

УДК 547.963.1

СИНТЕЗ β -АРИЛТИОГЛИКОЗИДОВ N-АЦЕТИЛМУРАМОИЛ-L-АЛАНИЛ-D-ИЗОГЛУТАМИНА

А.Е.Земляков, В.Н.Цикалова, Л.Р.Азизова, В.Я.Чирва

Таврический национальный университет им. В.И.Вернадского,
95007, г. Симферополь, пр. Акад. Вернадского, 4. E-mail: alex_z@crimea.edu*Ключевые слова: гликопептиды; мурамоилдипептид; гликозиды мурамоилдипептида; арилтиогликозиды*

Взаимодействием перацетата α -D-глюкозаминилхлорида с тиофенолами в ацетонитриле в присутствии триэтиламина были синтезированы β -фенил-, β -п-толил- и β -п-трет-бутилфенил-1-тиа-N-ацетилглюкозаминиды. Полученные на их основе 4,6-O-изопропилиден-N-ацетил-D-мурамовые кислоты конденсировали с L-Ala-D-iGln-OBn и деблокировали, что привело к целевым β -арилтиогликозидам N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина.

THE SYNTHESIS OF β -ARYLTHIOGLYCOSIDES OF N-ACETYLMURAMYL-L-ALANYL-D-ISOGLUTAMINE

A. Ye. Zemlyakov, V. N. Tsikalova, L. R. Azizova, V. Ya. Chirva

β -Phenyl-, β -p-tolyl- and β -p-tert-butylphenyl-1-thia-N-acetylglucosaminides have been synthesized by the interaction of α -D-glucosaminylchloride peracetate with the thiophenols in the presence of triethylamine. 4,6-O-isopropyliden-N-acetylmuramic acids obtained on the basis of these compounds have been condensed with L-Ala-D-iGln-OBn with their subsequent deprotection that leads to the target β -arylthioglycosides of N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutamine.

СИНТЕЗ β -АРИЛТИОГЛИКОЗИДІВ N-АЦЕТИЛМУРАМОЇЛ-L-АЛАНИЛ-D-ИЗОГЛУТАМІНУ

О.Є.Земляков, В.М.Цикалова, Л.Р.Азізова, В.Я.Чирва

Взаємодією перацетату α -D-глюкозамінілхлориду з тиофенолами в ацетонітрилі у присутності триетиламіну були синтезовані β -феніл-, β -п-толіл- і β -п-трет-бутилфеніл-1-тіа-N-ацетилглюкозамініди. Отримані на їхній основі 4,6-O-ізопропіліден-N-ацетил-D-мурамові кислоти конденсували з L-Ala-D-iGln-OBn і деблокували, що привело до цільових β -арилтіоглікозидів N-ацетилмурамоїл-L-аланіл-D-ізоглутаміну.

