

УДК 547.963.1

## СИНТЕЗ И АНТИИНФЕКЦИОННОЕ ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ $\beta$ -ЦИКЛОГЕКСИЛМЕТИЛ- И $\beta$ -2-ЦИКЛОГЕКСИЛЭТИЛГЛИКОЗИДОВ МУРАМОИЛДИПЕПТИДА

А.Е.Земляков, В.Н.Цикалова, В.В.Цикалов, В.Я.Чирва, О.В.Калюжин\*

Таврический национальный университет им. В.И.Вернадского  
95007, г. Симферополь, пр. Акад. Вернадского 4. E-mail: alex\_z56@mail.ru

\* НИИ морфологии человека РАМН, г. Москва

*Ключевые слова: гликопептиды; гликозиды мурамоилдипептида; оксазолиновый метод; антиинфекционная резистентность*

**Осуществлен синтез  $\beta$ -циклогексилметил- и  $\beta$ -2-циклогексилэтилгликозидов мурамоилдипептида. Исходные перацетилированные  $\beta$ -циклогексилалкилглюкозаминиды были получены оксазолиновым методом. Установлено, что  $\beta$ -циклогексилметил- и  $\beta$ -(2-циклогексилэтил)-МДП обладают высоким антиинфекционным протективным эффектом при поражении мышей летальной дозой *Staphylococcus aureus*.**

**SYNTHESIS AND ANTI-INFECTION PROTECTIVE ACTION OF  $\beta$ -CYCLOHEXYLMETHYL- AND  $\beta$ -2-CYCLOHEXYLETHYLGLYCOSIDES OF MURAMYLDIPEPTIDE**

**O.Ye.Zemlyakov, V.M.Tsikalova, V.V.Tsikalov, V.Ya.Chirva, O.V.Kalyuzhin**

*The synthesis of  $\beta$ -cyclohexylmethyl- and  $\beta$ -2-cyclohexylethylglycosides of muramyldipeptide has been carried out. The starting peracetates of  $\beta$ -cyclohexylalkylglucosaminides have been obtained by the oxazoline method. It been found that  $\beta$ -cyclohexylmethyl- and  $\beta$ -(2-cyclohexylethyl)-MDP have a high anti-infection protective effect against the lethal dose of *Staphylococcus aureus* in mice.*

**СИНТЕЗ І АНТИІНФЕКЦІЙНА ПРОТЕКТИВНА ДІЯ  $\beta$ -ЦИКЛОГЕКСИЛМЕТИЛ- І  $\beta$ -2-ЦИКЛОГЕКСИЛЭТИЛГЛІКОЗИДІВ МУРАМОЇЛДИПЕПТИДУ**

**О.Є.Земляков, В.М.Цикалова, В.В.Цикалов, В.Я.Чирва, О.В.Калюжин**

*Здійснено синтез  $\beta$ -циклогексилметил- і  $\beta$ -2-циклогексилетилглікозидів мурамоїлдипептиду. Вихідні перацетильовані  $\beta$ -циклогексилалкілглюкозамініди були отримані за оксазолиновим методом. Встановлено, що  $\beta$ -циклогексилметил- і  $\beta$ -(2-циклогексилетил)-МДП володіють високим антиінфекційним протективним ефектом при поразці мишей летальною дозою *Staphylococcus aureus*.*

$\beta$ -Гликозилирование *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина (мурамоилдипептида, МДП) является удобным и эффективным способом модификации данного соединения [1]. Введение агликонов различной природы изменяет гидрофильно-липофильный баланс производных МДП и, соответственно, влияет на биологическую активность [2]. Среди исследованных нами  $\beta$ -гликозидов мурамоилдипептида наибольший биологический эффект наблюдался для соединений с агликонами, содержащими 6-8 атомов углерода [1, 3], что придает им амфифильные свойства, а также для высоколипофильных гликопептидов [4, 5].

С целью установления влияния на биологическую активность гликозидов мурамоилдипептида природы агликона в дополнении к ранее полученным амфифильным гликозидам МДП с агликонами алифатического, алициклического и ароматического строения осуществлен синтез  $\beta$ -циклогек-

силметил- и  $\beta$ -2-циклогексилэтилгликозидов мурамоилдипептида **8a,b**.

