



УДК 547.963.1

СИНТЕЗ И ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ β -ГЛИКОЗИДОВ *N*-АЦЕТИЛМУРАМОИЛ-*L*-АЛАНИЛ-*D*-ИЗОГЛУТАМИНА С АГЛИКОНАМИ АЛКИЛАЛИЦИКЛИЧЕСКОЙ И АРИЛАЛИФАТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ

© 2005 г. А. Е. Земляков^{*#}, В. Н. Цикалова*, В. В. Цикалов*, В. Я. Чирва*,
Е. Л. Мулик^{**}, О. В. Калюжин^{**}

^{*}Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского,
95007, Украина, Крым, Симферополь, просп. Акад. Вернадского, 4;

^{**}НИИ морфологии человека РАМН, Москва

Поступила в редакцию 14.03.2005 г. Принята к печати 14.04.2005 г.

Осуществлен синтез β -4-*трет*-бутилциклогексил-, β -2-(адамантил-1)этил-, β -2,2-дифенилэтил- и β -2-*n*-бифенилэтилгликозидов *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина (MDP). Исходные перацетилированные β -*N*-ацетилглюкозаминиды были получены оксазолиновым методом. Полученные на их основе 4,6-*O*-изопропилиден-*N*-ацетил-*D*-мурамовые кислоты конденсировали с бензиловым эфиром *L*-Ala-*D*-Glu(NH₂) и после деблокирования получили целевые гликопептиды. Изучена стимуляция гликозидами MDP антиинфекционной резистентности мышей против *Staphylococcus aureus*.

Ключевые слова: гликопептиды; мурамоилдипептид; гликозиды мурамоилдипептида, оксазолиновый синтез; антибактериальная резистентность.

ВВЕДЕНИЕ

В отличие от подробно изученных гликозидов *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина (мурамоилдипептида, MDP) с C₄-C₈-агликонами различной природы, обладающих амфифильными свойствами и высоким иммуностимулирующим действием в различных тестах *in vitro* и *in vivo* [1, 2], гликозиды с преобладанием липофильных свойств систематически не изучались. Однако в отдельных экспериментах [3, 4] β -гексадецил-MDP [5], β -(2,3-дидодецилоксипропил)-MDP [6] и β -холестерил-MDP [7] активировали иммунные реакции более эффективно по сравнению с самим мурамоилдипептидом. Повышает интерес к липофильным производным MDP и тот факт, что к этой группе относятся разрешенные к медицинскому применению препараты ϵ -октадеканоил-MDP-*L*-лизин ("ромуртид") [8] и фосфатидилэтаноламид MDP-*L*-аланина (MTP-PE) [9], а ряд соединений, например, холестерилэтер MDP-*L*-аланина [10] или 6-*O*-(2-тетрадецилгексадеканоил)-MDP [11], находятся на завершающих стадиях клинических испытаний.

С целью поиска высокоэффективных иммуномодуляторов, а также для установления взаимо-

связей между структурой и природой агликонов гликозидов мурамоилдипептида и их иммуностимулирующей активностью нами были синтезированы β -4-*трет*-бутилциклогексил-, β -2-(адамантил-1)этил-, β -2,2-дифенилэтил- и β -2-*n*-бифенилэтилгликозиды MDP (VIa)–(VIg), содержащие в качестве агликонов алициклический, циклоалкилалифатический и ароматические спирты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез гликозидов MDP осуществлялся по классической схеме. Для получения исходных перацетилированных β -гликозидов *N*-ацетилглюкозамина (IIa)–(IIg) был выбран оксазолиновый метод [12], обеспечивающий образование строго 1,2-*транс*-гликозидной связи. β -Замещенные этанола гликозилировали избытком оксазолина (I) в дихлорэтаноле при температуре ~90°C в присутствии каталитических количеств *n*-толуолсульфокислоты. Гликозиды (IIb)–(IIg) были выделены кристаллизацией или колоночной хроматографией с выходами 68–81%.

В случае *цис*-*транс*-4-*трет*-бутилциклогексанола гликозилирование проводили недостатком оксазолина (I). В реакционной смеси по данным ТСХ в соотношении ~1 : 15 присутствуют два продукта гликозилирования: более подвижный минорный гликозид (IIд) и основной компонент – гликозид (IIа), которые были выделены колоночной

Сокращение: MDP – *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамин.

[#]Автор для переписки (тел.: (065) 223-38-85; факс: (065) 223-23-10; эл. почта: alex_z@crimea.edu).