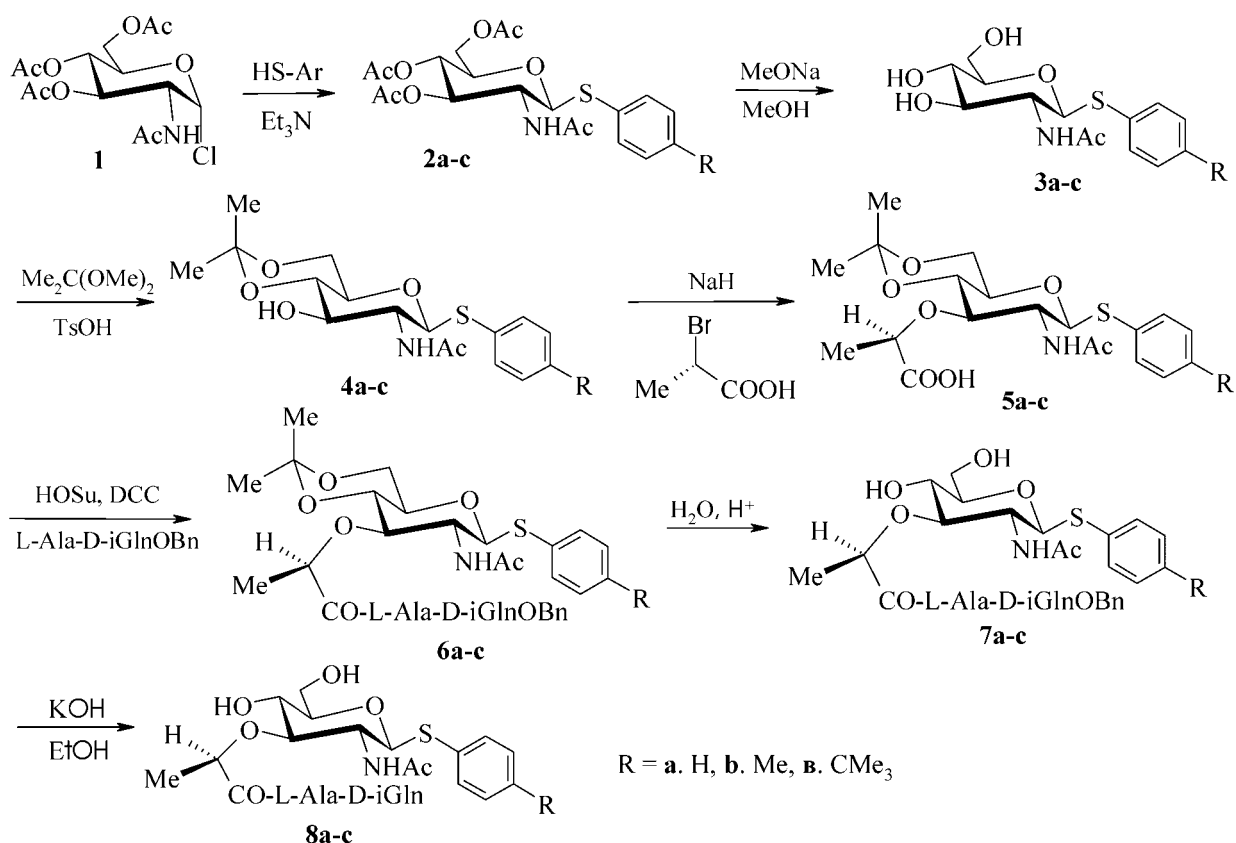
Среди многочисленных производных N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина (мурамоилдипептида, MDP) значительное место занимают гликозидные производные. Такие модификации мурамоилдипептида во многих случаях обладают высокой биологической активностью. В частности, иммуностимулирующее действие, превышающее эффект самого MDP, было выявлено для широкой группы O- β -алкил- [1, 2] и O- β -арилгликозидов MDP [1-3]. В отличие от широко исследуемых O-гликозидов мурамоилдипептида к настоящему времени было получено только три S-гликозида MDP, соответственно, β -метил-, β -бутил- и β -гексадецил-1-тиа-мурамоилдипептиды [4]. Возможно, по причине меньшей адьювантной активности этих соединений по сравнению с MDP дальнейшее изучение этой группы веществ не проводилось. Эти результаты контрастировали с полученными в том же тесте стимуляции гиперчувствительности замедленного типа данными о высокой активности для 1-S-ацил-MDP [4, 5]. Да и сам 1-тиа-мурамоилдипептид обладал адьювантным действием, близким к самому мурамоилдипептиду [4].

В рамках исследований по изучению взаимосвязей между строением гликозидных производ-

ных мурамоилдипептида и их биологической активностью нами осуществлен синтез ранее не описанных β -фенил-, β -п-толил- и β -п-трет-бутилфенилгликозидов 1-тиа-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина 8a-с. Сравнение иммуностимулирующего действия этих соединений с соответствующими O-арилгликозидами [1, 6] позволит выявить влияние природы гетероатома у гликозидного центра на биологическую активность.

