

Л.Ю. Гурьева,
А.А. Северьянова,
Ю.Л. Себякин

АКТИВНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ D-ГАЛАКТОЗЫ И D-ЛАКТОЗЫ В СИНТЕЗЕ НЕОГЛИКОКОНЬЮГАТОВ

УДК 547.455+547.458.2

Осуществлён синтез активных производных углеводов D-галактозы и D-лактозы и неогликоконъюгатов на их основе. Для получения модифицированных гликолипидов предложен подход с использованием N-гидроксисукцинимидных эфиров углеводов.

Гликоконъюгаты – высокомолекулярные природные структуры, которые встречаются в источниках растительного, бактериального и животного происхождения и играют важную роль практически во всех биологических процессах. К таким углеводсодержащим комплексам относятся гликолипиды, гликопротеины, пептидогликаны, протеогликаны, липополисахариды. Гликоконъюгаты, являясь важнейшими компонентами мембран, выполняют структурные и метаболические функции, экспонируя свои углеводные фрагменты на поверхности клеток участвуют в межклеточном взаимодействии и процессах узнавания.

Для изучения роли гликоконъюгатов в протекании вышеперечисленных и многих других биохимических процессов, а также тонких механизмов этих реакций широко используются синтетические аналоги природных гликоконъюгатов, которые в последнее время принято называть неогликоконъюгатами. Неогликоконъюгаты являются низкомолекулярными соединениями и находят применение в различных биохимических исследованиях, связанных с выделением и изучением специфичности лектинов, получением антител к углеводным детерминантам заданной структуры, сорбентов для аффинной хроматографии. В свете интенсивного развития таких исследований разработка новых удобных методов синтеза неогликоконъюгатов представляет несомненный интерес.

Существуют различные методы синтеза неогликоконъюгатов, но наиболее эффективными являются методы с использованием классических приемов химии углеводов, где отдельно синтезируются углеводные компоненты, имеющие в своем составе активные функциональные группировки, посредством которых впоследствии идет присоединение углевода к агликону.

Целью представленной работы является синтез активных производных D-галактозы и D-лактозы и их использование для получения различных типов биологически активных неогликоконъюгатов, включая модифицированные гликолипиды и гликолипопептиды.

В последнее время внимание исследователей привлекают оксиаминовые производные углеводов, которые отличаются высокой реакционной способностью и, кроме того, уникальная O-N гликозидная связь нашла применение для создания новейших противоопухолевых препаратов [1].

По сравнению с описанной в литературе схемой получения аналогичных гликозидов через бромпроизводные углеводов, нами предложен и реализован новый подход, который заключается в проведении реакции полных ацетатов сахара (1) с N-гидроксисукцинимидом в условиях кислотного катализа с последующей обработкой соответствующего N-оксисукцинимидного эфира углевода (2) гидразингидратом (схема 1). Данная схема позволяет значительно упростить синтез активных оксиаминов, что является перспективным для их дальнейшего использования в синтезах неогликоконъюгатов.

Целевой и промежуточные продукты охарактеризованы данными ИК- и ¹H-ЯМР-спектроскопии и элементного анализа.

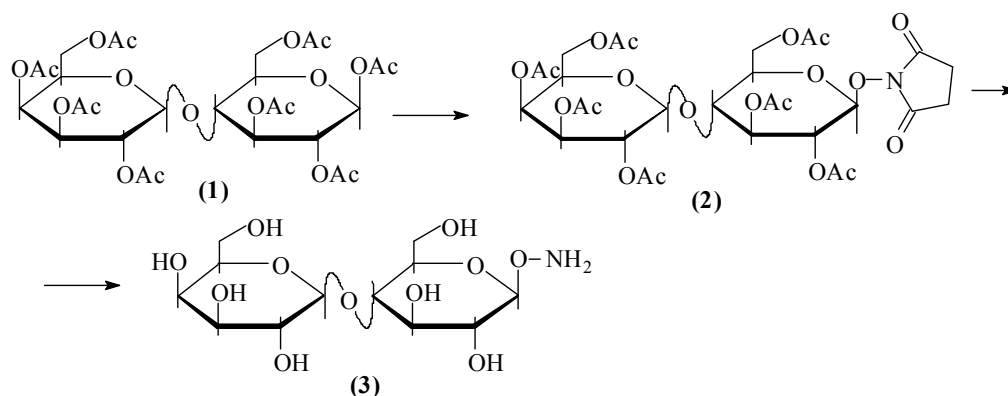


Схема 1.

