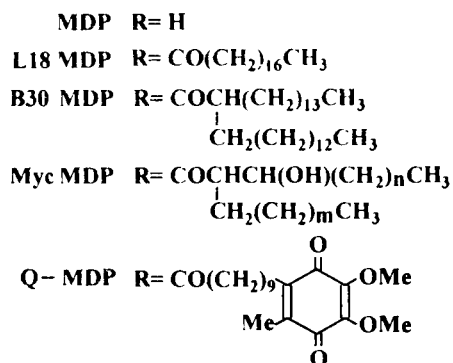
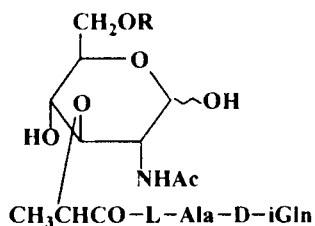


СИНТЕЗ, ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ N-АЦЕТИЛМУРАМОИЛ-L-АЛАНИЛ-D-ИЗОГЛУТАМИНА

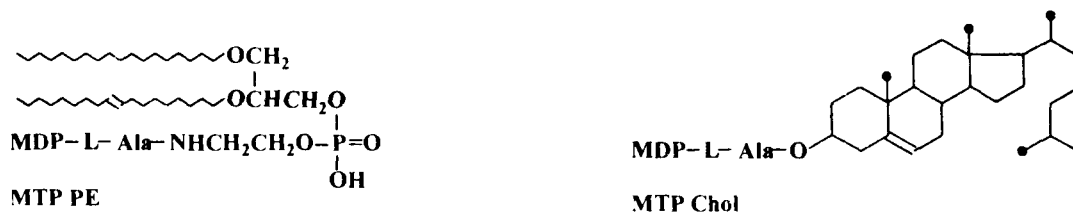
А. Е. Земляков, кандидат химических наук, доцент

Определение в 1974 г. N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина (мурамоилдипептида, MDP) минимальной адьювантноактивной структурой пептидогликанов клеточных стенок бактерий, в том числе входящих в состав адьюванта Фрейнда [1], вызвало огромный интерес к этому гликопептиду. Простота структуры, широкие возможности для модификации и проявление аналогами MDP адьювантной, иммуностимулирующей, противоопухолевой активности подвигли химиков на синтез нескольких сотен производных мурамоилдипептида. Наиболее перспективными для применения в практической иммунологии и медицине в качестве адьювантов считаются бутиловый эфир N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-глутамина (мурабутид) [2] и MDP-L-аланилфосфатидилэтаноламид (MTP-PE) [3]; в качестве стимуляторов антиинфекционной резистентности - 6-O-стеароил-MDP (L18-MDP) [4] и 6-O-(2-тетрадецилгексадеканоил)-MDP (B30-MDP) [5]; для противоопухолевой иммунотерапии - 6-O-хиноноил-MDP (Q-MDP) [6]. 6-O-миколоил-MDP (Myc-MDP) [7] и холестеринавый эфир MDP-L-аланина (MTP-Chol) [8].



Если производные мурамоилдипептида по аминогруппе и первичной гидроксильной группе были хорошо изучены, то аномерный гидроксил, как центр модификации, практически не заинтересовал исследователей. К началу наших работ в этой области были описаны синтезы α- и β-метил- [9] и α- и β-бензил- [10,11] гликозидов MDP, причем биологические испытания не дали однозначного ответа на вопрос о влиянии конфигурации аномерного центра и природы агликона гликозидных производных мурамоилдипептида на биологическую активность [12-14]. Рассмотренный в работе [15] β-метилгликозид фуранозного аналога MDP, оказался неактивным. В тоже время высокую адьювантность в тестах гиперчувствительности замедленного типа проявили

1-О-ацильные производные мурамоилдипептида (от ацетата до пальмиата) [16,17] и β-1-тиоацильные производные MDP [18,19]. Адьювантный эффект β-тиоалкилгликозидов мурамоилдипептида был незначительным [18]. Также мала адьювантность 1-N-ацетамида MDP [13], синтез которого не был описан.



