

СИНТЕЗ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ОКТАВАЛЕНТНОГО БОЛААМФИФИЛА С ТЕРМИНАЛЬНЫМИ ОСТАТКАМИ D-МАННОЗЫ

В.Б. Гостенин, студент, И.С. Щелик[@], аспирант, Ю.Л. Себякин, профессор

*Кафедра химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского
МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия*

[@] Автор для переписки, e-mail: inga.shelik@yandex.ru

Предложена схема и осуществлен синтез октавалентного болаамфифила с терминальными остатками D-маннозы. Усовершенствована методика лабораторного получения данного соединения при помощи оптимизации ключевых стадий синтеза и очистки целевого продукта. Терминальные остатки D-маннозы позволят связаться с маннозоспецифичными лектинами на поверхности бактерий, например, E. coli, вызывающей заболевания желудочно-кишечного тракта. Полученное соединение может быть использовано в качестве антиадгезионного агента для предотвращения развития инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: производные углеводов, болаамфифилы, антиадгезионная терапия.

SYNTHESIS AND OPTIMIZATION OF OCTAVALENT BOLAAMPHIPHILE PREPARATION WITH TERMINAL D-MANNOSE RESIDUES

V.B. Gostenin, I.S. Shchelik[@], Yu.L. Sebyakin

*M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies,
Moscow, 119571 Russia*

[@] Corresponding author e-mail: inga.shelik@yandex.ru

In this article a scheme was proposed, and the synthesis of octavalent bolaamphiphile with terminal D-mannose residues was carried out. The technique of the laboratory synthesis of this compound was improved using optimisation of the key step of the compound synthesis and purification of the final compound. All intermediate steps of the final compound synthesis were described in detail. The terminal D-mannose residues will allow binding with mannose-specific lectins, for example, on the surface of E. coli morbidising the gastrointestinal tract. The resulting compound can be used as a potential anti-adhesion agent to prevent the development of infectious diseases.

Keywords: carbohydrate derivatives, bolaamphiphile, antiadhesion therapy.

Введение

Углеводы, ориентированные на клеточное узнавание, играют ключевую роль в физиологических и патологических процессах, таких как образование межклеточных контактов, связывание поливалентных молекул, например, антител или токсинов, а также микроорганизмов (вирусов, бактерий) с поверхностью эукариотической клетки [1, 2]. Адгезия патогенных микроорганизмов на поверхности клетки хозяина является первоначальным шагом в колонизации и возникновении инфекции [3]. Бактериальные молекулы, участвующие в адгезии, называют адгезинами.

Наиболее хорошо изученной и обширной группой адгезинов являются белковые бактериальные лектины, которые распознают комплементарные олигосахариды на поверхности клетки хозяина. Структурно эти лектиновые адгезины имеют небольшой шарообразный домен углеводного распознавания, который представляет собой сравнительно небольшую выемку на поверхности белка [4]. Структурное разнообразие в пределах этой выемки определяет селективность каждого адгезина к его целевому или комплементарному олигосахаридному рецептору. Это приводит к способности бактерий различать разнородные олигосахаридные структуры на

поверхности клетки хозяина. Таким образом, общая специфичность бактерии для конкретной клетки будет зависеть от наличия концевых олигосахаридных рецепторов [5].

Для ингибирования подобных взаимодействий разрабатываются и используются различные подходы. Среди них синтез аналогов адгезинов, находящихся на поверхности бактерий; блокирование клеточных рецепторов при помощи пробиотиков; применение вакцин, основанных на адгезинах; использование антиадгезинов человека, таких как муцины [6]. Наиболее распространенным и успешным подходом является синтез аналогов рецепторов, среди которых широкое применение нашли синтетические гликоконъюгаты (неогликоконъюгаты) [1, 7, 8].

Известно, что сродство одновалентных углеводных лигандов к лектинам обычно очень слабое, оно может быть усилено мультивалентными взаимодействиями. Для этого в течение последнего времени стали применяться мультивалентные углеводные лиганды [8], в том числе болаамфифилы. Последние относятся к крупному семейству молекул с интересными химическими структурами. В своем составе они содержат две функциональные гидрофильные концевые группы, соединенные с помощью гидрофобной цепи. За последние два десятилетия были разработаны различные синтетические методы для получения функциональных болаамфифилов, которые имитируют их природные аналоги [9]. Уникальная структура болаамфифилов позволяет варьировать валентность концевых групп за счет изменения структуры разветвляющейся компоненты.

