]_D^{20} +121^\circ$ (с 0,73; хлороформ); бензил-2-ацетиамидо-6-О-бензил-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозид (XI), выход 43%, т. пл. 186–186,5° С (из спирта), $[\alpha]_D^{20} +146^\circ$ (с 1,1; метанол), отличающийся, по данным ТСХ, от 3-О- и 4-О-бензильных производных. Найдено, %: С 68,57; Н 7,21; N 3,62. C₂₂H₂₇NO₅. Вычислено, %: С 68,55; Н 7,06; N 3,63.

Бензил-2-ацетиамидо-3,4-ди-О-бензил-6-О-[(R)-1-карбоксиэтил]-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозид (III). К раствору 0,88 г (1,8 ммоль) бензилированного производного (VIII) [4] в 30 мл сухого диоксана добавляли 0,40 г (13 ммоль) 80% суспензии гидрида натрия в масле и перемешивали 45 мин при 95° С. После охлаждения до 65° С добавляли 1,10 мл (12,7 ммоль) (S)-2-хлорпропионовой кислоты [9]. Через 1 ч добавляли еще 2,00 г (67 ммоль) 80% суспензии гидрида натрия и перемешивание продолжали 2 ч при 65° С. После охлаждения добавляли 5 мл воды и реакционную смесь упаривали. Остаток суспендировали в 50 мл воды и промывали хлороформом, водный раствор подкисляли 2 М HCl до pH 2. Продукт экстрагировали хлороформом (5×10 мл), хлороформный раствор высушивали CaCl₂ и раствор упаривали. Продукт очищали хроматографией на колонке (20×300 мм) с градиентной элюцией в смеси хлороформ–метанол (от 20:1 до 10:1). Кристаллизацией выделенного сиропа из смеси этилацетат–гексан получено 0,91 г (89%) соединения (III), т. пл. 164–165° С, $[\alpha]_D^{20} +108^\circ$ (с 1,6; хлороформ), по данным [6]: т. пл. 165–166° С, $[\alpha]_D^{22} +75^\circ$ (с 0,3; хлороформ); ПМР (CDCl₃): 1,27 д (3H, J 7 Гц, CH₃), 1,78 с (3H, Ac), 4,89 д (1H, J_{1,2} 4 Гц, 1-H), 5,31 д (1H, J_{NH,2} 8,5 Гц, NH), 7,28 с (15H, 3Ph), 9,77 с (1H, COOH); ИК (v, см⁻¹): 3300 (NH), 1738 (COOH), 1648 и 1551 (амиды I и II), 748 и 700 (Ph). Найдено, %: С 68,10; Н 6,63; N 2,46. C₃₃H₃₇NO₈. Вычислено, %: С 68,08; Н 6,61; N 2,48.

2-(Бензил-2-ацетиамидо-3,4-ди-О-бензил-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозид-6-илокси)-(R)-пропионил-L-аланил- γ -бензилокси-D-изоглутамин (V). К охлажденному до 0° С раствору 0,62 г (1,1 ммоль) производного (III) в 5 мл тетрагидрофурана добавляли 0,13 г (1,1 ммоль) N-оксисулцинимиды и 0,23 г (1,1 ммоль) дициклогексилкарбодимиды, перемешивали 2 ч при 0° С и отфильтровывали дициклогексилмочевину. К фильтрату добавляли раствор 0,47 г (1,1 ммоль) трифторацетата бензилового эфира L-аланил-D-изоглутамин [2, 3] и 0,15 мл (1,1 ммоль) триэтиламина в 5 мл тетрагидрофурана и перемешивали 12 ч при 20° С. Реакционную массу упаривали и очищали фильтрацией через слой силикагеля с элюцией смесью хлороформ–метилэтилкетон–уксусная кислота, 80:16:2. Фильтрат упаривали и получали 0,78 г (83%) хроматографически чистого продукта (V), закристаллизовавшегося при концентрировании элюата, т. пл. 217–218° С (с возгонкой при 165–198° С), $[\alpha]_D^{20} +67^\circ$ (с 0,8; метанол), по данным [6]: $[\alpha]_D^{20} +64^\circ$ (с 0,9; хлороформ); ПМР (DMSO-d₆): 1,21 д, 1,26 д (6H, J 6 Гц, CH₃, Ala и CH₃, лактил), 1,86 с (3H, Ac), 2,38 т (2H, J 7 Гц, CH₂COOBzl), 5,50 с (2H, COOCH₂Ph), 7,14 с (2H, CONH₂), 7,29–7,39 м (20 H, 4Ph), 7,91 д (1H, J 7 Гц, CONH), 8,17 д (2H, J 8 Гц, 2 CONH). Найдено, %: С 66,09; Н 6,81; N 6,53. C₄₇H₅₇N₄O₁₁. Вычислено, %: С 66,18; Н 6,62; N 6,57.