Таблица 1. ^1H -ЯМР-спектры β -гликозидов (IIa)–(IIд) (растворитель – C^2HCl_3)*

Группа или атом	Химические сдвиги, м.д. (КССВ, Гц)				
	(IIa)	(IIб)	(IIв)	(IIг)	(IIд)
H1 ($J_{1,2}$)	4.85д (8.5)	4.67д (8)	4.69д (8.5)	4.67д (8.5)	4.79д (8.5)
H2 ($J_{2,3}$)	3.54ддд (10)	3.80ддд (10.5)	3.74ддд (10.5)	3.86ддд (10)	3.79ддд (10.5)
H3 ($J_{3,4}$)	5.37дд (9.5)	5.32дд (9.5)	5.25дд (9.5)	5.26дд (9.5)	5.37дд (9.5)
H4 ($J_{4,5}$)	4.98дд (9.5)	5.07дд (9.5)	5.05дд (9.5)	5.08дд (9.5)	5.08дд (9.5)
H5 ($J_{5,6a}$; $J_{5,6b}$)	3.64ддд (2.5; 5)	3.70ддд (2.5; 4.5)	3.68ддд (2.5; 4.5)	3.69ддд (2.5; 4.5)	3.68ддд (2.5; 5)
H6a,b ($J_{6a,6b}$)	4.04дд, 4.20дд (12.5)	4.13дд, 4.28дд (12.5)	4.12дд, 4.26дд (12.5)	4.14дд, 4.27дд (12.5)	4.12дд, 4.26дд (12.5)
NAc, OAc	1.88с, 1.95с, 1.96с, 2.02с	1.95с, 2.02с, 2.03с, 2.09с	1.66с, 1.99с, 2.01с, 2.08с	1.83с, 2.02с (6H), 2.09с	1.94с, 2.03с, 2.04с, 2.09с
NH ($J_{2,NH}$)	5.43д (8)	5.48д (8.5)	5.07д (8.5)	5.35д (8.5)	5.54д (8.5)
R					
H1'	3.43м	3.53дт, 3.93дт	4.29дд, 4.42дд	3.72дт, 4.18дт	3.97м
H2'	–	1.37дт	4.02т	2.93дт	–
Alk/Ar	0.77с (9 H), 0.88–1.74м	1.48м, 1.65м, 1.92м	7.21м, 7.27м	7.27–7.46м, 7.52д, 7.56д	0.83с (9 H), 0.86–1.52м

* Рабочая частота – 300 МГц, для соединения (IIд) – 400 МГц.

Условные сокращения: дд – дублет дублетов, дт – дублет триплетов, ддд – дублет дублет дублетов.

хроматографией. Исходя из большей реакционной способности *транс*-4-*трет*-бутилциклогексанола с экваториальным расположением гидроксильной группы и большей устойчивости соответствующего гликозидного производного для соединения (IIa) предложена *e,e*-конфигурация циклогексанового цикла, а для его изомера (IIд) – *a,e*-конфигурация.

Строение гликозидов (IIa)–(IIд) подтвердили ^1H -ЯМР-спектрами, в которых сделали полное отнесение всех протонов (см. табл. 1). Сигналы протонов циклогексанового кольца в агликоне соединения (IIa) находятся в области 0.88–1.74 м.д. за исключением мультиплета с δ 3.43 м.д. метинового протона, связанного с атомом кислорода у C1. Интенсивный синглет метильных групп *трет*-бутильного радикала имеет химический сдвиг (ХС) 0.77 м.д. (ср. табл. 1). Протоны его изомера (IIд)

имеют близкие значения хим. сдвигов и КССВ. Основные отличия связаны со смещением в более слабое поле сигналов H2 в гликозидном остатке и метинового протона H1' агликона, что подтверждает изомерное строение гликозидов (IIa) и (IIд).

Сигналы протонов адамантильного радикала гликозида (IIб) расположены в сильном поле (ХС от 1.48 до 1.92 м.д.). Ароматические протоны проявляются в спектрах в виде двух мультиплетов с δ 7.21 и 7.27 м.д. двух фенильных групп для соединения (IIв) или широкого мультиплета фенильной группы в области 7.27–7.46 м.д. и двух дублетов с δ 7.52 и 7.56 м.д. *n*-фениленовой группы для бифенильного производного (IIг).

Этильная часть агликонов гликозидов (IIб), (IIг) представлена в спектрах двумя дублетами триплетов неэквивалентных H1'-протонов в области