Синтез гликозидов MDP осуществлялся по приведенной ниже схеме. Ключевым моментом в синтезе β -арилтиогликозидов мурамоилдипептида является получение β -арил-1-тиа-N-ацетилглюкозаминидов. Из большого количества возможных методов мы выбрали простую методику [7], построенную на взаимодействии при комнатной температуре перацетилированного α -D-глюкозаминилхлорида 1 с тиофенолами в ацетонитриле в присутствии избытка триэтиламина. Эта методика позволила быстро и с хорошими выходами (52-78%) получить гликозиды 2a-с.

Строение этих соединений было доказано ^1H -ЯМР-спектроскопией (табл. 1). Наряду с сигналами протонов гликозидного остатка были идентифицированы сигналы ароматических протонов фенильной группы агликона, представленные дву-



Схема

мая мультиплетами с δ 7,30 и 7,50 м.д. для гликозида 2a и п-фениленовой группировки для соединений 2b,c — два дублета с δ 7,12, 7,33 и 7,41, 7,44 м.д. Синглеты протонов метильной и трет-бутильной групп гликозидов 2b,c имеют ХС 2,35 и 1,32 м.д.

Сигналы аномерного протона (δ 4,78–4,85 м.д.) смещены в сильное поле по сравнению с соответствующими O-гликозидами (δ 5,20–5,28 м.д.) [1, 6]. КССВ равная 10–10,5 Гц характерна для S-1,2-транс-D-глюкозаминидов и существенно отличается от J_{1,2} 8 Гц у O- β -арилгликозидов.

N-Ацетил-D-мурамовые кислоты 5a-c получены из дезацетилированных производных 3a-c путем

введения 4,6-O-изопропилиденовой защиты и последующего алкилирования свободной гидроксильной группы у С3 в производных 4a-c действием гидрида натрия и L-2-бромпропионовой кислоты в диоксане. Бензиловый эфир L-аланил-D-изоглутамина конденсировали с N-гидроксисукцинимидными эфирами этих кислот и получили гликопептиды 6a-c, в которых кислотным гидролизом удалили ацетальную защиту.

Структуру соединений 7a-c подтвердили ¹H-ЯМР-спектрами, в которых интерпретировали сигналы протонов агликона, гликозидного остатка и лактилдипептидной компоненты. Эти спектры близ-

Таблица 1

¹H-ЯМР-спектры гликозидов 2a-c*

Протон	2a	2b	2c
H1 (J _{1,2})	4,85д (10)	4,78д (10,5)	4,82д (10,5)
H2 (J _{2,3})	4,04ддд (10,5)	3,99ддд (10)	4,02ддд (10)
H3 (J _{3,4})	5,23дд (9,5)	5,22дд (9,5)	5,23дд (9,5)
H4 (J _{4,5})	5,06дд (10)	5,05дд (9,5)	5,07дд (9,5)
H5 (J _{5,6a} ; J _{5,6b})	3,73ддд (2,5; 5,5)	3,70ддд (3; 5)	3,71ддд (2,5; 5)
H6a,b (J _{6a,6b})	4,14дд, 4,24дд (12,5)	4,17дд, 4,22дд (12,5)	4,18дд, 4,23дд (12)
NAc, OAc	1,99с, 2,02с, 2,03с, 2,08с	2,00с, 2,02с, 2,03с, 2,09с	2,00с, 2,02с, 2,03с, 2,08с
NH (J _{2,NH})	5,26д (9)	5,63д (9)	5,60д (9)
SAr	7,30м, 7,50м	2,35с, 7,12д, 7,41д	1,32с, 7,33д, 7,44д

* Растворитель - CDCl₃. Рабочая частота - 400 МГц, для соединения 2a - 300 МГц.

