



УДК 547.963.07

СИНТЕЗ НОВОГО ЛИПОФИЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО ГМДП – N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНИЛ-(β 1 \rightarrow 4)-N-ПАЛЬМИТОИЛМУРАМОИЛ- L-АЛАНИЛ-D-ИЗОГЛУТАМИНА

© 1995 г. С. С. Пертель*, В. Я. Чирва

*Симферопольский государственный университет, кафедра органической химии,
333036, Симферополь, Ялтинская, 4*

Поступила в редакцию 12.07.94 г.

- Описан синтез нового липофильного аналога N-ацетилглюкозаминилмурамоилдипептида (ГМДП) – N-ацетилглюкозаминил-(β 1 \rightarrow 4)-N-пальмитойлмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина. Исходя из метилового эфира полного O,N-ацетата глюкозаминил-(β 1 \rightarrow 4)-мурамовой кислоты, через стадии 1-деацетилирования, получения гликозилгалогенида, образования соответствующего оксазолина, его кислотного гидролиза и ацилирования незамещенной аминогруппы мурамовой кислоты пальмитойлхлоридом получали полный O-ацетат метилового эфира N-пальмитойл-N'-ацетилдисахарида. После деблокирования карбоксильной группы мурамовой кислоты дисахаридное производное конденсировали с дипептидом и удаляли оставшиеся защитные группы.

Ключевые слова: глюкозаминилмурамоилпептиды, липофильные производные, оксазолиновые производные, селективное N-деацетилирование.

Значительный интерес к олигосахаридным аналогам мурамоилдипептида, в том числе производным N-ацетилглюкозаминил-(β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина (ГМДП), обусловлен их большей биологической активностью по сравнению с N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамином (МДП). В частности, это касается адьювантных свойств [1, 2] и противоопухолевой активности [3].

Описаны 6-O-ацильные производные ГМДП (в частности, октадеканойльные и 2'-тетрадецилгексадеканойльные) [4], гликозиды [5] и соединения с модифицированной пептидной частью [3]. Синтез N-ацильных производных ГМДП с неацетильными жирнокислотными остатками до сих пор не описан. Обычно для получения ГМДП и его производных используют готовый дисахарид – N-ацетилглюкозаминил-(β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмурамовую кислоту (I) из клеточных стенок бактерий, например *Micrococcus lysodeiicticus* [2]. Для его N-переацилирования необходимо предварительное деблокирование аминогрупп. Традиционные методы предусматривают применение для этих целей жестких реагентов; кроме того, невозможно осуществить селективное деацетилирование одной из двух имеющихся аминогрупп. Создание же дисахаридного фрагмента исходя из N-ацильного (неацетильного) производного глюкозамина до сих пор не осуществлено, по-видимому, из-за

сложности гликозилирования мурамовой кислоты по ее 4-OH-группе.

Нами разработан метод избирательного N-деацетилирования в 2-ацетамидо-2-дезоксисахарах, предусматривающий сохранение сложноефирных защит и лабильных гликозидных связей. Метод включает образование оксазолинового цикла через предварительное получение 1-OH- и 1-SI-производных и последующий кислотный гидролиз его в мягких условиях. Этот прием позволяет провести селективное деблокирование аминогруппы сахара, находящегося на восстанавливающем конце молекулы олигосахарида. В дальнейшем эта аминогруппа должна быть ацилирована в среде, не содержащей большого избытка основания, в ином случае может происходить внутримолекулярное переацилирование путем миграции ацильного остатка с O-1 "восстанавливающего" сахара.

Приведенная последовательность реакций дает возможность исходя из готового дисахарида (I) синтезировать разнообразные N-ацильные производные N-ацетилглюкозаминил-(β 1 \rightarrow 4)-мурамовой кислоты и соответствующие липофильные аналоги ГМДП на их основе.