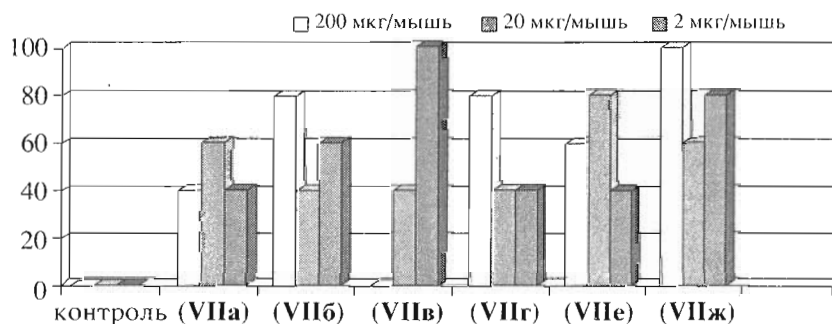
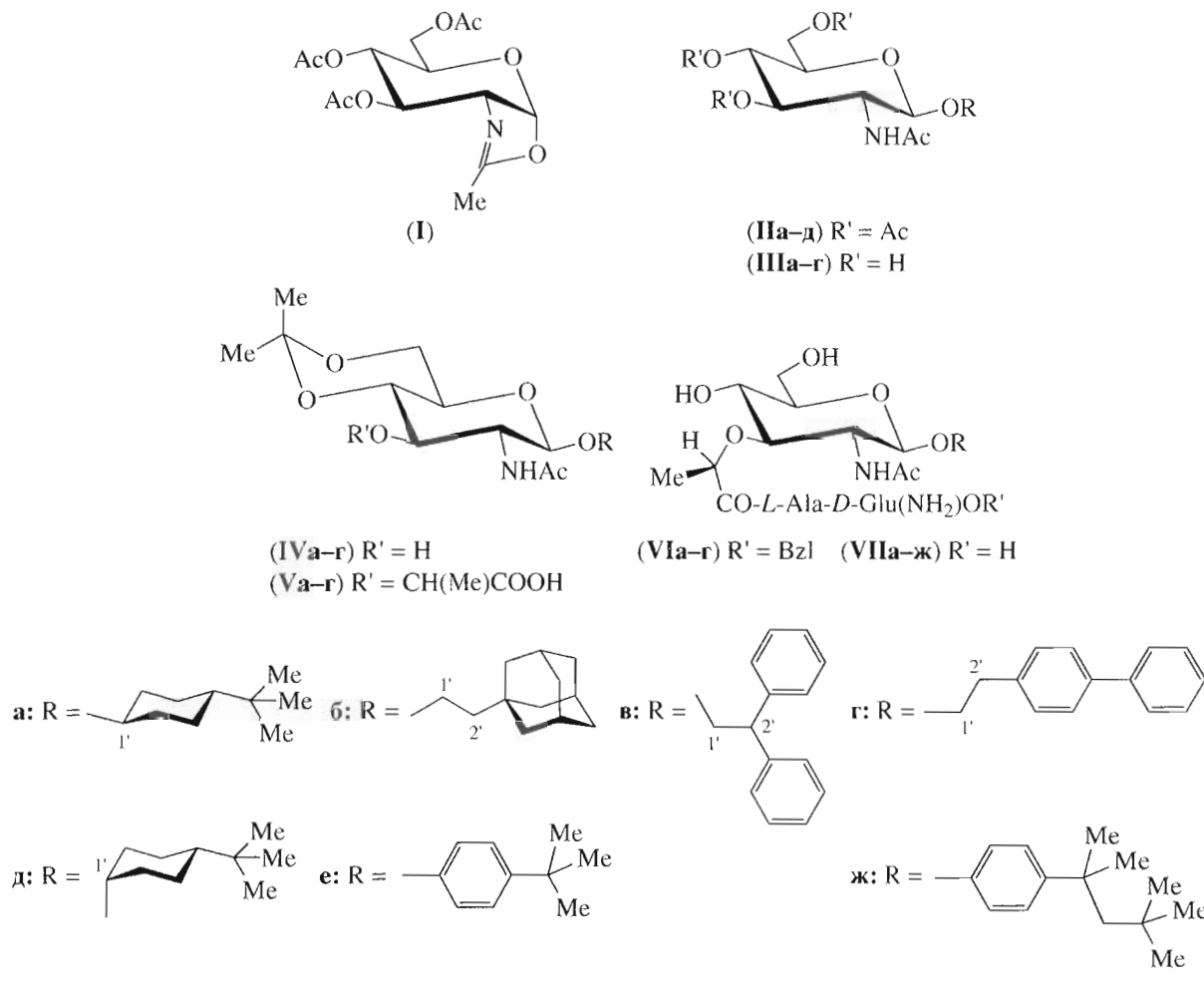


Рис. 1. Протективный эффект гликозидов MDP (VIIa)–(VIIж) (в дозах 2, 20, 200 мкг/мышь) к внутрибрюшинному заражению мышей *S. aureus* (10^9 клеток/мышь).

3.53–3.72 и 3.93–4.18 м.д. и дуплетом триплетов β-метиленовой группы с δ 1.37 и 2.93 м.д. Для производного (IIв) протоны метиленовой группы представлены двумя дублетами дублетов с δ 4.29 и 4.42 м.д., а метиновой группы – триплетом с δ 4.02 м.д.

β-Конфигурация *D*-глюкозаминидов (IIа)–(IIг) подтверждается наличием в спектрах этих соединений дублета аномерного протона в области 4.67–4.85 м.д. с КССВ 8–8.5 Гц, характерной для 1,2-*транс*-гликозидной связи.



Перацетаты (IIа)–(IIг) дезацетилировали по Земплону. Действие 2,2-диметоксипропана на получаемые при этом триолы (IIIа)–(IIIг) позволило блокировать 4,6-диольную группировку, а оставшуюся свободной гидроксильную группу у С3 в производных (IVа)–(IVг) обрабатывали гидридом натрия в диоксане и алкилировали *L*-2-бромпропионовой кислотой. Проведение реакции в условиях, описанных в работе [13], способствующим нуклеофильному замещению с обращением конфигурации асимметрического центра в производном пропионовой кислоты, привело к синтезу защищенных *N*-ацетил-*D*-мурамовых кислот (Va)–(Vг). Конденсацию этих кислот с бензиловым эфиром *L*-аланил-*D*-изоглутамина осуществляли через образование соответствующих *N*-гидроксисукцинимидных эфиров. Ацетальную защиту в полученных гликопептидах удалили кислотным гидролизом.

Для соединений (VIа)–(VIг) были сняты ¹H-ЯМР-спектры, в которых интерпретировали сигналы, относящиеся как к агликону и углеводному фрагменту, так и к лактилдипептидному компоненту. Эти данные сопоставимы с ¹H-ЯМР-спектром самого MDP (см. табл. 2). Завершающий каталитический гидронолиз бензиловых эфиров в остатке изоглутамин гликопептидов (VIа)–(VIг) привел к целевым β-гликозидам MDP (VIIа)–(VIIг).