Таблица 2

Характеристические сигналы ^1H -ЯМР-спектров соединений 7a-с, 8a-с и MDP*

Сигналы групп	7a	7b	7c	8a	8b	8c	β -MDP [8]
SAr	7,36м	2,26с, 7,12д, 7,32д	1,25м, 7,33д, 7,37д	7,11-7,24м	2,27с, 7,13д, 7,33д	1,26м, 7,32д, 7,36д	-
GlcNAc: H1 ($J_{1,2}$ Гц)	4,75д (10,5)	4,67д (10)	4,69д (10)	4,75д (10)	4,66д (10,5)	4,70д (10)	4,41д
NAc	1,79с	1,78с	1,78с	1,79с	1,79с	1,79с	1,77с
NHAc	7,97д	7,99д	7,98д	7,98д	7,94д	7,97д	7,93д
C4-OH	5,36д	5,37д	н.д.	5,58д	н.д.	н.д.	6,60д
C6-OH	4,66т	4,67т	н.д.	4,69ут	н.д.	н.д.	4,24т
CH_2CHCO	1,24д	1,23д	1,25м	1,25д	1,25д	1,26м	1,23д
Ala: CH_3	1,25д	1,24д	1,25м	1,25д	1,25д	1,26м	1,24д
NH	7,41д	7,42д	7,44д	7,11-7,24м	7,39д	7,46д	7,51д
iGln: CO_2R	5,08с, 7,36м	5,08с, 7,36м	5,08с, 7,36д	12,48ус	н.д.	н.д.	-
γ - CH_2	2,36т	2,35т	2,35т	2,10т	2,09т	2,08т	2,20т
β - CH_2	1,80м, 2,02м	1,73м, 2,01м	1,76м, 2,01м	1,74м, 1,95м	1,75м, 1,95м	1,72м, 1,93м	1,69м, 1,94м
CONH_2	7,10с, 7,30с	7,13с, 7,33с	7,13с, 7,30с	6,79с, 7,24с	6,76с, 7,27с	6,73с, 7,28с	7,11с, 7,33с
NH	8,09д	8,13д	8,13д	8,28д	8,25д	8,10д	8,10д

* Растворитель - DMSO-d₆. Рабочая частота - 300 МГц, для соединений 7b, 7c - 400 МГц.

Условные сокращения: ус - уширенный синглет, ут - уширенный триплет, н.д. - не детектировано.

ки к ^1H -ЯМР-спектрам соответствующих О-арил-гликозидов мурамоилдипептида [1, 6] (табл. 2).

Каталитический гидролиз бензильного эфира в остатке изоглутамина гликопептидов 7a-с был затруднен из-за ингибирующего действия атомов серы в S-гликозидах. Поэтому на заключительной стадии бензильные эфиры в соединениях 7a-с удалили омылением, действуя раствором КОН в 95% этаноле, что позволило получить целевые арилтиогликозиды MDP 8a-с. Полноту протекания щелочного гидролиза и отсутствие изомеризации подтвердили ^1H -ЯМР-спектроскопией гликопептидов 8a-с. ^1H -ЯМР-спектры этих соединений отличаются от спектров соответствующих производных 7a-с только отсутствием сигналов протонов бензильного эфира. В спектре соединения 8a также детектирован широкий синглет протона карбоксильной группы с ХС 12,48 м.д. В целом спектры этих гликопептидов аналогичны данным, полученным для самого MDP [8] (табл. 2).

Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на приборе ПТП, оптическое вращение при 20-25°C — на поляриметре Polamat-A (λ 546 нм). Спектры ^1H -ЯМР получены на приборах Varian VXR-300 (300 МГц) и Varian Mercury 400 (400 МГц), внутренний стандарт — Me₄Si. Приведены химические сдвиги (δ -шкала) и константы спин-спиновой взаимодействия (J, Гц).