Целями данной работы являются синтез октавалентного болаамфифила с терминальными остатками D-маннозы, которые связываются с наиболее хорошо изученными фимбриями на поверхности бактерий – фимбриями I типа [8, 10, 11], а также оптимизация ключевых стадий синтеза для увеличения выхода конечного продукта.

Результаты и их обсуждение

Ранее в нашей лаборатории были синтезированы ди-, тетра- и гептавалентные неогликолипиды и показано, что увеличение количества терминальных углеводных остатков в структуре гликоконъюгата повышает его сродство к комплементарному лектину [12, 13].

Для получения целевого болаамфифила **7** нами была предложена следующая схема синтеза (рис. 1).

Получение 1-*N*-(сукцинил)-2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-β-D-глюкопиранозиды (**2**) проводили действием *N*-гидроксисукцинимиды на полный ацетат глюкозы (**1**), в качестве кислотного катализатора использовали эфират трехфтористого бора. Продукт очищали

при помощи колоночной хроматографии. Выход продукта реакции составил 30%.

Для получения соединения **3** *N*-гидроксисукцинимидный эфир **2** обрабатывали 1,7-диаминогептаном при небольшом нагревании. Продукт реакции выделяли с помощью колоночной хроматографии. Структуру полученного соединения подтверждали данными ИК-, ¹H-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии.

После дезацетилирования болаамфифила **3** в присутствии метилата натрия в метаноле получали соединение **4**, которое затем обрабатывали пропаргилбромидом в присутствии гидрида натрия для получения разветвляющейся компоненты **5**. Очистку конечного соединения **5** проводили с помощью колоночной хроматографии в системе толуол–этилацетат, 5:1. Выход продукта составил 64%. Структура полученного соединения была подтверждена с помощью ИК- и ¹H-ЯМР-спектроскопии.

В ¹H-ЯМР-спектре соединения **5** наблюдались характерные сигналы протонов пропинильного заместителя в виде триплета (δ 2.46–2.49 м.д. C≡CH) и дублета (δ 4.32–4.39 м.д. CH₂C≡CH). В ИК-спектре наблюдали характерную полосу поглощения тройных связей (2144 см⁻¹, C≡C), а также полосы поглощения, характерные для углеводного скелета (1202–1076 см⁻¹, C–O, 4 полосы).

Суммарный выход соединения **5** составил:

$$\eta_{\text{сумм.}} = \eta_2 \cdot \eta_3 \cdot \eta_4 \cdot \eta_5 = 0.30 \cdot 0.38 \cdot 0.86 \cdot 0.64 = 0.06; \eta_{\text{сумм.}} = 6\%$$

Для повышения суммарного выхода была проведена оптимизация ключевых стадий получения разветвляющейся компоненты.

Так, в целях оптимизации стадии получения соединения **2** реакцию проводили в разных растворителях: ацетонитриле, этилацетате, хлороформе и дихлорметане. В каждом растворителе варьировались такие параметры процесса как время протекания реакции и температура (рис. 2). Каждая реакция повторялась трижды.

Оптимальными условиями реакции для получения соединения **2** оказались следующие: использование в качестве растворителя этилацетата, температура 40°C, время реакции 4 ч. Выход соединения **2** в этих условиях составил 60%.

Также была проведена оптимизация стадии получения *N,N'*-бис(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-1-*O-N*-сукцинил-β-D-глюкопиранозил)диаминогептана (**3**). В качестве растворителей первоначально были выбраны ацетонитрил, этилацетат и хлороформ. Выходы соединения **3** в среде ацетонитрила и этилацетата оказались низкими, поэтому дальнейшая оптимизация проводилась в хлороформе также при варьировании двух параметров: температуры и времени протекания реакции (рис. 3). Наибольший выход (78%) был получен при проведении реакции в течение 24 ч при 50°C.