На результаты исследований иммуностимулирующего действия липогликопептидов в тестах *in vitro* существенно влияет низкая растворимость этих соединений в воде и склонность к агрегации. Поэтому воздействие липофильных мурамоилдипептидов на иммунную систему корректнее оценивать *in vivo*, например, в тесте стимуляции антибактериальной резистентности у мышей при внутрибрюшинном введении *S. aureus* [15].

Таблица 2. ^1H -ЯМР-спектры соединений (VIa)–(VIд) (рабочая частота – 300 МГц, растворитель – $\text{DMSO-}d_6$)

Группа или атом	Химические сдвиги, м.д. (КССВ, Гц)				
	(VIa)	(VIб)	(VIв)	(VIг)	β -MDP [14]
C1-OR	0.82с, 0.94м, 1.16м, 1.72м	1.18т, 1.45м, 1.62м, 1.89м	3.96т, 7.25м	2.82т, 7.30–7.47м, 7.55д, 7.63д	–
H1 ($J_{1,2}$)	4.40д (8)	4.24д (8.5)	4.39д (8.5)	4.34д (8.5)	4.41д
HNAc	1.75с	1.74с	1.57с	1.73с	1.77с
<u>NAc</u>	7.74д	7.80д	7.69д	7.76д	7.93д
C4-OH	5.22д	5.24д	5.27д	5.25д	6.60д
C6-OH	4.53ут*	4.59ут	4.61т	4.59ут	4.24т
<u>CH₃CHCO</u>	1.24д	1.23д	1.21д	1.24д	1.23д
Ala: CH ₃	1.24д	1.23д	1.22д	1.24д	1.24д
NH	7.38д	7.38д	7.39д	7.39д	7.51д
iGln: CO ₂ CH ₂ Ph	5.08с, 7.36м	5.08с, 7.36м	5.08с, 7.36м	5.08с, 7.36м	–
γ -CH ₂	2.36т	2.36т	2.35т	2.36т	2.20т
β -CH ₂	1.77м, 1.97м	1.77м, 2.02м	1.75м, 2.02м	1.78м, 2.01м	1.69м, 1.94м
CONH ₂	7.10с, 7.32с	7.11с, 7.31с	7.12с, 7.18с	7.09с, 7.30с	7.11с, 7.33с
NH	8.10д	8.11д	8.11д	8.09д	8.10д

* Условное сокращение: ут – уширенный триплет.

Все исследованные гликозиды мурамоилдипептида обладают протективным действием (рис. 1). Следует отметить оппозитное влияние действующих доз двух изомерных арилэтилгликозидов MDP на стимуляцию антиинфекционной резистентности – для β -2-*n*-бифенилэтил-MDP (VIIг) активность с уменьшением количества иммуномодулятора уменьшалась, а для β -2,2-дифенилэ-

тил-MDP (VIIв) наоборот резко возрастала. Ранее синтезированный нами β -*n*-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенил-MDP (VIIж) [16] – гликопептид с алкилфенильным агликоном, также содержащим 14 углеродных атомов, в целом более активен, чем гликозиды (VIIв) и (VIIг).

β -2-(Адамантил-1)этил-MDP (VIIб) показал умеренный протективный эффект, а наименьшую из представленных соединений иммуностимулирующую активность проявил β -4-*трет*-бутилциклогексил-MDP (VIIа). Его протективное действие было существенно меньше, чем у соответствующего ароматического аналога – β -4-*трет*-бутилфенил-MDP (VIIе) [16].

В представленной группе гликозидов MDP в случае наименьшей из исследованных доз препарата, для которой наименее вероятны дозозависимые эффекты, наблюдается тенденция к росту протективного действия с увеличением липофильности агликонов (рис. 2). Для трех соединений с близкой липофильностью агликонов – β -4-*трет*-бутилциклогексил- (VIIа), β -2-*n*-бифенилэтил- (VIIг) и β -4-*трет*-бутилфенил-MDP – отмечено одинаковое биологическое действие. Из этого ряда явно выпадает β -2,2-дифенилэтил-MDP (VIIв), для которого в данной дозе наблюдается максимальный эффект.

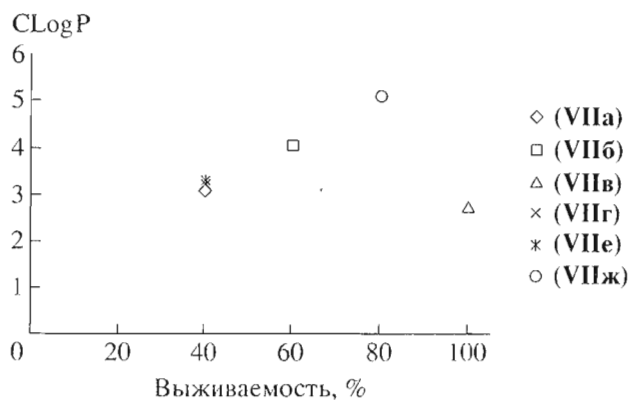


Рис. 2. Зависимость протективного эффекта гликозидов MDP от липофильности агликонов при внутрибрюшинном заражении мышей *S. aureus* (доза 2 мкг/мышь). CLogP – расчетное значение логарифма коэффициента распределения *n*-октанола/вода.