ТСХ проводили на пластинках Sorbfil-АФВ-УФ (ЕСорбполимерF, Россия). Вещества обнаруживали УФ (254 нм) и 5% раствором серной кислоты в этаноле с последующим нагреванием до

200-300°C. Использовали системы растворителей: бензол — пропанол-2, 10:1 (А), хлороформ — пропанол-2, 20:1 (Б); хлороформ — пропанол-2, 10:1 (В); хлороформ — пропанол-2, 3:1 (Г). Колонную хроматографию (КХ) проводили на силикагеле Merck 230-400 меш. Данные элементного анализа ключевых соединений соответствуют расчетным значениям.

Использовали тиофенол и п-тиокрезол (Merck), п-трет-бутилтиофенол (Acros).

Фенил-2-ацетидамо-3,4,6-тетра-О-ацетил-2-дезокси-1-тиа- β -D-глюкопиранозид (2a). К раствору 1,25 г (3,42 ммоль) α -хлорида 1 в 20 мл ацетонитрила добавили 0,35 мл (3,42 ммоль) тиофенола и 0,94 мл (6,78 ммоль) ТЕА. Смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 20 мин (контроль ТСХ в системах А, Б) выпавшие соли отфильтровывали и фильтрат упаривали. Остаток растворили в 20 мл хлороформа, который промыли 5 мл воды. Органический слой высушили безводным Na₂SO₄ и упарили. Остаток перекристаллизовали из изопропилового спирта и получили 1,15 г (77%) гликозида 2. Т.пл. — 195-197°C, $[\alpha]_{546}^{20} = 31^\circ$ (с 1,0; хлороформ). Лит. данные [9]: Т.пл. — 200°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 39,1^\circ$ (хлороформ). ^1H -ЯМР (табл. 1).

Аналогично из 1,94 г (5,31 ммоль) α -хлорида 1, 0,73 г (5,88 ммоль) п-тиокрезоло и 1,47 мл (10,62 ммоль) ТЕА получили 1,88 г (78%) гликозида 2b. Т.пл. — 213-216°C, $[\alpha]_{546}^{20} = 39,5^\circ$ (с 1,0; хлороформ). Лит. данные [9]: Т.пл. — 215-216°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 21,5^\circ$ (хлороформ). ^1H -ЯМР (табл. 1). Таким же образом из 1,75 г (4,79 ммоль) α -хлорида 1, 0,89 г (5,30 ммоль) 4-трет-бутилтиофенола и 1,66 мл (11,98 ммоль) ТЕА после очистки КХ (элюент:

бензол — пропанол-2, 100:1 → бензол — пропанол-2, 20:1) получили 1,23 г (52%) гликозида 2с. Т.пл. — 169-175°C, $[\alpha]_{546}$ — 23° (с 1,0 хлороформ). Лит. данные [9]: Т.пл. — 185°C, $[\alpha]_D$ — 20,3° (хлороформ). ¹H-ЯМР (табл. 1).

Фенил-2-ацетамидо-2-дезоксид-1-тиа-β-D-глюкопиранозид (3а). 1,0 г (2,28 ммоль) ацетата 2а растворили в 20 мл сухого метанола и добавили 0,2 мл 0,1 н. раствор метилата натрия в метаноле. Выпавший при стоянии осадок отфильтровали, промыли холодным метанолом. Маточный раствор нейтрализовали катионитом КУ-2 (H⁺), смолу промыли метанолом. Фильтрат упарили и соупарили с бензолом. Общий выход соединения 3а — 0,64 г (90%). Т.пл. — 210-214°C, $[\alpha]_{546}$ — 2° (с 1,0; этанол).

По той же методике из 1,0 г (2,28 ммоль) ацетата 2b выделили 1 г (97%) соединения 3b. Т.пл. — 225-228°C, $[\alpha]_{546}$ — 4,2° (с 1,0; этанол — хлороформ). Аналогично из 0,69 г (1,39 ммоль) ацетата 2с получили 0,49 г (96%) соединения 3с. Т.пл. — 183-186°C (с разл.), $[\alpha]_{546}$ + 14,5° (с 1,0; этанол).