Оксиаминовое производное *D*-лактозы (3) использовано для создания болаамфифила (6), который потенциально может служить в качестве ингибитора

рецепторов патогенной адгезии клеток. Реакцию проводили с дихлорангидридом себаценовой кислоты в диметилформамиде в присутствии пиридина (схема 2).

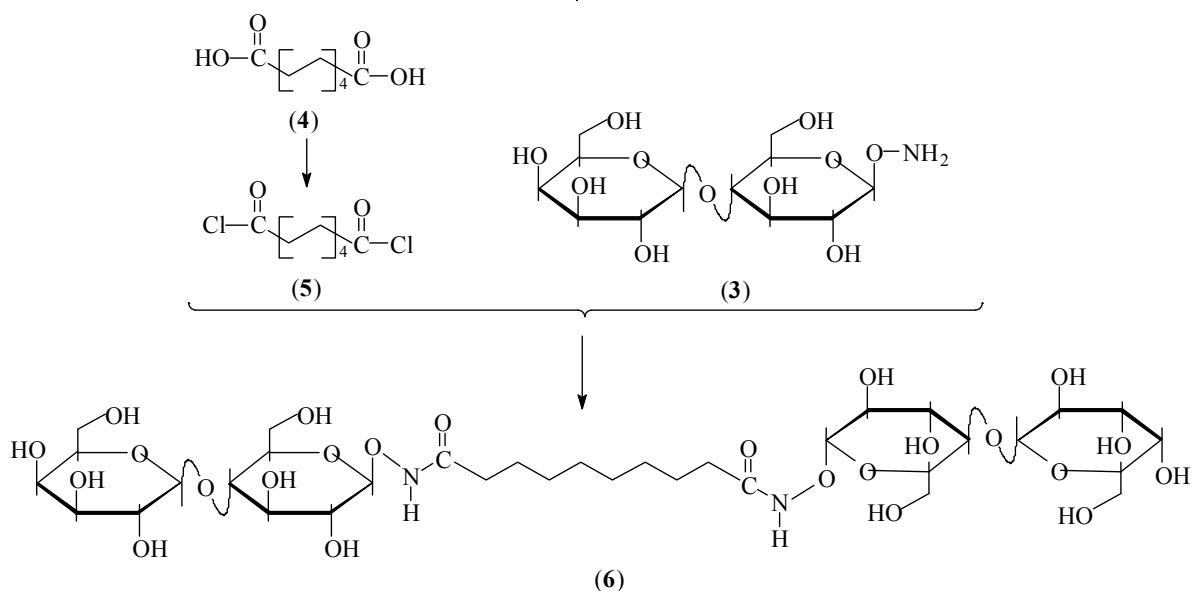


Схема 2.

В ¹H-ЯМР-спектре синтезированного образца присутствовали сигналы протонов алифатической цепи и протонов углеводного кольца *D*-лактозы. В масс-спектре зарегистрирован сигнал молекулярного иона.

Для получения катионного димерного амфифила (10) с линкером углеводной природы по схеме 3 нами использовалось диiodпроизводное лактозы (8), при синтезе которого отработаны различные варианты реакции.

Наилучшие результаты (выход 76%, время реакции 6 ч) наблюдались при комнатной температуре и соотношении исходных реагентов *D*-лактоза-iod-трифенилфосфин, 1:2,5:5.

Структура соединения (10) подтверждалась данными ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии.

С целью получения димерного поверхностно-активного вещества (14) согласно представленной схеме 4, использовали третичный диамин (13) и 2 эквивалента иодпроизводного галактозы (12). Реакция протекала при нагревании до 125⁰С в среде диметилформамида. Структура конечного соединения (14) была подтверждена с помощью данных ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии. В ИК-спектре соединения присутствовали характеристические полосы, соответствующие гидроксильным группам (3400-3300 см⁻¹), алифатическим цепям (2830, 1460, 1380 см⁻¹ C-H), углеводному скелету (C-O, 1160-1040 см⁻¹, 4 полосы) и соли третичного амина (2580 см⁻¹). В масс-спектре присутствовал пик молекулярного иона соединения (14).