2-(2-Ацетиамидо-2-дезоксид-D-глюкопираноз-6-илокси)-(R)-пропионил-L-аланил-D-изоглутамин (I). 410 мг бензилового эфира (V) растворяли в 40 мл метанола при нагревании, добавляли 45 мг 10% Pd/C и гидрировали 6 сут при 20° С, но гидрирование полностью не прошло. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток хроматографировали на

колонке (20×250 мм) в системе хлороформ — метанол (от 5:1 до 2:1). Получено два продукта. Выход α -бензилгликозида (VII) 160 мг (56%), $[\alpha]_D^{+96}$ (с 1,2; метанол), ПМР (D₂O): 1,43 д (6H, J 7 Гц, CH₃, Ala и CH₃, лактил), 2,00 с (3H, Ac), 2,49 т (2H, J 7 Гц, CH₂COOH), 4,97 д (1H, J 3 Гц, 1-H), 7,46 с (5H, Ph); ИК (ν, см⁻¹): 1735 (COOH), 1660 и 1540 (амиды I и II), 730 и 700 (Ph). Найдено, %: С 52,00; Н 7,04; N 9,11. C₂₆H₃₈N₄O₁₁·H₂O. Вычислено, %: С 51,99; Н 6,71; N 9,32. Выход гликопептида (I) 140 мг (40%), $[\alpha]_D^{20} +27^\circ$ (с 0,9; метанол), по данным [6]: $[\alpha]_D^{+24}$ (с 1,0; метанол), ПМР (D₂O): 1,44 д и 1,54 д (6H, J 6 и 7 Гц, CH₃, Ala и CH₃, лактил), 2,12 с (3H, Ac), 2,57 т (2H, J 7 Гц, 1-H); ИК (ν, см⁻¹): 1730 (COOH), 1663 и 1537 (амиды I и II). Найдено, %: С 45,34; Н 6,89; N 10,96. C₁₉H₃₂N₄O₁₁·0,6H₂O. Вычислено, %: С 45,34; Н 6,64; N 11,13.

Бензил-2-ацетамидо-3,6-ди-О-бензил-4-О-[(R)-1-карбоксиветил]-2-дезоксис-α-D-глюкопиранозид (IV). К раствору 5,0 г (10 ммоль) производного (IX) в 100 мл сухого диоксида добавляли 0,91 г (31 ммоль) 80% суспензии гидроксида натрия в масле и перемешивали 1 ч при 90–95°С. После охлаждения до 65°С добавляли 3,6 мг (16 ммоль) (S)-2-хлорпропионовой кислоты и перемешивали еще 1 ч при 65°С. Добавляли 2,14 г (71 ммоль) гидроксида натрия и перемешивали 5 ч при 65°С. К реакционной массе осторожно приливали 10 мл воды при охлаждении и раствор упаривали до сиропа. Остаток суспендировали в 200 мл воды и промывали хлороформом. Водный раствор подкисляли 2 М HCl до pH 2 и продукт экстрагировали хлороформом (5×60 мл). Хлороформный раствор промывали водой и высушивали CaCl₂. Из хлороформного раствора хроматографией на колонке (15×250 мм) в системе хлороформ — пиридин (50:1) выделено 4,6 г сиропа, кристаллизация которого из смеси этилацетат — эфир дала 4,4 г (77%) кристаллического продукта, т. пл. 135–136°С, $[\alpha]_D^{20} +137^\circ$ (с 1,2; хлороформ), по данным [6]: т. пл. 139–140°С, $[\alpha]_D^{22} +127^\circ$ (с 1,0; хлороформ); ПМР (CDCl₃—CCl₄, 1:1): 1,34 д (3H, J 7 Гц, CH₃), 1,76 с (3H, Ac), 4,87 д (1H, J 4 Гц, 1-H), 5,38 д (1H, J 7,5 Гц, NH), 7,29 с (15H, 3Ph), 10,74 с (1H, COOH); ИК (ν, см⁻¹): 3300 (NH), 1718 (COOH), 1645 (амид I), 736 и 700 (Ph). Найдено, %: С 68,01; Н 6,69; N 2,47. C₃₂H₃₇NO₈. Вычислено, %: С 68,08; Н 6,61; N 2,48.

2-(Бензил-2-ацетамидо-3,6-ди-О-бензил-2-дезоксис-α-D-глюкопиранозид-4-илокси)-(R)-пропионил-L-аланил-γ-бензилокси-D-изоглутамин (VI). К раствору 0,62 г (1,1 ммоль) производного (IV) в 5 мл тетрагидрофурана при 0°С добавляли 0,13 г (1,1 ммоль) N-оксисукцинимида и 0,23 г (1,1 ммоль) дициклогексилкарбодимида и перемешивали 3 ч при 0°С. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, а к фильтрату добавляли раствор 0,47 г (1,1 ммоль) трифторацетата бензилового эфира L-аланил-D-изоглутамин и 0,15 мл (1,1 ммоль) триэтиламина в 5 мл тетрагидрофурана и перемешивали 12 ч при 20°С. Реакционную массу упаривали и хроматографировали на колонке (25×300 мм) в системе хлороформ — метанол, 20:1. Получено 0,88 г (94%) хроматографически чистого продукта (VI), $[\alpha]_D^{20} +74^\circ$ (с 1,9; хлороформ), по данным [6]: $[\alpha]_D^{22} +67^\circ$ (с 1,0; хлороформ — метанол, 1:1); ПМР (DMSO-d₆): 1,24 д (6H, J 7 Гц, CH₃, Ala и CH₃, лактил), 1,86 с (3H, Ac), 2,4 т (2H, J 7 Гц, CH₂COOBzl), 5,09 с (2H, COOCH₂Ph), 7,16 с (2H, NH₂), 7,29–7,38 м (20 H, 4 Ph), 7,48 д (1H, J 7 Гц, NH), 8,13 д (1H, J 7 Гц, NH), 8,18 д (1H, J 8 Гц, NH); ИК (ν, см⁻¹): 3305 (NH), 17,35 (COOR), 1650 и 1550 (амиды I и II), 740 и 700 (Ph). Найдено, %: С 66,22; Н 6,81; N 6,53. C₄₇H₅₆N₄O₁₁. Вычислено, %: С 66,18; Н 6,61; N 6,57.