Фенил-2-ацетамидо-2-дезоксид-4,6-О-изопропилден-1-тиа-β-D-глюкопиранозид (4а). Суспензию 0,5 г (1,60 ммоль) вещества 3а в 20 мл сухого ТНФ нагрели при перемешивании до 50-55°C и добавили 0,59 мл (4,45 ммоль) 2,2-диметоксипропана и 10 мг TsOH. Через 1 час (контроль ТСХ в системе В) реакционную смесь охладили, нейтрализовали пиридином и упарили. Остаток очистили КХ (элюент: бензол-пропанол-2, 50:1 → бензол — пропанол-2, 10:1). Выход ацетата 4а — 0,5 г (89%). Т.пл. — 138-140°C, $[\alpha]_{546}$ 50° (с 0,67; хлороформ).

Вышеописанным методом из 0,5 г (1,53 ммоль) вещества 3b и 0,8 мл (6,12 ммоль) 2,2-диметоксипропана получили 0,42 г (75%) ацетата 4b. Т.пл. — 215-220°C (с разл.), $[\alpha]_{546}$ — 112° (с 1,0; хлороформ). Таким же методом из 0,47 г (1,27 ммоль) вещества 3с и 0,68 мл (5,19 ммоль) 2,2-диметоксипропана синтезировали 0,45 г (87%) ацетата 4с. Т.пл. — 175-178°C, $[\alpha]_{546}$ 54° (с 1,0; хлороформ).

Фенил-2-ацетамидо-2-дезоксид-4,6-О-изопропилден-3-О-(D-1-карбокситил)-1-тиа-β-D-глюкопиранозид (5а). К суспензии 0,5 г (1,42 ммоль) соединения 4а в 20 мл сухого диоксана при перемешивании порциями добавляли 4 экв. гидрида натрия. Реакционную смесь нагрели до 95°C, выдерживали при этой температуре 1 ч и после охлаждения до 65°C прилили 0,19 мл (2,13 ммоль) S-2-бромпропионовой кислоты и выдержали при 65°C еще 3 ч (контроль ТСХ в системе В). После охлаждения избыток гидрида натрия разложили водой и упарили. Остаток растворили в 50 мл воды, раствор подкислили 1 н. HCl до pH 3-4 и экстрагировали мурамовую кислоту хлороформом (3 x 20 мл). Экстракт отмыли водой (10 мл), затем хлороформный слой высушили безводным Na₂SO₄, упарили и соупарили с бензолом. Выход кислоты 5а составил 0,58 г (96%). Аморфное вещество.

Аналогичным образом из 0,4 г (1,09 ммоль) соединения 4b получили 0,89 г (83%) кислоты 5b.

Аморфное вещество. Подобным методом получения из 0,43 г (1,05 ммоль) соединения 4с синтезировали 0,45 г (88%) кислоты 5с. Аморфное вещество.

Бензиловый эфир О-(фенил-2-ацетамидо-2,3-дидезокси-1-тиа-β-D-глюкопиранозид-3-ил)-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамина (7а). К раствору 0,58 г (1,36 ммоль) кислоты 5а в 20 мл сухого ТНФ при перемешивании добавили 0,19 г (1,63 ммоль) HOSu и 0,35 г (1,63 ммоль) DCC. Через 5 ч отфильтровали осадок дициклогексилмочевины и промыли его растворителем. К фильтрату прибавили трифторацетат бензилового эфира L-аланил-D-изоглутамина (получен обработкой 570 мг (1,36 ммоль) соответствующего Вос-производного трифторуксусной кислотой с последующим упариванием досуха) и 0,25 мл (1,77 ммоль) ТЕА. По окончании реакции (контроль ТСХ в системе В) реакционную смесь упарили. Остаток растворили в 50 мл хлороформа, раствор промыли 15 мл 1 н. HCl, 15 мл насыщенного раствора NaHCO₃ и 15 мл воды. Органический слой высушили безводным Na₂SO₄ и упарили.