Исчерпывающее ацетилирование гидроксильных групп и метилирование карбоксила в соединении (I) приводит к защищенному производному (II). Селективное 1-деацетилирование дает 1-OH-производное (III). Его переводят в гликозилгалогенид (IV) действием тионилхлорида. Затем по

* Автор для переписки

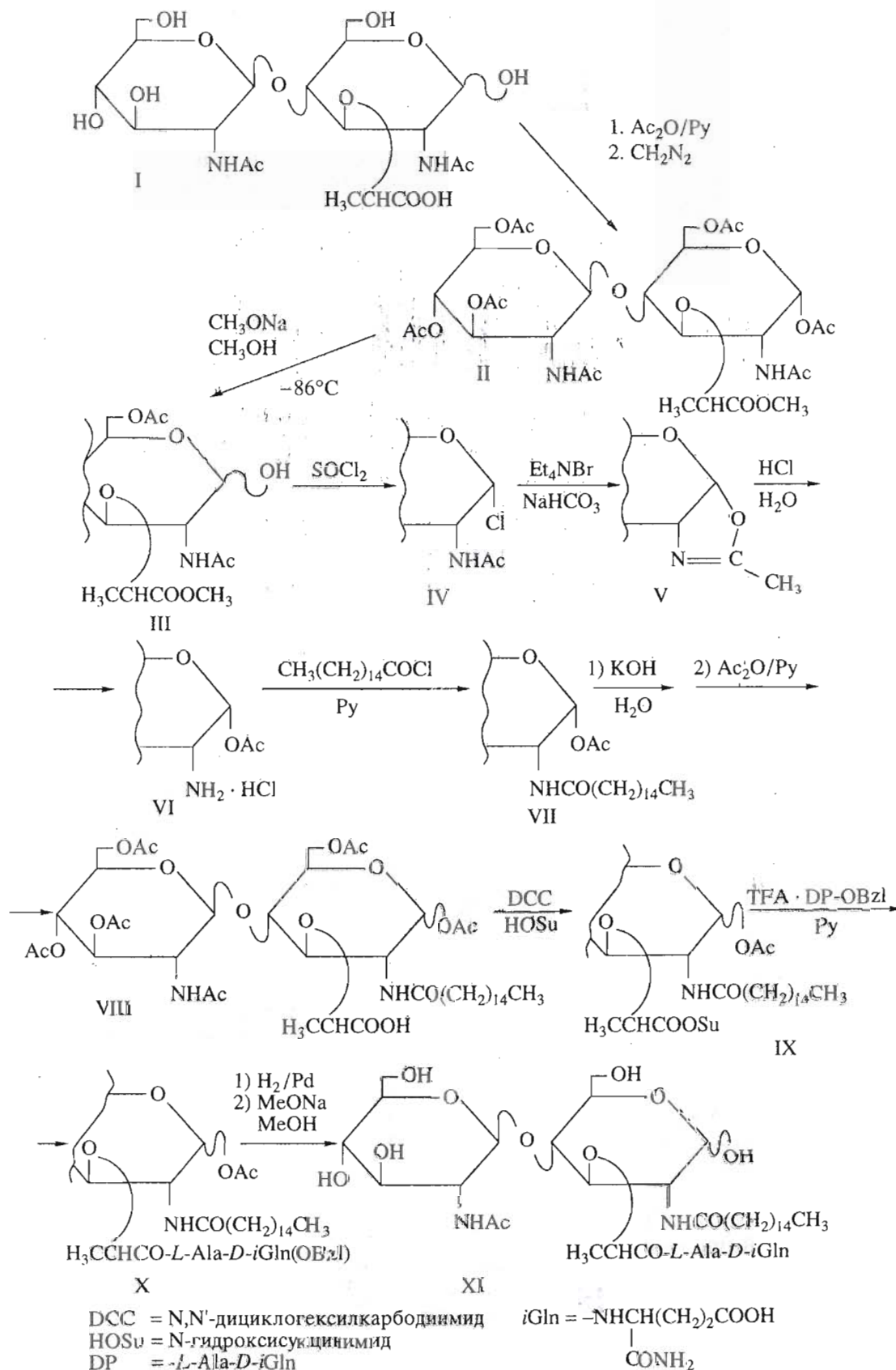


Схема.

методу Лемье получают оксазолиновое производное (V) [6]. Гидролиз оксазолина в присутствии HCl дает гидрохлорид (VI), который ацилируют пальмитоилхлоридом, не допуская присутствия в реакционной среде избытка основания. ¹H-ЯМР-спектр продукта (VIII) (см. "Экспериментальную часть") помимо сигналов протонов углеводной части содержит сигналы протонов пальмитоильного фрагмента, в частности триплеты $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$ (2H), $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ (3H), а также мультиплеты $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$ (2H) и $(\text{CH}_2)_{12}$ (24H).