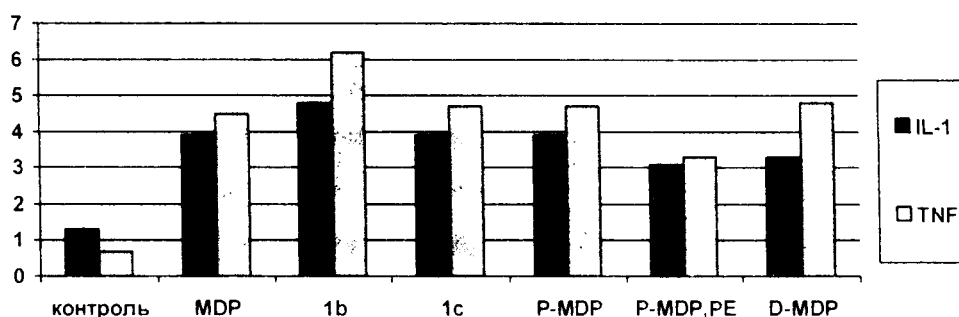
На фоне этих фактов нами было предложено использовать гликозидный центр в молекуле мурамоилдипептида для ее модификации в виде О-гликозидов. Такой подход обеспечивает большую экономность синтеза гликопептидов, так как исключается необходимость введения и удаления временных защитных групп по аномерному гидроксилу. Кроме того, таким образом придается большая устойчивость производным MDP в биологических средах по сравнению со сложными эфирами мурамоилдипептида.



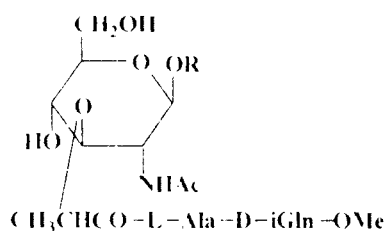
Первоначально были синтезированы β-гептил и β-гексадецилгликозиды MDP (**1b,c**) [20]. Ключевая стадия синтеза - получение сполна ацелированных β-алкилгликозидов N-ацетилглюкозамина (NAG), проводилась по оксазолиновому методу [21]. Последовательное дезацелирование этих веществ по Земплону, защита гликольной группировки у C-4 и C-6 в виде бензилиденовых производных и алкилирование свободной гидроксильной группы у C-3 α-L-хлорпропионовой кислотой в присутствии гидроксида натрия в условиях реакции S_N2 привело к защищенным D-мурамовым кислотам. Эти кислоты конденсировали с γ-бензиловым эфиром L-аланил-D-изоглутамина. Деблокирование гликопептидов включало два этапа: кислотный гидролиз ацетальной защиты и каталитический гидрогенолиз бензилового эфира в остатке изоглутамина.

Изучение биологической активности этих гликопептидов в частности показало, что β-гептил-MDP **1b** стимулирует продукцию макрофагами таких важных медиаторов иммунного ответа как интерлейкин-1 и фактор некроза опухолей [22-24], дает четкий адьювантный эффект, а β-гексадецил-MDP **1c** наряду с адьювантностью [25] проявляет радиопротекторные свойства [26].

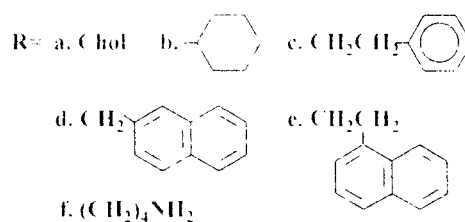
Влияние гликопептидов на продукцию интерлейкина-1 (IL-1) и фактора некроза опухолей (TNF) перитонеальными макрофагами мышей [24].



Высокая активность гликозидов **1b,c** побудила нас к синтезу новых гликозидов MDP с агликонами различного строения и липофильности - линейным и α -разветвленным алифатическими спиртами и диалкиловым эфиром глицерина. Выбор липофильных спиртов основывался на литературных данных, подтверждающих, что наиболее активные соединения содержат фрагменты двух длинноцепочечных молекул, образующих относительно жесткие гидрофобные стержнеобразные структуры, хорошо закрепляющиеся на липидных мембранах иммунных клеток (сер. MTP-PE, Muc-MDP, B30-MDP). Вторую группу полученных нами гликозидных аналогов MDP составили β -бутил-, β -(2-додецилтетрагенил)- и β -(2,3-дидодецилбензиридил)- [28] гликозиды MDP (**1a,d,e**). Соответствующие гликозиды N-ацетилглюкозамина были синтезированы оксазолиновым способом, который обеспечивает высокую стереоспецифичность гликозирования.