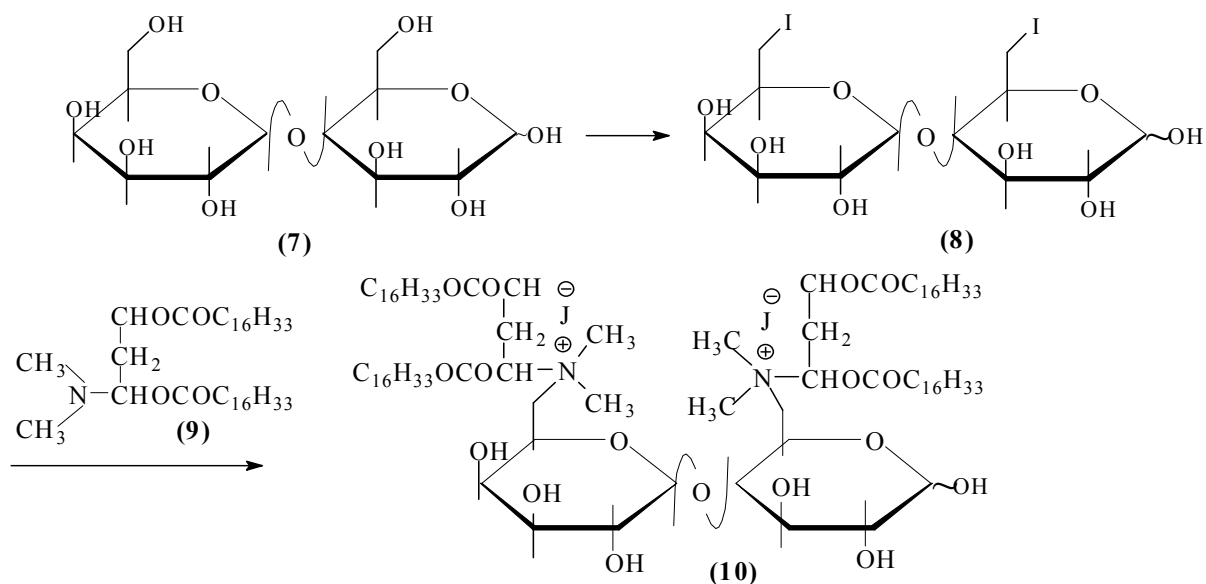


Схема 3.

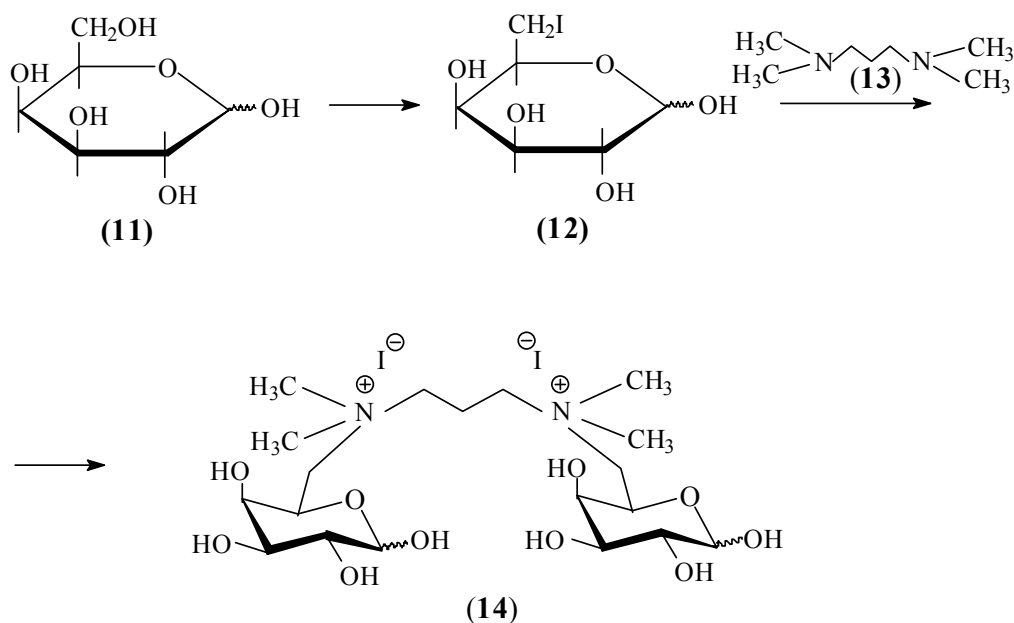


Схема 4.