N-Пальмитоильное производное (VII) освобождают от сложноэфирных защит щелочным гидролизом, реацетилируют и, после активации карбоксильной группы через образование активированного эфира с N-гидроксисукцинимидом, конденсируют с бензиловым эфиром L-аланил-D-изоглутамина. В ¹H-ЯМР-спектре полученного гликопептида (см. "Экспериментальную часть") наряду с сигналами протонов углеводной части определены сигналы протонов дипептидного фрагмента, в частности дублет CH_3CH (3H, аланин), мультиплет CH + CH (2H, аланин и глутамин), синглет CH_2Ph (2H) и мультиплет CH_2Ph (5H). Удаление бензильной сложноэфирной группы с изоглутамина производили при помощи каталитического гидрогенолиза над палладиевой чернью, а деблокирование гидроксильных групп – с помощью дезацетилирования по Земплуну.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Температуры плавления определяли на приборе ПТП (СССР), оптическое вращение – на поляриметре Polamat A (ГДР). Спектры ¹H-ЯМР сняты на спектрометре Bruker WM-200 (200 МГц), внутренний стандарт – Me₄Si. ИК-спектры записаны на приборе Specord IR-75 (ГДР) (таблетки KBr). ТСХ осуществляли на пластинках Silufol UV-254 с обнаружением зон путем обугливания при 400°C. Использовали системы растворителей: хлороформ-этанол, 10 : 1 (А), 10 : 0.5 (Б); n-бутанол-уксусная кислота-вода, 3 : 1 : 1 (В). Колоночную хроматографию (КХ) проводили на предварительно промытом силикагеле L 40 - 100 мкм. Данные элементного анализа соответствуют расчетным значениям. N-Ацетилглюкозаминил-(β1→4)-N-ацетилмурамовая кислота производства НПО "Биолар" (1991 г.).

2-Ацетидамо-4-О-(2-ацетидамо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-6-О-ацетил-2-дезоксид-3-О-[D-1-(метоксикарбонил)этил]-D-глюкопираноза (III). 1.0 г (1.43 ммоль) 2-ацетидамо-4-О-(2-ацетидамо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-2-дезоксид-3-О-(D-1-карбоксийтил)-D-глюкопиранозы (I) обрабатывали 8 мл смеси уксусный ангидрид-пиридин (1 : 1), кратковременно нагревали до ~70°C и упаривали реакционную смесь. Полученный полный ацетат растворя-

ли в этаноле и метилировали эфирным раствором диазометана до перехода всего вещества в метиловый эфир (II) (контроль ТСХ, система А). После удаления растворителей продукт растворяли в 15 мл абсолютного метанола, охлажденно до -86°C, и прибавляли раствор метилата натрия, полученный путем растворения 0.1 г Na в 10 мл CH₃OH. Периодически производили контроль ТСХ (система А). После завершения реакции (исчезновение зоны полного ацетата на хроматограмме) прибавляли к смеси метанольный раствор H₃PO₄ до нейтрализации, нагревали до комнатной температуры, отфильтровывали осадок фосфатов натрия и упаривали. Смесь разделяли с помощью КХ в системе хлороформ-этанол, 100 : 3. Получили 657 мг вещества в виде смеси аномеров. Выход 70%. Т. пл. 211 - 212°C. $[\alpha]_{546}^{28} +44^\circ$ (с 0.924; CH₃CN). Лит. [5] для (III): $[\alpha]_{546}^{19} +19^\circ$ (с 0.85; CHCl₃). ИК (ν, см⁻¹): 3450 (ОН), 3310 (NH), 2970 (CH₃), 1750 (C=O сл. эфира), 1660 (C=O амида I), 1550 (CN + NH амида II), 1230 (C-O-C сл. эфира).