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 – Me_4Si . Приведены химические сдвиги (δ -шкала) и константы спин-спинового взаимодействия (J , Гц). Для отнесения сигналов использовались методики двойного гомоядерного резонанса, спектры ранее полученных соединений (в т.ч. из работ [2, 7]) и литературные данные [14].

ТСХ проводили на пластинках Sorbfil-АФВ-УФ (“Сорбполимер”, Россия). Вещества обнаруживали в УФ-свете (254 нм) и действием 5% раствора серной кислоты в этаноле с последующим нагреванием до 200–300°C. Использовали системы растворителей: хлороформ–этанол, 15 : 1 (А), 5 : 1 (Б); бензол–этанол, 10 : 1 (В); бутанол-1–уксусная кислота–вода, 3 : 1 : 1 (Г). Колоночную хроматографию (КХ) проводили на силикагеле Merck 230–400 меш. Данные элементного анализа ключевых соединений соответствуют расчетным значениям.

Использовали 4-*трет*-бутилциклогексанол и 2-(адамантил-1)этанол (Acros, Бельгия). 2,2-Дифенилэтанол и 2-(*n*-бифенил)этанол получили восстановлением LiAlH_4 , соответственно, дифенилуксусной и *n*-бифенилуксусной кислотами (Acros). Константы спиртов отвечают справочным данным.

Исследование биологической активности проводили по методике, приведенной в работе [15]. 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 мыш. Мышам контрольной группы внутрибрюшинно вводили по 0.5 мл 0.9% NaCl . Через 24 ч животных заражали культурой *S. aureus* (штамм Wood 46). Наблюдение за животными вели в течение 6 сут. 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 внутрибрюшинном введении 100%-ную гибель животных в течение первых 3 сут.

Гликозилирование оксазолиновым методом. К раствору 2-метил-(3,4,6-три-*O*-ацетил-1,2-дидезокси- α -*D*-глюкопирано)-[2,1-*d*]-2-оксазолина (**I**) [17] в сухом дихлорэтане (10 мл/г оксазолина) добавляли спирт в молярном соотношении 2 : 3 к оксазолину и 20–30 мг безводной TsOH . В синтезе

соединения (**IIa**) наоборот к 4-*трет*-бутилциклогексанолу добавляли порциями раствор оксазолина (**I**) в сухом дихлорэтане (соотношение спирт–гликозил-донор, 3 : 2). Реакцию проводили при 85–90°C (температура бани) до полного разложения оксазолина (контроль ТСХ в системах А, В). Реакционную смесь нейтрализовывали 50 мкл пиридина и упаривали. Остаток очищали КХ или кристаллизацией.

(*транс*-4-*трет*-Бутилциклогексил)- и (*цис*-4-*трет*-бутилциклогексил)-2-ацетиламино-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезокси- β -*D*-глюкопиранозиды (**IIa**), (**IIд**) синтезированы из 0.86 г (5.62 ммоль) *цис*-, *транс*-4-*трет*-бутилциклогексанола и 1.23 г (3.75 ммоль) оксазолина (**I**). После КХ (элюент: бензол \rightarrow бензол–этанол, 30 : 1) получили фракцию, содержащую смесь гликозидов (**IIa**), (**IIд**) и чистый гликозид (**IIa**) – 1.0 г (37%). Аналитический образец соединения (**IIa**) кристаллизовали из диэтилового эфира; т. пл. 164–166°C, $[\alpha]_{546} -8^\circ$ (*c* 1.0; хлороформ). ^1H -ЯМР – табл. 1. Рехроматографированием смеси гликозидов (**IIa**), (**IIд**) в градиентной системе бензол–этанол 75 : 1 \rightarrow 60 : 1 выделили 50 мг гликозида (**IIд**); т. пл. 159–162°C, $[\alpha]_{546} -27^\circ$ (*c* 1.0; хлороформ). ^1H -ЯМР – табл. 1.

[2-(Адамантил-1)этил]-2-ацетиламино-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезокси- β -*D*-глюкопиранозид (**IIб**) получили из 0.66 г (3.65 ммоль) 2-(адамантил-1)этанола и 1.8 г (5.47 ммоль) оксазолина (**I**). Выход гликозида (**IIб**) после КХ (элюент: бензол \rightarrow бензол–этанол, 20 : 1) – 1.5 г (81%); аналитический образец кристаллизовали из диэтилового эфира; т. пл. 123–125°C, $[\alpha]_{546} -17^\circ$ (*c* 1.0; хлороформ). ^1H -ЯМР – табл. 1.

(2,2-Дифенилэтил)-2-ацетиламино-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезокси- β -*D*-глюкопиранозид (**IIв**) получили из 0.79 г (4.0 ммоль) 2,2-дифенилэтанола и 2.0 г (6.08 ммоль) оксазолина (**I**). Остаток кристаллизовали добавлением диэтилового эфира и перекристаллизовали из изопропилового спирта. Выход гликозида (**IIв**) – 1.43 г (68%); т. пл. 176–178°C, $[\alpha]_{546} -42^\circ$ (*c* 1.0; хлороформ). ^1H -ЯМР – табл. 1.