Интерес к синтезу подобных соединений связан с тем, что димерные амфифилы проявляют высокую трансфекционную активность, в несколько раз превышающую активность мономеров, имеют низкие значения критической концентрации мицеллообразования, практически не обладают цитотоксичностью, могут применяться в качестве моделей биологических мембран, служить катализаторами фазового переноса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ^1H -ЯМР снимали в дейтерохлороформе на импульсном ЯМР-спектрометре «Bruker WM-200» (ФРГ) с

рабочей частотой 200 МГц. Внутренний стандарт - гексаметилдисилоксан. ИК-спектры снимали в вазелиновом масле на спектрофотометре «Shimadzu IR-435» (Япония). Электронные спектры получены на спектрофотометре Jasco-UV 7800. Масс-спектры получены на времяпролетном масс-спектрометре VISION 2000 методом MALDI с использованием в качестве матрицы 2,4-дигидроксibenзойной кислоты. Температуру плавления определяли на приборе «Voetius» (ФРГ).

Тонкослойная хроматография проводилась на пластинках Silufol (Чехословакия) в системах:

петролейный эфир – этилацетат, 6:1 (А);
 хлороформ-метанол, 1:2 (Б);
 хлороформ-метанол, 1:3 (В);
 хлороформ-метанол, 9:1 (Г);
 толуол-ацетонитрил, 3:1 (Д);
 хлороформ-метанол, 4:1 (Е),
 хлороформ-метанол-гидрат аммиака, 3:2:0.3 (Ж).

Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L40/100μ (Чехия), препаративную хроматографию проводили на пластинах с силикагелем L5/40μ (Чехия) и обращено-фазовым силикагелем «Merck» RP-18 F₂₅₄ SV.

Обнаружение пятен веществ при ТСХ осуществляли нагревом над пламенем спиртовки. Вещества, содержащие свободные аминогруппы проявляли раствором нингидрина. Вещества с *N*-гидроксисукцинимидными группами, проявляли специфическим проявителем на *N*-гидроксисукцинимиды [2]. Производные третичных и четвертичных аминов обнаруживали с помощью реактива Драгендорфа (раствора 1.7 г Bi(NO₃)₃·5H₂O в 100 мл 20% уксусной кислоты и 40 г KI в 100 мл H₂O) [2].

Получение О-(2,3,6,2',3',4',6'-гепта-О-ацетил-β-*D*-лактозил)-*N*-оксисукцинимид (2).

К раствору 5 г (7.4 ммоль) 1,2,3,6,2',3',4',6'-окта-О-ацетил-β-*D*-лактопиранозид (1) в 22 мл безводного хлористого метилена прибавляли 1.0 мл (8.2 ммоль) эфиратного комплекса трехфтористого бора. Через 15 мин к реакционной смеси прибавляли 0.9 г (8.2 ммоль) *N*-гидроксисукцинимид и выдерживали 1 ч при 20°C. Контроль за ходом реакции осуществляли по данным ТСХ в системе (А). Затем реакционную массу нейтрализовали 25%-ым раствором аммиака до pH 7. Нейтрализацию проводили в бане со льдом. Раствор промывали 5x100 мл воды, органический слой сушили, растворитель удаляли в вакууме. Остаток растирали под слоем смеси растворителей петролейный эфир-этилацетат, 1:1, осадок отфильтровывали, промывали петролейным эфиром и перекристаллизовывали из этилового спирта.

Образовавшееся после обработки реакционной массы масло хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя продукт реакции системой растворителей петролейный эфир - этилацетат, 2:3. Выход 2.33 г (43%), R_f 0.42 (А), т.пл. 89-91°C (из этилового спирта), [α]_D²³ (с 1.0, CHCl₃).

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 2.09, 2.06, 2.04, 2.02, 2.00, 1.99, 1.90 (7с, 21H, COCH₃), 2.67 (с, 4H, CH₂CH₂), 3.70 (ддд, 1H, H-5), 3.84 (ддд, 1H, H-5'), 4.01-4.13 (м, 4H, H-6, H-6'), 4.37 (дд, 1H, H-4), 4.50 (д, 1H, H-1', J_{1,2} 7.9 Гц), 4.92 (дд, 1H, H-3'), 5.05-5.07 (м, 2H, H-2, H-2'), 5.09 (д, 1H, H-1, J_{1,2} 6.3 Гц), 5.14 (дд, 1H, H-3), 5.27 (дд, 1H, H-4').

Вычислено %: С 49.12; Н 5.36; N 1.91. C₃₀H₃₉NO₂₀. Найдено %: С 48.97; Н 5.43; N 2.09.

Получение 1-О-амино-β-*D*-лактозида (3).