2-Пальмитоиламидо-4-О-(2-ацетидамо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-1,6-ди-О-ацетил-2-дезоксид-3-О-[D-1-(метоксикарбонил)этил]-α-D-глюкопираноза (VII). К 300 мг (0.44 ммоль) вещества (III) прибавляли 3 мл дихлорэтана и 0.2 мл тионилхлорида. После перехода всего исходного соединения в хлорид (IV) (контроль ТСХ, система Б) растворитель удаляли, продукт несколько раз упаривали с дихлорэтаном, добываясь исчезновения запаха тионилхлорида. После этого вещество растворяли в 5 мл сухого ацетонитрила, добавляли 107 мг тетраэтил-аммонийбромид и 75 мг безводного NaHCO₃. Реакционную смесь при перемешивании нагревали до 45°C. Через 0.5 ч (контроль ТСХ, система А) раствор отфильтровывали, удаляли растворитель, остаток растворяли в CHCl₃ и четыре раза промывали водой. После осушения безводным Na₂SO₄ хлороформную фракцию упаривали, вещество растворяли в диоксане, добавляли 100 мкл воды и диоксанный раствор HCl до появления устойчивой кислой реакции и перехода всего оксазолина (V) в гидрохлорид (VI) (контроль ТСХ, система А). Растворитель удаляли, добавляли 3 мл безводного диоксана, 122 мг (1 экв.) пальмитоилхлорида (полученного из пальмитиновой кислоты с использованием в качестве хлорирующего реагента тионилхлорида в присутствии каталитических количеств пиридина) и по каплям пиридин, поддерживая слабокислую реакцию среды. После завершения ацилирования (контроль ТСХ, система Б) растворитель упаривали, а вещество выделяли с помощью КХ в системе CHCl₃ → CHCl₃-C₂H₅OH, 100 : 1. Получено 242 мг вещества (60%). $\alpha_{546}^{18} +29^\circ$ (с 4.3; CHCl₃).

Т. пл. 197 - 198°C. ИК (ν , см^{-1}): 3320 (NH), 2950, 2870 (CH_2), 1750 (C=O сл. эфира), 1660 (C=O, амид I), 1540 (CN + NH, амид II), 1220 (C-O-C сл. эфира). ПМР (δ , м. д., C^2HCl_3): 0.81т (3H, CH_3CH_2), 1.18м (24H, $(\text{CH}_2)_{12}$), 1.31д (3H, $J_{\text{CH}_3\text{CH}, \text{CH}_3\text{CH}}$ 6 Гц, CH_3CH), 1.92с (3H, NAc), 1.96с (6H, 2OAc), 2.01с (3H, OAc), 2.05с (3H, OAc), 2.09с (3H, OAc), 2.19т (2H, COCH_2), 3.72с (3H, OCH_3), 4.70кв (1H, $J_{\text{CH}_3\text{CH}, \text{CH}_3\text{CH}}$ 6 Гц, CH_3CH), 6.1уш.с (1H, NH), 6.36уш.с (1H, H-1), 7.99уш.с (1H, NH').

γ -Бензиловый эфир О-[2-пальмитоиламидо-4-О-(2-ацетидамо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозил)-1,6-ди-О-ацетил-2-дезоксид- α -D-глюкопираноза-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамина (X). 370 мг производного (VII) растворяли в 3 мл метанола и добавляли 1 н. раствор КОН до получения устойчивой щелочной реакции среды (приблизительно 1.1 экв.). Затем раствор обрабатывали избытком катионита КУ-2 в H^+ -форме, после нейтрализации катионит и растворитель удаляли, остаток ацетилювали 3 мл смеси уксусный ангидрид-пиридин, 1 : 1. Кислоту (VIII) после упаривания избытка ацетилюющей смеси дополнительно очищали колоночной хроматографией в системе CHCl_3 - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (100 : 1) \rightarrow CHCl_3 - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (10 : 2). Получили 180 мг (50%) продукта. Вещество растворяли в 3 мл безводного диоксана и обрабатывали 28 мг (1.2 экв.) N-гидроксиуксидинида и 50 мг (1.2 экв.) N,N'-дициклогексилкарбодимида. Через 12 ч отфильтровывали осадок N,N'-дициклогексилмочевины и к раствору активированного эфира добавляли диоксановый раствор формиата γ -бензильного эфира L-аланил-D-изоглутамина (полученного путем обработки γ -бензильного эфира N-трет-бутилоксикарбонил-L-аланил-D-изоглутамина 2 мл муравьиной кислоты в течение 12 ч и последующим удалением избытка кислоты упариванием в вакууме), содержащий 114 мг (1.2 экв.) дипептида и 1 мл триэтиламина. После завершения конденсации (контроль ТСХ, система В) реакционную смесь упаривали и разделяли КХ, используя систему растворителей CHCl_3 - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (100 : 3) \rightarrow CHCl_3 - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (100 : 6). Получено 220 мг (92%) вещества (X). $[\alpha]_{546}^{23} + 2.73^\circ$ (с 0.73, CHCl_3). Т. пл. 178 - 179°C. ИК (ν , см^{-1}): 3310 (NH), 2950, 2870 (CH_2), 1750 (C=O сл. эфира), 1660 (C=O, амид I), 1550 (CN + NH, амид II), 1230 (C-O-C сл. эфира), 720 (Ph). ПМР