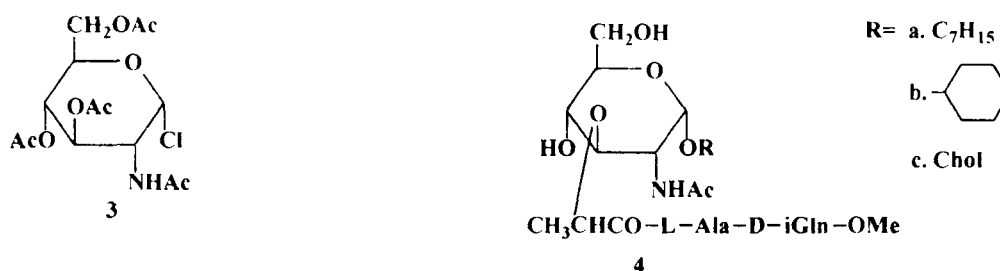
2



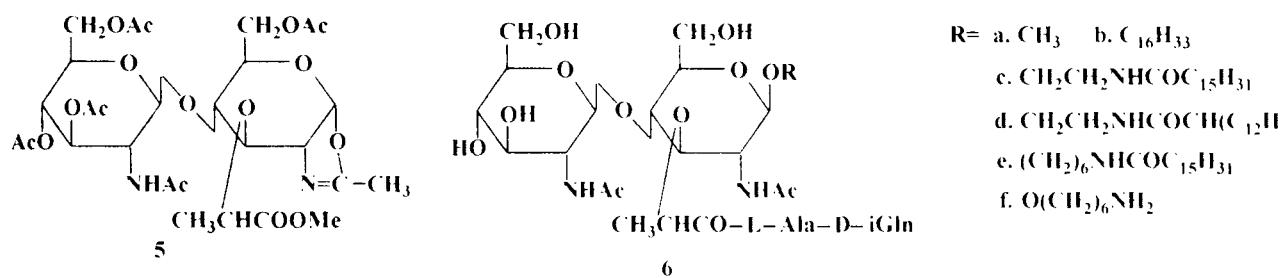
В тоже время оксазолиновый метод не дает хороших результатов в случае менее реакционноспособных вторичных спиртов. Поэтому в синтезе β -холестерил-MDP **2a**, являющегося структурным аналогом MTP-Chol, для гликозирования холестерина в качестве гликозид-донора был использован перацетилированный α -глюкозаминилхлорид **3**. Реакцию проводили в дихлорэтане в присутствии катализатора гликозирования по Землену-Гельфериху - цианида ртути(II). После деацетилирования β -холестерилгликозид NAG был выделен с выходом 35% [29]. На его основе по стандартной схеме получили гликопептид **2a**, являющийся сильным адьювантом [26].

Решая задачу по разработке удобного способа получения гликозидов NAG, как ключевых соединений в синтезе гликозидов MDP, нами был предложен новый катализатор синтеза гликозидов N-ацетилглюкозамина по методу Земплена-Гельфериха - иодид ртути(II) [30]. Его применение позволило использовать в качестве гликозил-донора стабильный и легкодоступный α -хлорид **3** и обеспечило быстроту реакции, легкость получения и высокие выходы гликозидов в реакциях с различными первичными и вторичными спиртами (например, β -холестерилгликозид NAG был получен с выходом 57%). Этот метод дал возможность получить β -гликозиды мурамоилдипептида с агликонами карбоциклического строения, в том числе ароматическими. Такие гликопептиды являются альтернативой производным MDP с липофильными компонентами карбоцепного характера. Были синтезированы β -циклогексил-, β -фенэтил-, β -(2-нафтил)метил- и β -2-(1-нафтил)этилгликозиды метилового эфира N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина (**2b-e**) [31]. Принципиальная схема синтеза этих соединений аналогична схеме получения гликозидов **1b,c**.