К раствору 200 мг (0.273 ммоль) О-(2,3,6,2',3',4',6'-гепта-О-ацетил-β-*D*-лактозил)-*N*-оксисукцинимид (2) в 35 мл этанола прибавляли 13.3 мл (1.911 ммоль) гидразингидрата. Смесь оставляли при комнатной температуре на 24 ч. Контроль за ходом реакции осуществляли по данным ТСХ в системах (А) и (Б). По окончании реакции избыток гидразингидрата и растворитель удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на пластине в системе хлороформ-метанол, 1:2.

Продукт перекристаллизовывали из этилового спирта. Выход 1-О-амино-β-*D*-лактозида (3) 0.026 г (27%), R_f 0.20 (Б), т.пл. 138-140°C (из этанола).

¹H-ЯМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 3.41 (дд, 1H, H-2), 3.53-3.69 (м, 3H, H-2', H-3, H-3'), 3.76-3.81 (м, 1H, H-6, H-6'), 3.88 (д, 1H, H-4'), 4.07-4.18 (м, 2H, H-5, H-5'), 4.24 (м, 1H, H-4), 4.34 (д, 1H, H-1, J_{1,2} 8.0 Гц), 4.92 (д, 1H, H-1', J_{1,2} 7.5 Гц).

ИК-спектр (вазелиновое масло, $\nu_{\max}$, см^{-1}): 3340(O-H), 3320(N-H), 2920(C-H), 1638(N-H), 1435,1356(C-H), 1212(C-O), 1114-1035(C-O, 4 полосы, углеводный скелет).

Получение дихлорангидрида себаценовой кислоты (5).

Растворяли 200 мг (0.99 ммоль) себаценовой кислоты (4) в 0.7 мл (9.6 ммоль) тионилхлорида. Оставляли реакционную смесь при комнатной температуре на 7 суток. Затем удаляли избыток тионилхлорида в вакууме.

Получали 230 мг (97 %) целевого соединения (5), которое без дополнительной обработки использовали на следующей стадии.

Получение N,N' -бис(1- β -D-лактозид-1-ил)алкан-1,10-дикарбоксамида (6).

К раствору 100 мг (0.51 ммоль) 1-O-амино- β -D-лактозида (3) в 4 мл диметилформамида прибавляли 61.3 мг (0.26 ммоль) соединения (5) и 10 мкл пиридина. Реакционную смесь оставляли при комнатной температуре на 6 ч. Контроль за ходом реакции осуществляли по данным ТСХ в системе (Б). Затем растворитель удаляли в вакууме, а образовавшийся остаток хроматографировали на колонке, элюируя целевой продукт системой растворителей хлороформ-метанол, 2:1.

Получали 0.154 г (65%) соединения (6), R_f 0.64 (В).

Вычислено %: С 46.38; Н 6.82; N 3.18. $\text{C}_{34}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_{24}$. Найдено %: С 46.31; Н 6.78; N 3.16.

Масс-спектр, m/z : 880 (M^+).

Получение 6,6'-дииодо-6,6'-дидезокси- β -D-лактозы (10)

В круглодонную колбу помещали 87 г (1.42 ммоль) β -D-лактозы (7) и растворяли в 10 мл ДМФА в атмосфере аргона. По мере растворения углевода, добавляли 1.867 г (7.12 ммоль) трифенилфосфина и 0.904 г (3.56 ммоль) иода. Реакцию проводили при перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре, за её ходом следили по данным ТСХ в системе (Г). Далее смесь выпаривали приблизительно до $\frac{1}{3}$ начального объёма и приливали 18 мл метанола, pH раствора доводили до 8, добавляя метилат натрия, и перемешивали на магнитной мешалке в течение 1.5 часа. Смесь нейтрализовали ионообменной смолой КУ-2 до pH 7. Смолу отфильтровывали и раствор упаривали. Остаток обрабатывали водой и оставшийся трифенилфосфоксид отфильтровывали. Раствор экстрагировали хлороформом и водный слой выпаривали до получения кристаллов. Целевой продукт получали перекристаллизацией из ацетонитрила.

Получали 0.462 г (76%) 6,6'-дииодо-6,6'-дидезокси- β -D-лактозы (8), R_f 0.5(В), т.пл. 250°C (разложение). Проба Бельштейна положительная.

ИК-спектр (в вазелиновом масле, ν , см^{-1}): 3375 (ОН), 1160-1040 (4 полосы, углеводный скелет).