Модифицирующие компоненты вводили на начальной стадии синтеза (см. схему на рис. 1). Оксазолиновым методом были получены перацетилированные  $\beta$ -циклогексилметил- и  $\beta$ -2-циклогексилэтилгликозиды *N*-ацетилглюкозамина **2a,b**. Взаимодействие оксазолина **1** с избытком спиртов осуществляли в дихлорэтане при температуре  $\sim 90^\circ\text{C}$  в присутствии каталитических количеств TsOH. Строение гликозидов **2a,b** подтвердили  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопией (табл.). Сделано полное отнесение всех сигналов. Дублеты аномерного протона находятся в области  $\delta$  4,64-4,69 м.д. и имеют КССВ 8 Гц, что характерно для 1,2-*транс*-конфигурации *D*-глюкозаминидов. Неэквивалентные протоны оксиметиленовой группы агликона соединений **2a,b**, соответственно, представлены двумя дублет-дублетами с ХС 3,23 и 3,70 м.д. и двумя дублет-дуб-

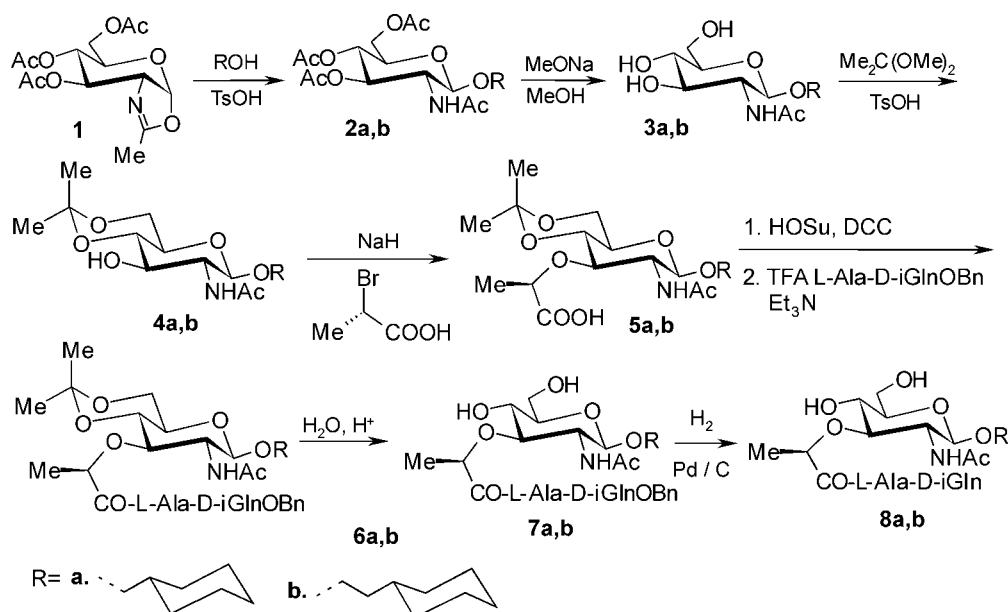


Рис. 1. Схема синтеза.

летами с ХС 3,52 и 3,90 м.д. Для гликозида **2b** дополнительно идентифицирован мультиплет второй метиленовой группы с ХС 1,46 м.д.

Далее соединения **2a,b** дезацетилировали по Земплену и действием 2,2-диметоксипропана в полученных триолах **3a,b** защитили β-диольную

группировку. Последовательная обработка диоксановых растворов ацеталей **4a,b** гидридом натрия и L-2-бромпропионовой кислотой дала защищенные N-ацетил-D-мурамовые кислоты **5a,b**. Конденсацию этих кислот с бензиловым эфиром L-аланил-D-изоглутамина проводили N-гидроксисук-

Таблица

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектры соединений 2a,b и 7a,b