(δ , м. д., C^2HCl_3 + $\text{C}^2\text{H}_5\text{O}^2\text{H}$): 0.635т (3H, CH_3CH_2), 1.00м (24H, $(\text{CH}_2)_{12}$), 1.45д (3H, $J_{\text{CH}_3\text{CH}, \text{CH}_3\text{CH}}$ 6 Гц, CH_3CH), 1.53д (3H, $J_{\text{CH}_3\text{CH}, \text{CH}_3\text{CH}}$ 6 Гц, CH_3CH), 1.71с (3H, NAc), 1.79с (3H, OAc), 1.80с (3H, OAc), 1.82с (3H, OAc), 1.87с (3H, OAc), 1.90с (3H, OAc), 1.98 уш.с. (2H, COCH_2), 2.24м (2H, CH Ala + CH i-Gln), 4.86кв (1H, $J_{\text{CH}_3\text{CH}, \text{CH}_3\text{CH}}$ 6 Гц, CH_3CH), 4.87с (2H, CH_2Ph), 6.00д (1H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2}$ 3.4 Гц, H-1), 7.12м (5H, C_6H_5), 7.59д (1H, NH), 7.67д (1H, NH), 7.73д (1H, NH), 7.93д (1H, NH).

О-[2-Пальмитоиламидо-4-О-(2-ацетидамо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозил)-2-дезоксид- α -D-глюкопираноза-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (XI). 220 мг вещества (X) растворяли в 2 мл метанола и гидрировали в течение ночи над палладиевой чернью. Катализатор отфильтровывали и прибавляли раствор метилата натрия в метаноле до нейтрализации кислоты и получения устойчивой слабощелочной реакции среды. Через 12 ч, по завершении реакции (контроль ТСХ, система В), к раствору добавляли избыток катионита КУ-2 в H^+ -форме. После завершения ионного обмена катионит и растворитель удаляли, вещество осаждали эфиром. Получили 150 мг (92%) вещества (XI). $[\alpha]_{546}^{20} - 3.0^\circ$ (с 1.0, CH_3OH). ИК (ν , см^{-1}): 3400 (OH), 3320 (NH), 2950, 2870 (CH_2), 1720 (C=O кислоты), 1660 (C=O, амид I), 1550 (CN + NH, амид II).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsujimoto M., Kinoshita F., Okunaga T., Kotani S., Kusumoto S., Yamamoto K., Shiba T. // Microbiol. Immunol. 1979. V. 23 (9). P. 933 - 935.
2. Синтетические иммуномодуляторы / Ред. Петров Р.В. М.: Наука, 1991. С. 7 - 14.
3. Ростовцева Л.И., Андропова Т.М., Малькова В.П., Сорокин И.Б., Иванов В.Т. // Биооргани. химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1843 - 1858.
4. Inage M., Imoto M., Kambayashi Y., Kusumoto S., Shiba T. // Tetrahedron Lett. 1980. V. 21. P. 3767 - 3770.
5. Земляков А.Е., Курьянов В.О., Чирва В.Я., Андропова Т.М. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1575 - 1578.
6. Lemieux R.U., Driguez H. // J. Amer. Chem. Soc. 1975. V. 21. P. 460.

Synthesis of a New Lipophilic Derivative of GMDP, N-Acetylglucosaminyl-(β 1 \rightarrow 4)-N-palmitoylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutamine

S. S. Pertel* and V. Ya. Chirva

Simferopol' State University, ul. Yaltinskaya 4, Simferopol', 333036 Ukraine

Abstract – The synthesis of a new lipophilic analog of N-acetylglucosaminylmuramoyldipeptide (GMDP), N-acetylglucosaminyl-(β 1 \rightarrow 4)-N-palmitoylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutamine, is described. Completely O-acetylated methyl ester of N-palmitoyl-N-acetyldisaccharide was prepared from the starting methyl ester of completely O-acetylated N-acetylglucosaminyl-(β 1 \rightarrow 4)-muramic acid via 1-deacetylation, preparation of glycosyl chloride, formation of the corresponding oxazoline derivative followed by its acid hydrolysis, and acylation of a free amino group formed with palmitoyl chloride. After deblocking the carboxyl group of muramic acid, the disaccharide was condensed with dipeptide. The synthesis was completed by removing the protecting groups.

Key words: glucosaminylmuramoylpeptides, lipophilic derivatives, oxazoline derivatives, selective N-deacetylation.

* To whom correspondence should be addressed.