(2-*n*-Бифенилэтил)-2-ацетиламино-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезокси- β -*D*-глюкопиранозид (**IIг**) получили из 0.67 г (3.36 ммоль) 2-*n*-бифенилэтанола и 1.66 г (5.05 ммоль) оксазолина (**I**). Остаток кристаллизовали добавлением диэтилового эфира и перекристаллизовали из изопропилового спирта. Выход гликозида (**IIг**) – 1.2 г (68%); т. пл. 172–174°C, $[\alpha]_{546} -15^\circ$ (*c* 1.0; хлороформ). ^1H -ЯМР – табл. 1.

Дезацетилирование по Земплеру. К раствору ацетатов (**IIa**)–(**IIг**) в сухом метаноле (10 мл/г) добавляли 0.01–0.05 экв. 0.1 н. раствора метилата натрия в метаноле, выдерживали 12–24 ч. Выпавшие кристаллы отфильтровывали и промывали метанолом. Фильтрат нейтрализовывали катио-

нитом КУ–2 (Н⁺). Смолу отфильтровывали, промывали метанолом и фильтрат упаривали.

(4-трет-Бутилциклогексил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (IIIa) получили из 0.7 г (1.44 ммоль) ацетата (IIa). Выход 0.5 г (98%); т. пл. 177–179°C, [α]₅₄₆ –25° (с 1.0; этанол).

[2-(Адамантил-1)этил]-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (IIIб) получили из 1.45 г (2.85 ммоль) ацетата (IIб). Выход 1.0 г (93%); т. пл. 157–160°C (с разл.), [α]₅₄₆ –25° (с 1.0; этанол).

(2,2-Дифенилэтил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (IIIв) получили из 1.4 г (2.66 ммоль) ацетата (IIв). Выход 1.0 г (95%); т. пл. 174–175°C (с разл.), [α]₅₄₆ –10° (с 1.0; этанол).

(2-п-Бифенилэтил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (IIIг) получили из 1.1 г (2.09 ммоль) ацетата (IIг). Выход 0.7 г (84%); т. пл. 210–214°C (с разл.), [α]₅₄₆ –21° (с 1.0; этанол).

Изопропилиденирование. К раствору триолов (IIIa)–(IIIг) в сухом THF (50 мл/г) при нагревании до 60°C добавляли 3 экв. 2,2-диметоксипропана и 10 мг сухой TsOH. Через 1 ч (контроль ТСХ в системах А, В) реакционную смесь нейтрализовывали пиридином и упаривали. Остаток растворяли в 50 мл хлороформа, промывали водой (3 × 25 мл). Органический слой высушивали безводным Na₂SO₄ и упаривали досуха.

(4-трет-Бутилциклогексил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-4,6-О-изопронилиден-β-D-глюкопиранозид (IVa) получили из 0.50 г (1.40 ммоль) триола (IIIa). После очистки КХ (элюент: хлороформ → хлороформ–этанол, 20 : 1) выход 0.5 г (91%); стеклообразный продукт, [α]₅₄₆ –77° (с 1.0; хлороформ).

[2-(Адамантил-1)этил]-2-ацетамидо-2-дезоксид-4,6-О-изопронилиден-β-D-глюкопиранозид (IVб) получили из 0.6 г (1.58 ммоль) триола (IIIб). После очистки КХ (элюент: хлороформ → хлороформ–этанол, 20 : 1) выход 0.6 г (91%); стеклообразный продукт, [α]₅₄₆ –56° (с 0.67; хлороформ).

(2,2-Дифенилэтил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-4,6-О-изопронилиден-β-D-глюкопиранозид (IVв) получили из 0.6 г (1.51 ммоль) триола (IIIв). После очистки КХ (элюент: хлороформ → хлороформ–этанол, 20 : 1) выход 0.6 г (91%); аморфное вещество, [α]₅₄₆ –56° (с 1.0; хлороформ).

(2-п-Бифенилэтил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-4,6-О-изопронилиден-β-D-глюкопиранозид (IVг) получили из 0.5 г (1.26 ммоль) триола (IIIг). После очистки КХ (элюент: хлороформ → хлороформ–этанол, 20 : 1) выход 0.5 г (91%); аморфное вещество, [α]₅₄₆ –48° (с 1.0; хлороформ).

Получение мурамовых кислот. К раствору ацетата (IVa)–(IVг) в сухом диоксане (20 мл/г) при перемешивании порциями добавляли 4 экв. гидрида натрия. Реакционную смесь нагревали до 95°C, выдерживали при этой температуре 1 ч и после

охлаждения до 65°C приливали 1.5 экв. (S)-2-бромпропионовой кислоты и выдерживали при 65°C еще 1 ч. После охлаждения избыток гидрида натрия разлагали этанолом, смесь концентрировали и выливали в холодную воду. Раствор подкисляли 1 н. соляной кислотой до pH 2–3 и экстрагировали мурамовую кислоту хлороформом. Экстракт высушивали безводным Na₂SO₄ и упаривали. Кислоты без дополнительной очистки использовали для конденсации с дипептидом. По данной методике синтезировали:

(4-трет-Бутилциклогексил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-4,6-О-изопронилиден-3-О-(D-1-карбоксииэтил)-β-D-глюкопиранозид (Va). Алкилированием (S)-2-бромпропионовой кислотой 500 мг (1.26 ммоль) ацетата (IVa) получили 510 мг (86%) кислоты (Va).