Полученный гликопептид 6а растворили при нагревании на кипящей водяной бане в 10 мл 70% уксусной кислоты и выдержали при этой температуре 15 мин (контроль ТСХ в системе В). Раствор упарили досуха, остаток соупарили с толуолом. Выход аморфного гликопептида 7а — 0,7 г (92%); $[\alpha]_{546}$ + 22° (с 0,67; этанол). ¹H-ЯМР (табл. 2).

Аналогично из 0,48 г (1,09 ммоль) кислоты синтезировали 0,25 г (56%) гликопептида 7b; $[\alpha]_{546}$ — 23° (с 1,0; этанол). ¹H-ЯМР — см. табл. 2. На основе 0,45 г (0,94 ммоль) кислоты 5с получено 0,30 г (44%) соединения 7с; Т.пл. — 203-207°C, $[\alpha]_{546}$ — 39,5° (с 1,0; этанол). ¹H-ЯМР (табл. 2).

О-(Фенил-2-ацетамидо-2,3-дидезокси-1-тиа-β-D-глюкопиранозид-3-ил)-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (8а). Бензиловый эфир 7а (0,15 г, 0,22 ммоль) растворили в 10 мл 95% этанола, содержащего 25 мг (0,44 ммоль) КОН, и перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч (контроль ТСХ в системе Г). Раствор нейтрализовали катионитом КУ-2(H⁺), смолу промыли этанолом, отфильтровали. Фильтрат упарили. Выход аморфного гликопептида 8а составил 0,11 г (85%); $[\alpha]_{546}$ — 12° (с 0,67; этанол). ¹H-ЯМР (табл. 2).

Таким же методом из бензилового эфира 7b (0,15 г, 0,22 ммоль) получили 0,10 г (77%) гликопептида 8b, $[\alpha]_{546}$ — 23° (с 1,0; этанол). ¹H-ЯМР (табл. 2). По той же методике 0,15 г (0,21 ммоль) бензилового эфира 7с превратили в 0,13 г (97%) соединения 8с; $[\alpha]_{546}$ — 23° (с 1,0; этанол). ¹H-ЯМР (табл. 2).

Выводы

Осуществлен синтез новых тиофенольных гликозидов мурамоилдипептида с агликонами различной липофильности: β-фенил-, β-п-толил- и β-п-трет-бутилфенил-1-тиа-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутаминов.

Литература

1. Земляков А.Е., Цикалов В.В., Калюжин О.В. и др. // *Биоорг. химия.* — 2003. — Т. 29, №3. — С. 316-322.
2. Караулов А.В., Калюжин О.В., Земляков А.Е. // *Рос. биотерапевт. журн.* — 2000. — Т. 1. — С. 35-39.
3. Земляков А.Е., Цикалова В.Н., Цикалов В.В. и др. // *Биоорг. химия.* — 2005. — Т. 31, №6. — С. 1-7.
4. Hasegawa A., Hioki Y., Kiso M. et al. // *J. Carbohydr. Chem.* — 1982-1983. — Vol. 1, №3. — P. 317-323.
5. Ishida H., Kigawa K., Kitagawa M. et al. // *Agric. Biol. Chem.* — 1991. — Vol. 55, №2. — P. 585-587.
6. Земляков А.Е., Цикалова В.Н., Цикалов В.В. и др. // *ЖОФХ.* — 2003. — Т. 2, Вып. 3 (7). — С. 17-20.
7. Пат. США 5874548. 1999 // <http://patft.uspto.gov/netahtml/search-bool.html>.
8. Femand-Jian S., Perly B., Level M. // *Carbohydr. Res.* — 1987. — Vol. 162. — P. 23-32.
9. Shimadate T., Ghiba S., Inouye K. et al. // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* — 1982. — Vol. 55, №11. — P. 3552-3554.

Надійшла до редакції 06.03.2006 р.