Группа или атом	Химические сдвиги, м.д. (КССВ, Гц)			
	2a	2b	7a	7b
C1-(OCH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	3,23дд, 3,70дд	1,46м, 3,52ддд, 3,90ддд		
C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	0,89м, 1,19м, 1,69м	0,88м, 1,18м, 1,67м	0,86м, 1,15м, 1,62м	0,86м, 1,15м, 1,63м
H1 (J <sub>1,2</sub> )	4,64д (8,0)	4,69д (8,0)	4,26д (8,5)	4,23д (8,5)
H2 (J <sub>2,3</sub> )	3,84ддд (10,5)	3,80ддд (10,0)		
H3 (J <sub>3,4</sub> )	5,30дд (9,5)	5,32дд (9,5)		
H4 (J <sub>4,5</sub> )	5,07дд (9,5)	5,07дд (9,5)		
H5 (J <sub>5,6a</sub> ; J <sub>5,6b</sub> )	3,69ддд (2,0; 4,5)	3,70ддд (2,0; 5,0)		
H <sub>6a,b</sub> (J <sub>6a,6b</sub> )	4,13дд, 4,27дд (12,5)	4,13дд, 4,27дд (12,5)		
Oac	2,03с, 2,04с, 2,09с	2,03с, 2,04с, 2,09с		
Nac	1,95с	1,95с	1,76с	1,75с
NHAc (J <sub>2,NH</sub> )	5,54д (8,5)	5,50д (8,5)	7,78д	7,81д
NH-Ala			7,38д	7,40д
NH-iGln			8,08д	8,12д
C4-OH			5,21д	5,26д
C6-OH			4,54т	4,59т
CH <sub>3</sub> CH (J <sub>Me,CH</sub> )			1,24д (7,0)	1,24д (6,5)
iGln: CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph			5,08с, 7,36м	5,08с, 7,36м
γ-CH <sub>2</sub>			2,36т	2,36т
β-CH <sub>2</sub>			1,79м, 2,02м	1,78м, 2,02м
CONH <sub>2</sub>			7,09с, 7,31с	7,12с, 7,32с

Растворитель - CDCl<sub>3</sub> (соединения **2a,b**), DMSO-d<sub>6</sub> (соединения **7a,b**).

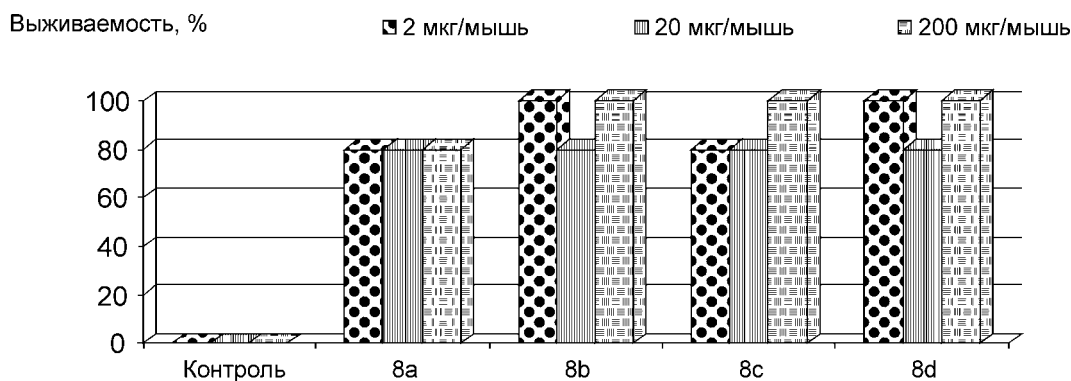


Рис. 2. Влияние гликозидов МДП **8a-d** на протективный эффект к внутрибрюшному заражению мышей культурой *S. aureus* ( $10^9$  клеток/мышь), дозы указаны на рисунке.

цинимидным методом. Ацетальные защиты в гликопептидах **6a,b** сняли кислотным гидролизом. Строение диольных производных **6a,b** подтвердили  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопией (табл.). Завершающее удаление каталитическим гидрогенолизом бензиловых защит в остатке изоглутамина соединений **7a,b** привело к целевым гликозидам **8a,b**.