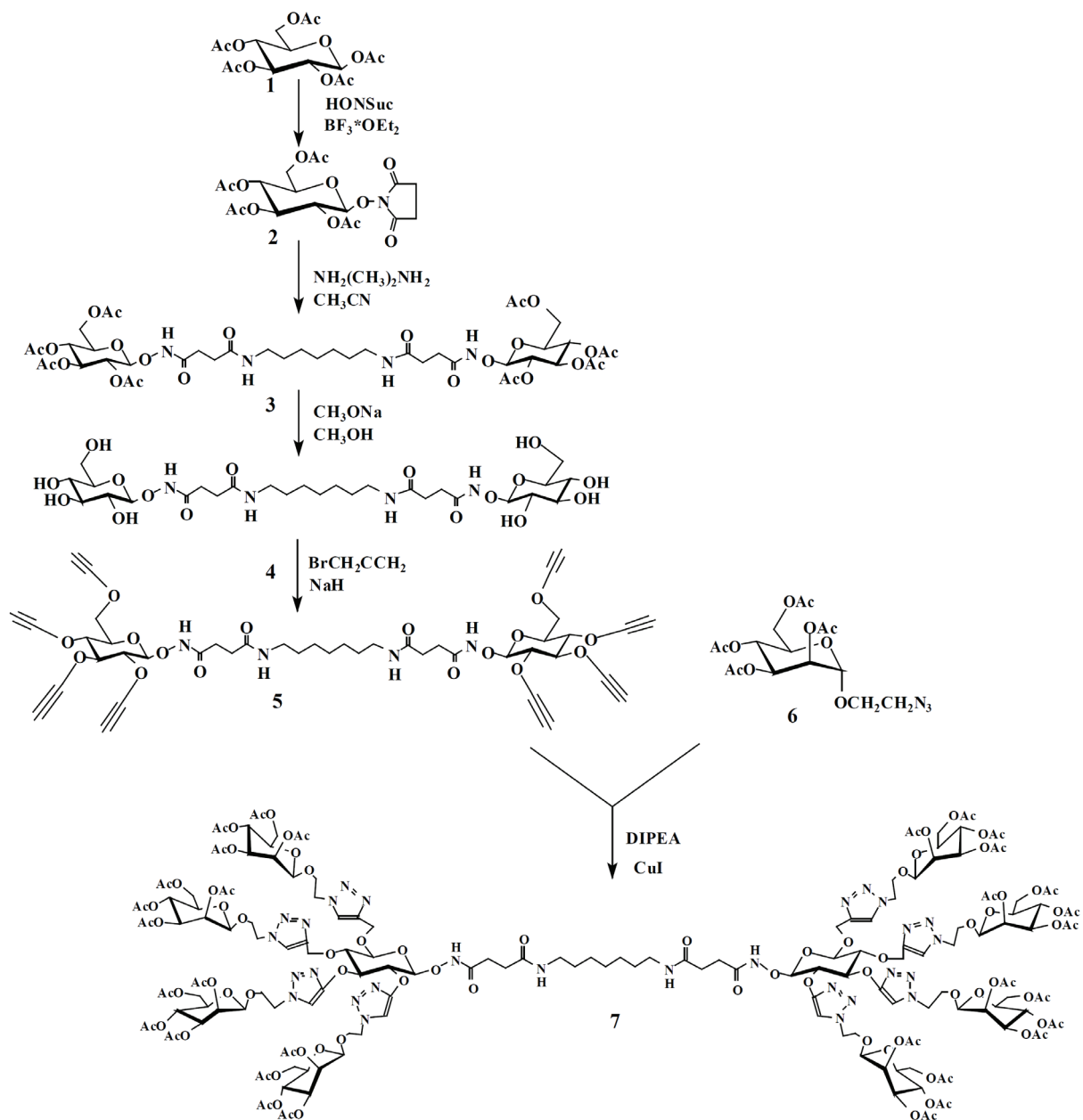


Рис. 1. Схема синтеза октавалентного болаамфила.

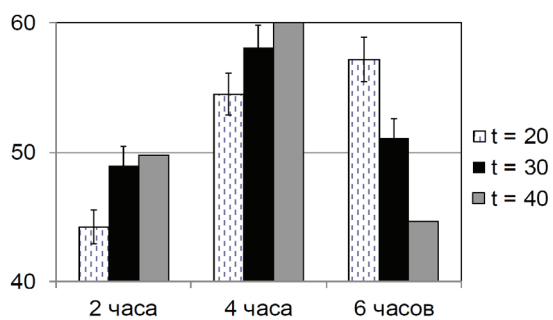


Рис. 2. Выход соединения 2 при варьировании температуры и времени протекания реакции в среде этилацетата.