Получение 6,6'-дидезокси-6,6'-ди(N,N' -диметил-дигексадецил-L-глутаминилиодида) - β -D-лактозы (10).

К раствору 0.050г (0.089 ммоль) соединения (8) в 3 мл диметилформамида прибавляли 0.111 г (0.178 ммоль) соединения (9). Реакционную массу нагревали при 120°C в течение двух недель. За ходом реакции наблюдали по данным ТСХ (система (Д)). По окончании реакции к реакционной массе приливали 10 мл диэтилового эфира и охлаждали. Продукт выпадал в виде масла, эфир декантировали и осадок сушили в вакууме.

Получали 0.078 г (15%) 6,6'- N,N' -диметил- β -D-лактозил дигексадецил-L-глутаминилиодида (10).

ИК-спектр (вазелиновое масло $\nu_{\max}$, см^{-1}): 3375 (ОН), 2900 (CH_3), 2831 (CH_2), 1760($\text{C}=\text{O}$ эфир), 1461.9(CH_2), 1364(CH_3), 1155(N-C),1090(C-O эфир), 1020(C-O эфир), 1160-1040 (4 полосы, углеводный скелет).

Масс-спектр, m/z : 1554 (M^+).

Получение 6-дезоксигалактозы (12).

К раствору 0.5 г (2.78 ммоль) D-галактозы (11) в 12.5 мл безводного диметилформамида прибавили 1.82 г (6.95 ммоль) трифенилфосфина и 1.41 г (5.56 ммоль) кристаллического иода. Выдерживали реакционную массу при 80°C в течение 2 ч. Контроль за ходом реакции осуществляли с помощью ТСХ в системе (Е). Удаляли растворитель в вакууме до 1/3 первоначального объёма и добавляли 19 мл метанола. Прибавляли метилат натрия до pH 8 и перемешивали на магнитной мешалке в течение 1.5 ч. Обессоливали раствор ионообменной смолой КУ-2, отфильтровывали и упаривали до сухого остатка. Приливали 50 мл воды и отфильтровывали выпавший в осадок трифенилфосфоксид. Растворитель удаляли, остаток сушили в вакууме и полученное масло светло-жёлтого цвета растирали под слоем эфира до образования светло-жёлтого кристаллического осадка.

Получали 0.480 г (61.8%) 6-дезоксигалактозы (12), R_f 0.42 (Е), т.пл. 125-130°C. Проба Бельштейна положительная.

ИК-спектр: (в вазелиновом масле, ν , см⁻¹) 3300(О-Н), 2830(CH₂), 1460(CH₂), 1380(CH₃), 1457(CH₂-галоген), 1140-1030(C-О, 4 полосы, углеводный скелет).

Вычислено %: С 25.85; Н 4.82. С₆H₁₁O₅I. Найдено %: С 26.63; Н 5.60.

Получение 1,3-бис-(N-(6-Д-галактопиранозил)-N,N-диметиламмоний)пропандиодида (14).

К раствору 0.1 г (0.346 ммоль) 6-дезоксигалактозы (12) в 2.5 мл безводного диметилформамида приливали 0.02 г (0.156 ммоль) N,N,N',N'-тетраметил-1,3-пропандиамина (13) в 2 мл диметилформамида и реакционную смесь нагревали при 125°C в течение трех недель. За прохождением реакции наблюдали по данным ТСХ в системе (Ж). Растворитель удаляли, остаток промывали хлороформом и сушили в вакууме. Полученное масло светло-жёлтого цвета растирали под слоем смеси петролейный эфир-эфир, 2:1 до образования желтоватого осадка.

Получали 0.053 г (48%) 1,3-бис-(N-(6-Д-галактопиранозил)-N,N-диметиламмоний)пропандиодида (14), R_f 0.1 (Ж).

ИК-спектр: (в вазелиновом масле, ν , см⁻¹) 3300(О-Н), 2580(соль третичного амина), 2900(CH₂), 1435(CH₂), 1340(CH₃), 1140-1030(4 полосы, углеводный скелет).

Масс-спектр: 449.385 [M⁺-Me].

ЛИТЕРАТУРА:

1. S.Cao, D.Tropper, R.Roy. Stereoselective phase transfer catalyzed syntheses of glycosyloxysuccinimides and their transformations into glycoprobes. //Tetrahedron. – 2000. – Vol.51. – P. 6679-6686.
2. А.А.Лурье. Хроматографические материалы. – М.: Химия, 1978. – С. 122.