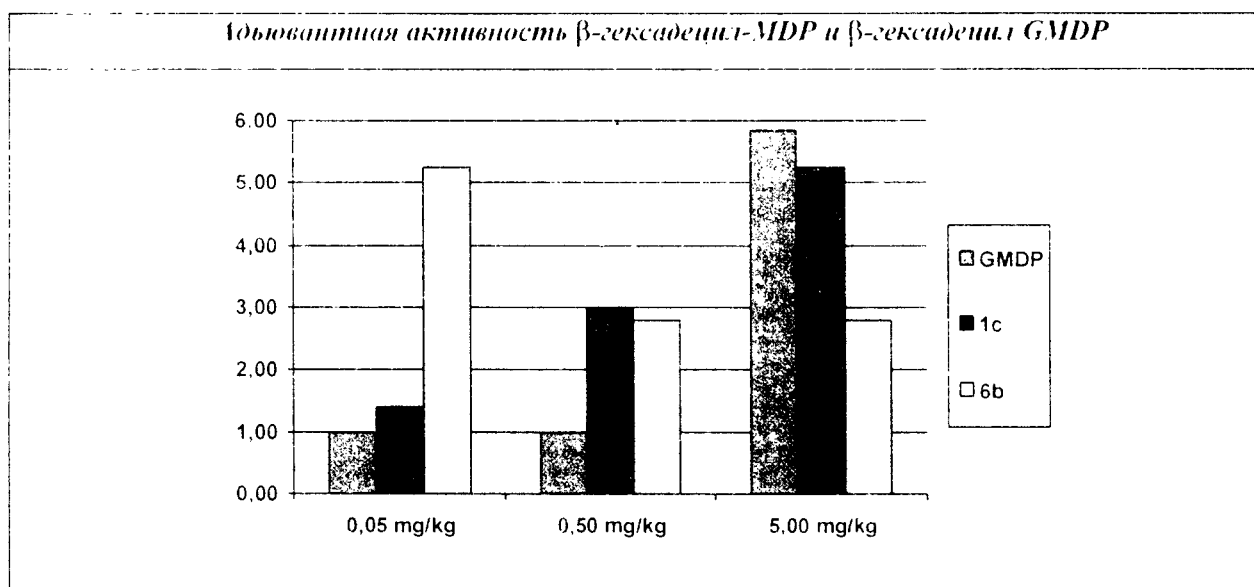
При проведении реакции гликозилирования в присутствии HgI_2 в дихлорэтане или нитрометане при высокой температуре образуется значительное количество α -гликозидов [32], что сделало доступными соответствующие гликозиды NAG. Использование этих гликозидов в качестве исходных соединений дало возможность синтезировать малоизученные α -гликозиды мурамоилдипептида. К настоящему времени получены α -гептил-, α -циклогексил- и α -холестерил-MDP (**4a-c**). Сравнение биологического действия этих гликопептидов с действием соответствующих β -изомеров позволит решить вопрос о влиянии конфигурации аномерного центра мурамоилдипептида на биологическую активность.



Наряду с гликозидами MDP нами были разработаны синтезы гликозидных производных дисахаридного аналога мурамоилдипептида - O-(N-ацетилглюкозаминил)-(β 1 \rightarrow 4)-MDP (GMDP), обладающего высокой биологической активностью, в том числе адьювантной и противоопухолевой. К моменту начала наших исследований были получены только пептидные [33] и 6-O-ацильные [34] модификации GMDP.



Исходным веществом в наших синтезах послужила глюкозаминилмурамовая кислота, которую этерифицировали диазметаном и ацетилировали. Последовательное 1-О-дезацетилирование, действие хлористым тионилом и обработка гликозилхлорида по методу Лемье привело к оксазолину **5**, которым гликозилировали метанол и гексадеканол-1. После удаления сложноэфирных защит дисахаридмурамовые кислоты конденсировали с дипептидом. Завершающий каталитический гидролиз бензильного эфира в дипептидном фрагменте дал целевые β -метил- и β -гексадецил-GMDP (**6a,b**) [35]. Последнее соединение имеет сравнимое с GMDP антивирусное действие при меньшей в 100 раз дозе [25].