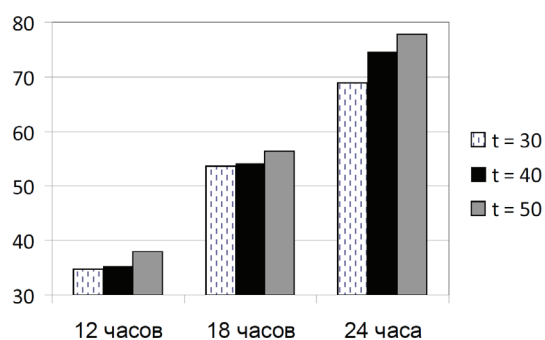


Рис. 3. Выход соединения 3 при варьировании температуры и времени протекания реакции в среде хлороформа.

Таким образом, в результате оптимизации удалось увеличить выход стадий получения соединений **2** и **3** в 2 раза – соответственно с 30 до 60% и с 38 до 78%.

Суммарный выход соединения **5** после оптимизации ключевых стадий составил:

$$\eta_{\text{сумм.}} = \eta_2 \cdot \eta_3 \cdot \eta_4 \cdot \eta_5 = 0.60 \cdot 0.78 \cdot 0.86 \cdot 0.64 = 0.26; \eta_{\text{сумм.}} = 26\%$$

То есть, суммарный выход увеличился более чем в 4 раза.

Конъюгацию компонентов **5** и **6** осуществляли с помощью реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения с получением конечного продукта **7**. Реакцию проводили в присутствии катализаторов CuI и DIPEA. Для оптимизации процесса выделения целевого продукта из реакционной смеси применяли диализ взамен ранее использовавшейся препаративной хроматографии.

Структура полученного болаамфифила подтверждалась при помощи ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии. В масс-спектре MALDI присутствовал пик молекулярного иона m/z 4975.235 ($M^{+} + 28Na^{+}$), пики полупродуктов не наблюдались. На ИК-спектре исчезли сигналы, соответствующие колебаниям тройных связей (2133 см^{-1} , $C \equiv C$) и связей азидной группы (2099 см^{-1} , $N=N$) соединений **5** и **6**, а также появились сигналы, соответствующие колебаниям связей в триазольном кольце (1396 см^{-1} ($N=N$) и 1238 см^{-1} ($C-N$)) целевого соединения.

Выводы

Таким образом, предложена схема и осуществлен синтез октавалентного болаамфифила с терминальными остатками D-маннозы **7**. Усовершенствована методика лабораторного получения данного соединения путем оптимизации ключевых стадий синтеза разветвляющейся компоненты **5** и очистки конечного соединения. В ходе оптимизации удалось увеличить суммарный выход соединения **5** в 4 раза и повысить выход соединения **7** за счет использования диализа в процессе очистки.

Экспериментальная часть

2,3,4,6-Тетра-О-ацетил-1-О-(2-азидоэтил)- α -D-маннопиранозид (6) получали по методике [14].

Спектры ^1H -ЯМР снимали в дейтерохлороформе на импульсном ЯМР-спектрометре «BrukerWM-400» (Германия) с рабочей частотой 400 МГц. Внутренний стандарт – гексаметилдисилоксан. ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре модель EQUINOX 55, фирма «Bruker» (Германия). Масс-спектры получены на времяпролетном масс-спектрометре VISION 2000 методом MALDI с использованием в качестве матрицы дигидроксibenзола (ДНВ).

Тонкослойную хроматографию проводили на

пластинках Сорбфил (Краснодар) в системах растворителей: (А) толуол–ацетонитрил, 2:1; (Б) ацетонитрил–метанол, 10:1; (В) гексан–этилацетат, 1:1. Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле Acros 0.060–0.200 мм, 60 А (Бельгия), высота слоя сорбента 220 мм, диаметр колонки 20 мм.

Обнаружение пятен веществ по ТСХ осуществляли в парах йода или нагреванием над пламенем спиртовки. Вещества, содержащие кратные углерод-углеродные связи, обнаруживали раствором перманганата калия. Вещества, содержащие свободные аминогруппы, обнаруживали 5%-ным раствором нингидрина с последующим нагреванием до 50–80°C.