2-(2-Ацетамидо-2-дезоксис-D-глюкопираноз-4-илокси)-(R)-пропионил-L-аланил-D-изоглутамин (II). К раствору 340 мг бензилового эфира (VI) в 30 мл метанола добавляли 40 мг 10% Pd/C и гидрировали 3 сут при 20°С, катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Получено 195 мг (99%) хроматографически чистого продукта, $[\alpha]_D^{20} +52^\circ$ (с 0,7; метанол),

по данным [6]: $[\alpha]_D^{22} +55^\circ$ (с 0,3; метанол); ПМР (D₂O): 1,46 д (6H, J 7 Гц, СН₃, Ala и СН₃, лактил), 2,10 с (3H, Ac), 2,56 т (2H, J 7 Гц, СН₂СООН), 5,23 д (1H, J 3 Гц, 1-H); ИК (ν, см⁻¹): 1725 (СООН), 1665 и 1535 (амиды I и II). Найдено, %: С 45,15; Н 6,67; N 10,80. С₁₉Н₃₂N₄O₁₁ · 0,7Н₂O. Вычислено, %: С 45,18; Н 6,66; N 11,09.

Авторы выражают благодарность чл.-кор. АН СССР В. Т. Иванову за полезное обсуждение результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mercer P., Sinaï P., Adam A. Total synthesis and adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 66, № 4, p. 1316–1322.
2. Kusumoto S., Tarumi Y., Ikenaka K., Shiba T. Chemical synthesis of N-acetylmuramyl peptides with partial structures of bacterial cell wall and their analogs in relation to immunoadjuvant activities.— *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1976, v. 49, № 2, p. 533–539.
3. Lefrancier P., Choay J., Derrien M., Lederman I. Synthesis of N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, an adjuvant of the immune response, and of some N-acetylmuramyl-peptide analogs.— *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1977, v. 9, № 4, p. 249–257.
4. Jacquinet J.-C., Petit J.-M., Sinaï P. Synthèses du benzyl-2-acétamido-3,6-di-O-benzyl-2-désoxy-α-D-glucopyranoside.— *Carbohydr. Res.*, 1974, v. 38, № 2, p. 305–311.
5. Jacquinet J.-C., Sinaï P. Une synthèse du 2-acétamido-2-désoxy-4-O-β-D-galactopyranosyl-α-D-glucopyranose (N-acetyl-lactosamine).— *Carbohydr. Res.*, 1976, v. 46, № 1, p. 138–142.
6. Kiso M., Kaneda Y., Gon Y., Hasegawa A., Azuma I. Synthesis of positional and configurational isomers of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) and their immunoadjuvant activities.— *Agricult. Biol. Chem.*, 1980, v. 44, № 8, p. 1971–1973.
7. Шульман М. Л., Абрамова Г. В., Пискаева В. П., Хорлин А. Я. Синтез 2-ацетамидо-6-О-(2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозидов.— *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1971, № 3, с. 630–632.
8. Бовин Н. В., Зурабян С. Э., Хорлин А. Я. Бензилирование бензил-2-ацетамидо-3,6-ди-О-ацетил-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозидов.— *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1980, № 1, с. 199–201.
9. Sinaï P., Halford M. D. A., Choudhary M. S., Gross P. H., Jeanloz R. W. The synthesis of the D-manno analogue of muramic acid, 2-amino-3-O-(D-1-carboxyethyl)-2-deoxy-D-mannose.— *J. Biol. Chem.*, 1972, v. 247, № 2, p. 391–397.

Поступила в редакцию
4.I.1981

SYNTHESIS OF N-ACETYL-MURAMYL-DIPEPTIDE ISOMERS DIFFERING IN POSITION OF THE LACTYLDIPEPTIDE MOIETY IN THE CARBOHYDRATE RESIDUE

ABASHEV Yu. P., ANDRONOVA T. M., ZURABYAN S. E., KHORLIN A. Ya.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The isomers of N-acetylmuramyl-dipeptide bearing the lactyldipeptide moiety at C₍₆₎ or C₍₂₎ position of N-acetyl-D-glucosamine were synthesized.