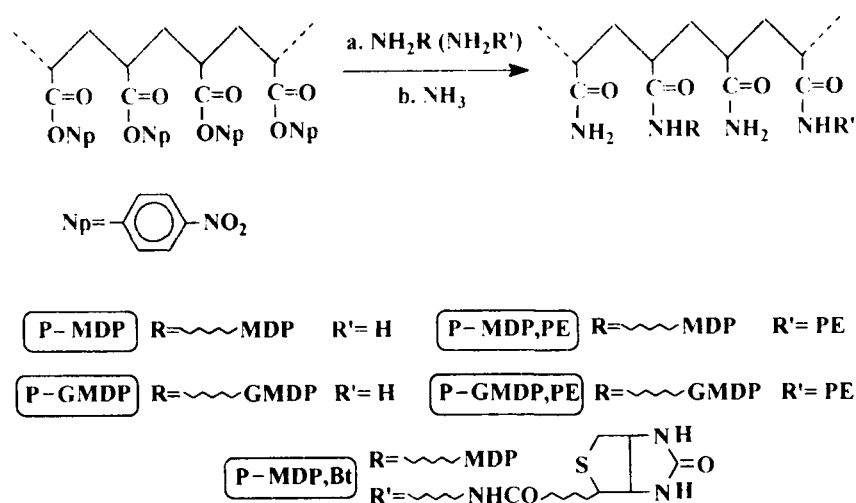


Эту же схему синтеза мы применили для получения липофильных β -(*N*-ацил- ω -аминоалкил)-гликозидов GMDP. Липофильные алкилоны для этой работы были получены действием *N*-гидроксисулфинильных эфиров линейной (гексадекановой) и α -разветвленной (2-додецилтетрадекановой) кислот на моноамины и 6-аминогексанол-1. В результате были синтезированы β -(2-гексадеканоиламиноэтил)-, β -[2-(2-додецилтетрадеканоиламиноэтил)]- и β -(6-гексадеканоиламиноокси)-GMDP (**6c-e**) [36].

Гликозидный центр в молекулах мурамылдипептида и GMDP был нами также не использован для введения ω -аминоалкильного спейсера в виде азидного преспейсера. Такие соединения

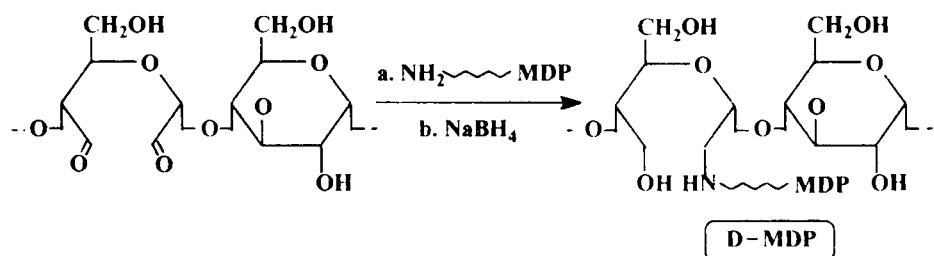
необходимы для получения “макромолекулярных” мурамоилдипептидов (конъюгаты MDP с природными или синтетическими полимерами), синтетических вакцин (совместная иммобилизация адъюванта и синтетического антигена на полимерной матрице), полимерных зондов с MDP специфичностью (к полимерному кору присоединены мурамоилдипептид и флюоресцентная метка) или для конъюгации с другими биологически активными соединениями. В литературе описано применение β -6-аминогексил- (**1f**) [37] и *n*-аминофенил- (**1g**) [9,38] гликозидов MDP.

В основе предложенного нами синтеза спейсерированного гликопептида **1f** лежит гликозилирование гександиола-1,6 оксазолином с последующим мезилированием свободного гидроксила и замещением мезилата на азидную функцию [39]. Использование азидного преспейсера позволило увеличить выход целевого гликопептида до 22% по сравнению с 7% в работе [37]. В дальнейшем схема была дополнительно упрощена применением в качестве стартового преспейсера 6-хлоргексанола-I или 4-хлорбутанола-1, что дало возможность синтезировать соответственно гликопептид **1f** (с общим выходом 31%) и β -4-аминобутил-MDP (**2f**) [40]. На основе дисахаридного оксазолина **5** аналогично был получен β -6-аминогексил-GMDP (**6f**) [41].



Действием спейсерированных гликопептидов **1f** и **6f** на поли(4-нитрофенилакрилат) по методу Бовина [42] получили конъюгаты полиакриламида (ПАА) с MDP и GMDP. Одновременная обработка спейсерированными гликопептидами и фосфатидилэтаноламином (PE) дала липофильные конъюгаты **ПАА-MDP,PE** и **ПАА-GMDP,PE**. Применение ^{14}C -меченного PE или 6-аминогексиламида биотина (**Bt**) позволило создать изотопно- и флюоресцентномеченные конъюгаты **ПАА-MDP**, необходимые для изучения механизмов действия полимерных аналогов MDP [25,26].