1-(N-Сукцинил)-2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-глюкопиранозид (2). К раствору 2.00 г (5.13 ммоль) 1,2,3,4,6-пента-О-ацетил- β -D-глюкопиранозид (**1**) в 22 мл безводного этилацетата прибавляли 0.451 мл (5.64 ммоль) эфиратного комплекса трехфтористого бора. Через 15 мин к реакционной смеси прибавляли 1.18 г (10.26 ммоль) N-гидроксисукцинимид и выдерживали 4 ч при температуре 40°C. Затем реакционную массу экстрагировали 25%-ным раствором аммиака. Раствор промывали водой (5×100 мл) до pH 7, растворитель удаляли в вакууме. Продукт очищали при помощи колоночной хроматографии в системе толуол–ацетонитрил, 5:1. Получали 1.03 г (60%) соединения **2** в виде белых кристаллов, R_f 0.45 (А). ИК-спектр (ν_{max} , см^{-1}): 2847 (C–H), 1759 (C=O), 1233 (C–O), 1158–1032 (C–O). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.94, 2.03, 2.05, 2.09 (4с, 12H, 4COCH₃), 2.73 (с, 4H, CH₂CH₂), 3.74 (ддд, 1H, H-5), 4.11–4.34 (ддд, 2H, H-6), 5.07 (д, 1H, H-1, $J_{1,2} = 7.8$ Гц), 5.15–5.28 (м, 3H, H-3, H-4, H-2).

N,N'-Бис(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-1-О-N-сукцинил- β -D-глюкопиранозил)диаминогептан (3). К раствору 0.2 г (0.44 ммоль) соединения **2** в 12 мл CHCl_3 добавляли 28 мг (0.22 ммоль) 1,7-диаминогептана. Смесь перемешивали 24 ч при температуре 50°C. Растворитель удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке, элюируя продукт реакции системой растворителей ацетонитрил–метанол, 15:1. Выход соединения **3**: 0.175 г (78%), R_f 0.8 (Б). ИК-спектр (ν_{max} , см^{-1}): 2919 (C–H), 1743 (C=O), 1644 (C=O), 1536 (N–H), 1391, 1363 (C–H), 1296 (C–O), 1213–1035 (C–O, 4 полосы, углеводный скелет). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.24–1.31 (м, 6H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH), 1.38–1.5 (м, 4H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH), 1.97–2.14 (4с, 24H, COCH₃), 2.32–2.59 (м, 8H, NHCOCH₂CH₂CO), 3.13–3.27 (м, 4H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH), 3.72–3.80 (м, 2H, H-2, H-2'), 4.19 (дд, 2H, H-3, H-3'), 4.27 (дд, 2H, H-4, H-4'), 4.81 (д, 2H, H-1, H-1', $J_{1,2} = 7.9$ Гц), 5.07–5.14 (м, 4H, H-6, H-6'), 5.22–5.28 (м, 2H, H-5, H-5'), 6.09–6.18 (м, 2H, NH). Масс-спектр, m/z : 1021.352 (M^{+}).

***N,N'*-Бис(1-*O*-*N*-сукцинил- β -D-глюкопиранозил)диаминогептан (4).** К раствору 0.175 г соединения **3** в 5 мл метанола при перемешивании при комнатной температуре прибавляли 0.1 мл свежеприготовленного 0.1 М раствора метилата натрия в метаноле до достижения pH 8. Через 2 ч раствор обрабатывали ионообменной смолой КУ-2 (H⁺-форма), смолу отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме. Получали 0.10 г (86%) соединения **4** в виде аморфного вещества, *R_f* 0.4 (В). ИК-спектр (ν_{\max} , см⁻¹): 3362 (O–H), 2925 (C–H), 1650 (C=O), 1558 (N–H), 1376 (C–H), 1231 (C–O), 1147–1019 (C–O).