[2-(Адамантил-1)этил]-2-ацетамидо-2-дезоксид-4,6-О-изопронилиден-3-О-(D-1-карбоксииэтил)-β-D-глюкопиранозид (Vб). Алкилированием (S)-2-бромпропионовой кислотой 0.58 г (1.38 ммоль) ацетата (IVб) получили 0.6 г (90%) кислоты (Vб).

(2,2-Дифенилэтил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-4,6-О-изопронилиден-3-О-(D-1-карбоксииэтил)-β-D-глюкопиранозид (Vв). Алкилированием (S)-2-бромпропионовой кислотой 0.59 г (1.35 ммоль) соединения (IVв) получили 0.57 г (84%) кислоты (Vв).

(2-п-Бифенилэтил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-4,6-О-изопронилиден-3-О-(D-1-карбоксииэтил)-β-D-глюкопиранозид (Vг). Алкилированием (S)-2-бромпропионовой кислотой 0.5 г (1.14 ммоль) соединения (IVг) получили 0.51 г (88%) кислоты (Vг).

Получение гликопептидов и гидролиз изопронилиденных групп. К раствору мурамовых кислот (Va)–(Vг) в сухом THF (10 мл/г) при перемешивании добавляли 1.1 экв. HOSu и 1.1 экв. DCC. Через 3–5 ч (контроль ТСХ в системах А, В) отфильтровывали осадок дициклогексилмочевины, промывали его растворителем. К фильтрату добавляли 1 экв. трифторацетата бензилового эфира L-аланил-D-изоглутамина [18] и триэтиламин до pH 8. По окончании реакции (контроль ТСХ в системах А, Б) растворитель упаривали.

Алкилиденные производные растворяли при нагревании на кипящей водяной бане в 70% уксусной кислоте (10 мл/г) и выдерживали при этой температуре 5–15 мин (контроль ТСХ в системах Б, Г). Раствор упаривали досуха, соупаривали с толуолом. Остаток очищали КХ.

Бензиловый эфир O-[(4-трет-бутилциклогексил)-2-ацетамидо-2,3-дидезокси-β-D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамина (VIa) получили из дипептида и 0.51 г (1.09 ммоль) мурамовой кислоты (Va) после гидролиза и КХ (элюент: хлороформ → хлороформ–этанол, 10 : 1). Выход 310 мг (40%); аморфный порошок, [α]₅₄₆ –2° (с 1.0; этанол). ¹H-ЯМР – табл. 2.

Бензиловый эфир *O*-{[2-(адамантил-1)этил]-2-ацетамидо-2,3-дидезокси- β -D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (VIb) получили из дипептида и 0.6 г (1.22 ммоль) мурамовой кислоты (Vb) после гидролиза и КХ (элюент: хлороформ \rightarrow хлороформ-этанол, 10 : 1). Выход 360 мг (40%) соединения (VIb); аморфный порошок, $[\alpha]_{546} +12^\circ$ (с 0.67; этанол). $^1\text{H-NMR}$ – табл. 2.

Бензиловый эфир *O*-{[2,2-дифенилэтил]-2-ацетамидо-2,3-дидезокси- β -D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (VIв) получили из дипептида и 570 мг (1.12 ммоль) мурамовой кислоты (Vв) после гидролиза и КХ (элюент: хлороформ \rightarrow хлороформ-этанол, 10 : 1). Выход 385 мг (45%) соединения (VIв); аморфный порошок, $[\alpha]_{546} +3^\circ$ (с 0.67; этанол). $^1\text{H-NMR}$ – табл. 2.

Бензиловый эфир *O*-{[2-*n*-бифенилэтил]-2-ацетамидо-2,3-дидезокси- β -D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (VIr) получили из дипептида и 500 мг (0.98 ммоль) мурамовой кислоты (Vr) после гидролиза и КХ (элюент: хлороформ \rightarrow хлороформ-этанол, 10 : 1). Выход 305 мг (41%) соединения (VIr); т. пл. 172–175°C (с разл.), $[\alpha]_{546} +9^\circ$ (с 0.67; этанол). $^1\text{H-NMR}$ – табл. 2.

Гидрогенолиз бензильных защит. Бензиловые эфиры (VIa)–(VIr) растворяли в смеси THF–вода, 9 : 1 (50 мл/г) и подвергали гидрогенолизу над 10% Pd/C (1 : 5 к веществу) при комнатной температуре в течение 3–6 ч. По окончании реакции (контроль ТСХ в системе Г) катализатор отфильтровывали, промывали растворителем, фильтрат упаривали.

O-{[4-трет-Бутилциклогексил]-2-ацетамидо-2,3-дидезокси- β -D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (VIIa) получили из 290 мг (0.40 ммоль) бензилового эфира (VIa). Выход 240 мг (96%); аморфный порошок, $[\alpha]_{546} +2^\circ$ (с 0.83; этанол).

O-{[2-(Адамантил-1)этил]-2-ацетамидо-2,3-дидезокси- β -D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (VIIб) получили из 260 мг (0.35 ммоль) бензилового эфира (VIб). Выход 220 мг (96%); аморфный порошок, $[\alpha]_{546} +2^\circ$ (с 0.83; этанол).