В качестве альтернативной матрицы был взят биodeградируемый полимер - диальдегид декстран. Конденсация аминоспейсерированного мурамоилдипептида **1f** проводилась по имеющимся в полисахариде альдегидным группам с последующим исчерпывающим восстановлением NaBH_4 , что позволило получить конъюгат декстрана и MDP (**D-MDP**) [42]. Полимерные формы мурамоилдипептида **PAA-MDP**, **PAA-MDP,PE** и **D-MDP** показали высокую активность в ряде тестов противоопухолевого иммунитета [43].



Таким образом к настоящему времени стало очевидным, что гликозиды MDP перспективны для дальнейшего расширенного изучения, особенно в тестах *in vivo*. Особый интерес представляют гептил- и циклогексилгликозиды мурамоилдипептида, хорошо растворяющиеся в воде, агликон которых обеспечивает амфифильные свойства, а также гексадецил- и холестерилгликозиды MDP, относящиеся к высоколипофильным соединениям, что позволяет им встраиваться в эмульсии и липосомы. Наиболее вероятная область практического применения этих гликопептидов - иммунотерапия опухолей, где накоплено большое количество позитивных результатов биологических испытаний.

Несомненна перспективность спейсерированных мурамоилдипептидов и их конъюгатов с полимерами, относящихся к стимуляторам пролонгированного действия. В ближайшее время планируется получить спейсерированный гликопептид с α -конфигурацией гликозидной связи, мурамоилдипептид с олигоэтиленгликольным спейсером, обладающим меньшей гидрофобностью, и их конъюгаты с PAA и другими полимерами. Сравнение их биологической активности с ранее синтезированными конъюгатами позволит оценить влияние конфигурации гликозидного центра гликопептида, природы спейсера и полимера на иммуностимулирующий эффект. Полимерные гликопептиды найдут применение в качестве инструментов для изучения механизмов действия гликопептидов, а также вероятно создание на их основе синтетических вакцин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ellouz F., Adam A., Ciorbaru R., et al. // Biochem. Biophys. Res. Comm.-1974.-V.59.-№4.-P.1317-1325.
2. Lefrancier P., Derrien M., Jamet X., et al. // J. Med. Chem.-1982.-V.25.-№1.-P.87-90.
3. Sone S., Mutsuura S., Ogawara M., et al. // J. Immun.-1984.-V.132.-№4.-P.2105-2110.

4. Kusumoto S., Okada S., Yamamoto K., et al. // Bull. Chem. Soc. Jap.-1978.-V.51.-№7.-P.2122-2126.
5. Kusumoto S., Inage M., Shiba T., et al. // Tetrahedron Lett.-1978.-№49.-P.4899-4902.
6. Kobayashi S., Fukuda T., Imada I., et al. // Chem. Pharm. Bull. -1979.-V.27.-№12.-P.3193-3196.
7. Shiba T., Okada S., Kusumoto S., et al. // Bull. Chem. Soc. Jap.-1978.-V.51.-№11.-P.3307-3311.
8. Tenu J.P., Bernard I.M., Petit J.F., et al. Патент 2557758 Франция. // Chem. Abstr.-1986.-V.104.-19825k.
9. Lefrancier P., Derrien M., Lederman I., et al. // Int. J. Peptide Protein Res.-1978.-V.11.-P.289-290.
10. Hasegawa A., Kaneda Y., Amano M., et al. // Agric. Biol. Chem.-1978.-V.42.-№11.-P.2187-2189.
11. Merser C., Sinay P., Adam A. // Biochem. Biophys. Res. Comm.-1975.-V.66.-№4.-P.1316-1322.
12. Nagai Y., Akiyama K., Kotani S., et al. // Cell. Immun.-1978.-V.35.-P.168-172.
13. Durette P.L., Dorn C.P., Jr., Shen T.Y., et al. // Carbohydr. Res.-1982.-V.108.-№1.-P.139-147.
14. Azuma I., Okumura H., Saiki I., et al. // Infect. Immun.-1981.-V.53.-№1.-P.834-839.
15. Durette P.L., Dorn C.P., Jr., Friedman A., et al. // J. Med. Chem.-1982.-V.25.-№9.-P.1028-1033.
16. Hasegawa A., Hioki Y., Kiso M., et al. // Carbohydr. Res.-1983.-V.123.-№1.-P.63-71.
17. Hasegawa A., Kigawa K., Kiso M., et al. // Agric. Biol. Chem.-1980.-V.50.-№8.-P.2091-2094.
18. Hasegawa A., Hioki Y., Kiso M., et al. // J. Carbohydr. Chem.-1982-83.-V.1.-№3.-P.317-323.
19. Hasegawa A., Hioki Y., Yamamoto E., et al. // J. Carbohydr. Chem.-1986.-V.5.-№3.-P.359-369.
20. Земляков А.Е., Чирва В.Я. // Химия природн. соедин.-1987.-№5.-С.714-718.
21. Зурабян С.Э., Хорлин А.Я. // Успехи химии.-1974.-Т.43.-№10.-С.1865-1903.
22. Рахмилевич А.Л., Мигдал Т.Л., Рахимова М.С. и др. // Антибиотики и химиотерапия.-1989.-Т.-34.-№11.-С.836-839.
23. Медведев А.Э., Фукс Б.Б., Бовин Н.В. и др. // Бюлл. экспер. биологических-1992.-№12.-С.626-628.
24. Калюжин О.В., Фукс Б.Б., Бовин Н.В. и др. // Бюл. экспер. биологических-1994.-№5.-С.510-513.
25. Земляков А.Е. Синтез и биологическая активность производных N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина и его дисахаридных аналогов. Автореф. диссерт... кандидат хим. наук. Одесса, 1989.-18с.
26. Кур'янов В.О. Синтез похідних мурамоїлдіпептиду: ліпоглікопептиди та кон'югаты. Автореф. диссерт... кандидат хим. наук. Одесса, 1995.-24с.
27. Курьянов В.О., Земляков А.Е., Чирва В.Я. // Укр. хим. журн.-1994.-Т.60.-№ 12.-С.858-861.
28. Курьянов В.О., Земляков А.Е., Чирва В.Я. // Биоорган. химия.-1994.-Т.20.-№4.-С.439-447.