Иммуномодулирующую активность  $\beta$ -циклогексилалкилгликозидов мурамоилдипептида **8a,b**, а также ранее синтезированных  $\beta$ -гептил- и  $\beta$ -*n*-толилгликозидов МДП **8c,d** [6, 7], изучали на модели сепсиса, вызываемого внутрибрюшным введением летальной дозы *Staphylococcus aureus* по модифицированной методике [8, 9], в диапазоне доз 2-200 мкг/мышь. Полученные результаты, приведенные на рис. 2, свидетельствуют о том, что все исследованные соединения эффективно активируют иммунную систему. В то же время для этой группы соединений с С7-С8-агликонами не выявлено зависимости антибактериальной резистентности от природы агликона, что контрастирует с ранее полученными результатами для  $\beta$ -гликозидов МДП с агликонами С10-С14, у которых строение агликонного фрагмента существенно влияло на биологический эффект [5, 10]. Ранее сообщалось, что адьювантная активность  $\beta$ -бензил-МДП, также имеющего С7-агликон, сравнима с действием мурамоилдипептида [11].

#### Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на приборе ПТП, оптическое вращение при 20-25°C — на поляриметре Polamat-A ( $\lambda$  546 нм). Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР получены на приборе Varian VXR-300 (300 МГц), внутренний стандарт —  $\text{Me}_4\text{Si}$ . Приведены химические сдвиги ( $\delta$ -шкала) и константы спин-спинового взаимодействия ( $J$ , Гц).

ТСХ проводили на пластинках Sorbfil-АФВ-УФ (“Сорбполимер”, Россия). Вещества обнаруживали 2% раствором серной кислоты в бутаноле-1 с последующим нагреванием при 200-300°C. Использовали системы растворителей: хлороформ — этанол, 15:1 (А), 5:1 (Б), 3:1 (В); бензол — этанол, 10:1 (Г). Колоночную хроматографию (КХ) проводили на силикагеле Merck 230-400 меш.

Данные элементного анализа ключевых соединений соответствуют расчетным значениям. В работе использовали циклогексилметанол и 2-циклогексилэтанол-1 (Lancaster, Великобритания).

#### Материалы и методы

Исследование биологической активности проводили по модифицированной методике [8, 9]. В экспериментах использовали белых беспородных мышей  $m = 12-14$  г (Центральный питомник экспериментальных животных, отделение “Крюково”) возрастом 20-25 дней (группы по 5 животных).

Исследуемые препараты, растворенные в 0,9% NaCl, вводили в конечном объеме 0,5 мл внутрибрюшинно в дозах 200, 20 и 2 мкг на мышь. Мышам контрольной группы внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл 0,9% NaCl. Через 24 ч животных заражали культурой *Staphylococcus aureus* (штамм Wood 46). Наблюдение за животными вели в течение 6 дней. Эффективность препаратов оценивали по проценту выживших животных.

В предварительных опытах было определено необходимое для заражения количество микробных тел ( $10^9$ ), составляющее минимальную дозу, вызывающую при внутрибрюшном введении 100% гибель животных в течение первых 3 дней.

**Циклогексилметил-2-ацетиламино-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксид- $\beta$ -D-глюкопиранозид (2a)**. К раствору 1,4 г (4,25 ммоль) 2-метил-(3,4,6-три-*O*-ацетил-1,2-дидезокси- $\alpha$ -D-глюкопирано)-[2,1-*d*]-2-оксазолина (**1**) [12] в 15 мл сухого дихлорэтана добавили 0,74 мл (6,1 ммоль) циклогексилметанола и 20 мг безводной TsOH. Реакцию проводили при 85-95°C (температура бани) до полного разложения оксазолина **1** (контроль ТСХ в системах А и Г). Реакционную смесь нейтрализовали 30 мкл пиридина и упарили. Гликозид **2a** (1,24 г, 45,9%) выделили колоночной хроматографией (элюент: бензол  $\rightarrow$  бензол-пропанол-2, 50:1  $\rightarrow$  20:1) с последующей кристаллизацией из диэтилового эфира. Т.пл. — 129-133°,  $[\alpha]_{546} -29^\circ$  ( $c$  1.0; хлороформ),  $^1\text{H}$ -ЯМР (табл.).

Подобным образом было получено 1,06 г (30,6%) (**2-циклогексилэтил-2-ацетиламино-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксид- $\beta$ -D-глюкопиранозид (2b)**). Т.пл. —

140-145°C,  $[\alpha]_{546} -21^\circ$  (*c* 1,0; хлороформ),  $^1\text{H-NMR}$  (табл.).