O-{[2,2-Дифенилэтил]-2-ацетамидо-2,3-дидезокси- β -D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (VIIв) получили из 260 мг (0.34 ммоль) бензилового эфира (VIв). Выход 220 мг (96%); аморфный порошок, $[\alpha]_{546} +4^\circ$ (с 1.0; этанол).

O-{[2-*n*-Бифенилэтил]-2-ацетамидо-2,3-дидезокси- β -D-глюкопиранозид-3-ил]-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (VIIr) получили из 280 мг (0.37 ммоль) бензилового эфира (VIr). Выход 240 мг (97%); аморфный порошок, $[\alpha]_{546} +6^\circ$ (с 1.0; этанол).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Караулов А.В., Калюжин О.В., Земляков А.Е. // Росс. биотерапевт. журн. 2002. Т. 1. С. 14–24.
2. Земляков А.Е., Цикалов В.В., Калюжин О.В., Курьянов В.О., Чирва В.Я. // Биоорган. химия. 2003. Т. 29. С. 316–322.
3. Kalyuzhin O.V., Zemlyakov A.E., Fuchs B.B. // Int. J. Immunopharmac. 1996. V. 18. P. 651–659.
4. Krivorutchenko Yu.L., Andronovskaja I.B., Hinkula J., Krivoshein Yu.S., Ljungdahl-Stahle E., Pertel S.S., Grishkovets V.I., Zemlyakov A.E., Wahren B. // Vaccine. 1997. V. 15. P. 1479–1486.
5. Земляков А.Е., Чирва В.Я. // Химия природн. соед. 1987. № 5. С. 714–718.
6. Курьянов В.О., Земляков А.Е., Чирва В.Я. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 439–447.
7. Курьянов В.О., Земляков А.Е., Чирва В.Я. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 287–290.
8. Shiba T., Kotani S., Yamamura Y., Nagese O., Ogawa H. Muramyl dipeptide Derivatives: Пат. США 4317771 // РЖ Химия. 1983. 7 О 19П.
9. Baschang G. // Tetrahedron. 1989. V. 45. P. 6331–6360.
10. Tenu J.P., Bernard I.M., Petit J.F., Philips N. Derivatives of Muramyl Peptides and Steroids Having Macrophage Activation Properties: Пат. Франция 2557758 // Chem. Abstr. 1986. V. 104. 19825k.
11. Kusumoto S., Inage M., Shiba T., Azuma I., Yamamura Y. // Tetrahedron Lett. 1978. № 49. P. 4899–4902.
12. Зурабян С.Э., Хорлин А.Я. // Успехи химии. 1974. Т. 43. С. 1865–1903.
13. Flowers H.M., Jeanloz R.W. // J. Organ. Chem. 1963. V. 28. P. 2983–2986.
14. Femand-Jian S., Perly B., Level M., Lefrancier P. // Carbohydr. Res. 1987. V. 162. P. 23–32.
15. Калюжин О.В., Мулик Е.Л., Сергеев В.В., Калина Н.Г., Елкина С.И., Калюжина М.И., Кузовлев Ф.Н., Караулов А.В. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2000. № 4. С. 73–77.
16. Земляков А.Е., Цикалова В.Н., Цикалов В.В., Чирва В.Я. // Журн. орган. фарм. химии. 2004. Т. 2. С. 17–20.
17. Lemieux R.U., Driguez H. // J. Amer. Chem. Soc. 1975. V. 52. P. 4063–4068.
18. Ростовцева Л.И., Андропова Т.М., Малькова В.П., Сорокина И.Б., Иванов В.Т. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. С. 1843–1858.

Synthesis and Protective Activity of β -Glycosides of *N*-Acetylmuramyl-*L*-Alanine-*D*-Isoglutamine with Alkylalicyclic and Arylaliphatic Aglycons

A. E. Zemlyakov[#], V. N. Tsykalova*, V. V. Tsykalov*,
V. Ya. Chirva*, E. L. Mulik^{**}, and O. V. Kalyuzhin^{**}

[#]Phone: +38 (0652) 23-3885; fax: +38 (0652) 23-2310; e-mail: alex_z@crimea.edu

*Vernadsky Tauric National University, pr. Akademika Vernadskogo 4, Simferopol, 95007 Ukraine

^{**}Research Institute of Human Morphology, Russian Academy of Sciences, ul. Tsyurupy 3, Moscow, 117418 Russia

The following glycosides of *N*-acetylmuramyl-*L*-alanine-*D*-isoglutamine (MDP) were synthesized: β -4-*tert*-butylcyclohexyl MDP, β -2-(adamant-1-yl)ethyl MDP, β -2,2-diphenylethyl MDP, and β -2-(*p*-biphenyl)ethyl MDP. The starting peracetylated β -*N*-acetylglucosaminides were prepared by the oxazoline method. They were converted into 4,6-*O*-isopropylidene-*N*-acetyl-*D*-muramic acids, which were coupled with *L*-Ala-*D*-Glu(NH₂)OBn. The target glycopeptides were obtained after their deprotection. The stimulation of the antiinfection resistance of mice against *Staphylococcus aureus* by the MDP glycosides was studied. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: glycopeptides, muramyl dipeptide, oxazoline synthesis of muramyl dipeptide glycosides, antibacterial resistance