29. Курьянов В.О., Земляков А.Е., Чирва В.Я. // Биоорг. химия.-1996.-Т.22.-№4.-С.287-290.
30. Земляков А.Е., Курьянов В.О., Чирва В.Я. // Химия природн. соедин.-1996.-№3.-С.367-371.
31. Zemlyakov A.E, Kur'yanov V.O., Tsikalov V.V., et al. // 2-nd International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. Abstracts. / Eskisehir (Turkey), 1996.-P.124.
32. Zemlyakov A.E, Kur'yanov V.O., Sidorova E.A., et al. // 2-nd International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. Abstracts. / Eskisehir (Turkey), 1996.-P.122.
33. Ростовцева Л.И., Андропова Т.М., Малькова В.П. и др. // Биоорг. химия.-1981.-Т.7.-№12.-С.1843-1858.
34. Inage M., Imato M., Kambayashi Y., et al. // Tetrahedron Lett.-1980.-№21.-P.3767-3770.
35. Земляков А.Е., Курьянов В.О., Чирва В.Я. и др. // Биоорг. химия.-1987.-Т.13.-№11.-С.1575-1578.
36. Земляков А.Е., Курьянов В.О., Пертель С.С. и др. // Биоорг. химия.-1990.-Т.16.-№10.-С.1393-1397.
37. Ponpipom M.M., Rupprecht K.M. // Carbohydr. Res.-1983.-V.113.- P.57-62.
38. Parant M., Damais C., Audibert F., et al. // J. Infect. Dis.-1978.-V.138.-№3.-P.378-386.
39. Земляков А.Е., Чирва В.Я., Бовин Н.В. Авт. св. СССР №440061.
40. Земляков А.Е., Какаян Е.С., Чирва В.Я. // Биоорг. химия.-1989.-Т.15.-№11.-С.1527-1533.
41. Земляков А.Е., Пертель С.С., Кобзарь В.А. и др. // III Совещание по хим. реактивам: Тез. докл. / Ашхабад, 1989.- С.5.
42. Bovin N.V., Korchagina E.Yu., Zemlyanukhina T.V., et al. // Glycoconjugate J.-1993.-V.10.-P.142-151.
43. Калюжин О.В. иммуномодулирующая активность новых производных мурамоилдипептида и ее корреляция с проникновением этих веществ через биомембраны. Автореф. диссерт... кандидат медицинских наук. М., 1995.-22с.