**Циклогексилметил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (3a)**. 1,2 г (2,71 ммоль) ацетата **2a** розпустили в 50 мл сухого метанола и добавили 0,5 мл 0,1 н. раствора метилата натрия в метаноле. Выпавший при стоянии осадок отфильтровали, промыли холодным метанолом. Маточный раствор нейтрализовали катионом КУ-2 ( $\text{H}^+$ ), смола промыли метанолом и фильтрат упарили. Общий выход соединения **3a** — 0,80 г (93,0%). Т.пл. — 150-157°C (*c* разл.),  $[\alpha]_{546} -27^\circ$  (*c* 1,0; этанол).

Аналогично было получено 0,65 г (94,5%) **(2-циклогексилэтил)-2-ацетиамидо-β-D-глюкопиранозид (3b)**. Т.пл. — 178-183°C (*c* разл.),  $[\beta]_{546} -23^\circ$  (*c* 1,0; этанол).

**Циклогексилметил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-4,6-О-изопропилиден-β-D-глюкопиранозид (4a)**. Суспензию 0,51 г (1,61 ммоль) вещества **3a** в 20 мл сухого THF нагрели при перемешивании до 50-55°C и добавили 1,0 мл 2,2-диметоксипропана и 10 мг TsOH. Через 1 час (контроль ТСХ в системе А) реакционную смесь охладил, нейтрализовал пиридином и упарили. Остаток очистили КХ (элюент: бензол-пропанол-2, 50:1 → 10:1) и получили 0,50 г (87,1%) ацетата **4a**; стеклообразное вещество,  $[\alpha]_{546} -81^\circ$  (*c* 0,67; хлороформ).

Аналогично было получено 0,52 г (77,6%) **(2-циклогексилэтил)-2-ацетиамидо-4,6-О-изопропилиден-β-D-глюкопиранозид (4b)**; стеклообразное вещество,  $[\alpha]_{546} -63^\circ$  (*c* 1,0; хлороформ).

**Бензиловый эфир О-(циклогексилметил-2-ацетиамидо-2,3-дидезокси-β-D-глюкопиранозид-3-ил)-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (7a)**. К суспензии 490 мг (1,37 ммоль) соединения **4a** в 20 мл сухого диоксана при перемешивании порциями добавили 4 экв. гидрида натрия. Реакционную смесь нагрели до 95°C, выдержали при этой температуре 1 ч и после охлаждения до 65°C прилили 0,17 мл (2,06 ммоль) (S)-2-бромпропионовой кислоты и выдержали при 65°C еще 3 ч. После охлаждения избыток гидрида натрия разложили этанолом, смесь концентрировали и вылили в 50 мл холодной воды. Раствор подкислили 2 н. HCl до pH 3-4 и экстрагировали муравовую кислоту хлороформом (3×30 мл). Экстракт высушили безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили. Получили 490 мг (84,4%) муравовой кислоты **5a**.

К раствору 490 мг (1,14 ммоль) кислоты **5a** в 10 мл сухого THF при перемешивании добавили 115 мг (0,99 ммоль) HOSu и 205 мг (0,99 ммоль) DCC. Через 5 ч отфильтровали осадок дициклогексилмочевины и промыли его растворителем. К фильтрату прибавили трифторацетат бензилового эфира L-аланил-D-изоглутамин (получен обработкой 470 мг (1,14 ммоль) соответствующего

Вос-производного TFA с последующим упариванием досуха) и 180 мкл (1,17 ммоль)  $\text{Et}_3\text{N}$ . По окончании реакции (контроль ТСХ в системе А) реакционную смесь упарили. Остаток растворили в 70 мл хлороформа, раствор промыли 25 мл 1 н. HCl, 25 мл насыщенного раствора  $\text{NaHCO}_3$  и 25 мл воды. Органический слой высушили безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили.

Полученный гликопептид **6a** растворили при нагревании на кипящей водяной бане в 10 мл 70% уксусной кислоты и выдержали при этой температуре 15 мин (контроль ТСХ в системе Б). Раствор упарили досуха, остаток соупарили с толуолом. Остаток очистили КХ (градиентный элюент: хлороформ → хлороформ-этанол, 10:1). Выход гликопептида **7a** — 320 мг (41,5%); аморфный порошок,  $[\alpha]_{546} +3^\circ$  (*c* 1,0; этанол).  $^1\text{H-NMR}$  — табл.

Аналогично было получено 280 мг (34,6%) **бензилового эфира О-[(2-циклогексилэтил)-2-ацетиамидо-2,3-дидезокси-β-D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (7b)**; аморфный порошок  $[\alpha]_{546} +3^\circ$  (*c* 1,0; этанол-хлороформ, 2:1),  $^1\text{H-NMR}$  — табл.

**О-(Циклогексилметил-2-ацетиамидо-2,3-дидезокси-β-D-глюкопиранозид-3-ил)-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (8a)**. Бензиловый эфир **7a** (300 мг, 0,44 ммоль) растворили в 30 мл смеси THF — вода (9:1) и подвергли гидрогенолизу над 50 мг 10% Pd/C при комнатной температуре в течение 4 ч (контроль ТСХ в системе В). Катализатор отфильтровали, промыли 5 мл смеси растворителей, фильтрат упарили досуха. Добавлением эфира высадили 250 мг (97,0%) аморфного гликопептида **8a**;  $[\alpha]_{546} +3^\circ$  (*c* 1,0; этанол).

Аналогично было получено 230 мг (95,4%) аморфного **О-[(2-циклогексилэтил)-2-ацетиамидо-2,3-дидезокси-β-D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (8b)**,  $[\alpha]_{546} +3^\circ$  (*c* 1,0; этанол).

## Выводы

1. Осуществлен синтез β-циклогексилметил- и β-2-циклогексилэтилгликозидов N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамин.

2. Установлено, что β-циклогексилметил- и β-2-циклогексилэтил-МДП обладает высоким антиинфекционным протективным эффектом при поражении мышей летальной дозой *Staphylococcus aureus*.

3. В отличие от гликопептидов с  $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{14}$ -агликонами для β-гликозидов МДП с  $\text{C}_7$ - $\text{C}_8$ -агликонами не выявлено влияния природы агликона на индукцию антибактериальной резистентности к *S. aureus*.

## Литература

1. Земляков А.Е., Цикалов В.В., Калюжин О.В. и др. // Биоорг. химия. — 2003. — Т. 29, №3. — С. 316-322.
2. Kaluzhin O.V., Zemlyakov A.E., Fuchs B.B. // Int. J. Immunopharmac. — 1996. — Vol. 18, №11. — P. 651-659.
3. Караулов А.В., Калюжин О.В., Земляков А.Е. // Рос. биотерапевт. журн. — 2002. — Т. 1, №1. — С. 14-24.

4. Земляков А.Е., Цикалова В.Н., Цикалов В.В. и др. // *Биоорг. химия*. — 2006. — Т. 32, №4. — С. 424-431.
5. Калюжин О.В., Земляков А.Е., Калина Н.Г. и др. // *Бюл. exper. биол.* — 2008. — Т. 145, №5. — С. 561-564.
6. Земляков А.Е., Чирва В.Я. // *ХПС*. — 1987. — №5. — С. 714-718.
7. Земляков А.Е., Цикалова В.Н., Цикалов В.В., Чирва В.Я. // *ЖОФХ*. — 2004. — Т. 2, вип. 3 (7). — С. 17-20.
8. Калюжин О.В., Мулик Е.Л., Сергеев В.В. и др. // *Иммунопатол., алергол., инфектол.* — 2000. — №4. — С. 73-77.
9. Хаитов Р.М., Гуцин И.С., Пинегин Б.Ф., Зебрев А.И. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. — М.: ИИА "Ремедиум", 2000. — С. 257-263.
10. Земляков А.Е., Цикалова В.Н., Цикалов В.В. и др. // *Биоорг. химия*. — 2005. — Т. 31, №6. — С. 637-644.
11. Azuma I., Okumura H., Saiki I. et al. // *Infect. Immunol.* — 1981. — Vol. 33, №1. — P. 834-839.
12. Lemieux R.U., Driguez H. // *J. Am. Chem. Soc.* — 1975. — Vol. 52, №14. — P. 4063-4068.

Надійшла до редакції 22.12.2009 р.