***N,N'*-Бис(2,3,4,6-тетра-*O*-пропин-1-ил-1-*O*-*N*-сукцинил- β -D-глюкопиранозил)диаминогептан (5).** К 50 мг (0.077 ммоль) соединения **4** в безводном ДМФА прибавляли порциями гидрид натрия 37 мг (1.5 ммоль) при температуре 0°C. Через 10 мин добавляли 0.14 мл (1.5 ммоль) пропаргилбромида по каплям. Перемешивали на магнитной мешалке при 0°C в течение 12 ч. После окончания реакции растворитель удаляли в вакууме. Очистку проводили при помощи колоночной хроматографии в системе толуол–этилацетат, 5:1. Получали 52 мг (64%) соединения **5** в виде аморфного вещества, *R_f* 0.9 (А). ИК-спектр (ν_{\max} , см⁻¹): 3285 (\equiv C–H), 2144 (C \equiv C), 2938 (C–H), 1710 (C=O), 1556 (N–H), 1462 (CH₂), 1202–1076 (C–O, 4 полосы, углеводный скелет). ¹H-ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.22–1.29 (м, 6H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH), 1.37–1.48 (м, 4H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH), 2.34–2.61 (м, 8H, NHCOCH₂CH₂CO), 2.46–2.49 (т, 8H, C \equiv CH) 3.12–3.26 (м, 4H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH), 3.71–3.78 (м, 2H, H-2, H-2'), 4.18 (дд, 2H, H-3, H-3'), 4.25 (дд, 2H, H-4, H-4'), 4.32–4.39 м.д. CH₂C \equiv CH, 4.82 (д, 2H, H-1, H-1'), *J*_{1,2} = 7.9 Гц), 5.05–5.13 (м, 4H, H-6, H-6'), 5.24–5.27 (м, 2H, H-5, H-5'), 6.05–6.16 (м, 2H, NH).

Конъюгат 7. К раствору 0.10 г (0.10 ммоль) 2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-1-*O*-(2-азидоэтил)- α -D-маннопиранозида (**6**) в 2 мл хлороформа добавляли 10 мг (0.01 ммоль) симметричной разветвляющей компоненты **5**, добавляли каталитическое количество CuI, DIPEA и перемешивали при комнатной температуре в течение суток. Реакционную массу отфильтровывали от кристаллов CuI. Растворитель удаляли в вакууме.

Очистку проводили при помощи диализа в ДМФА. Получали 25 мг соединения **7** (58%) в виде аморфного вещества, *R_f* 0.1 (А). ИК-спектр (ν_{\max} , см⁻¹): 2936 (C–H), 1749 (C=O), 1672 (C=O), 1519 (N–H), 1455 (CH₂), 1396 (N=N), 1238 (C–N), 1164–1038 (C–O). Масс-спектр, *m/z*: 4975.235 (M⁺ + 28Na⁺).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-01557).

Список литературы / References:

1. Lee Y.C., Lee R.T. // *Acc. Chem. Res.* 1995. V. 28. P. 321–327.
2. Hasty D.L., Ofek I., Courtney H.S., Doyle R. // *J. Infect. Immun.* 1992. V. 60. P. 2147–2152.
3. Weis W.I. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997. V. 7. P. 624–630.
4. Weis W.I., Drickamer K. // *Annu. Rev. Biochem.* 1996. V. 65. P. 441–473.
5. Sharon N., Ofek I. *Microbial Lectins and Agglutinins* / Ed. by D. Mirelman. New York: John Wiley & Sons, 1986. P. 55–81.
6. Langermann S., Ballou W.R. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003. V. 539. P. 635–653.
7. *Bacterial Adhesion to Animal Cells and Tissues* / Eds. Ofek I., Hasty D.L., Doyle R.J. ASM Press, 2003.
8. Bolsheborodova A.K., Sebyakin Yu.L. // *Macroheterocycles.* 2012. V. 5 (3). P. 203–211.
9. Nurxat N., Hanying B., Kai Su // *Progress in Polymer Science.* 2013. V. 38. P. 302–343.
10. Hanski E., Horwitz P.A., Caparon M.G. // *Infect. Immun.* 1992. V. 60. P. 5119–5125.
11. Langermann S., Palaszynski S., Barnhart M., Auguste G., Pinkner J.S., Burlein J., Barren P., Koenig S., Leath S., Jones C.H., Hultgren S.J. // *Science.* 1997. V. 276. P. 607–611.
12. Quave C.L., Estevez-Carmona M., Compadre C.M., Hobby G., Hendrickson H., Beenken K.E., Smeltzer M.S. // *PLoS One* // 2012. V. 7 (1). e28737.
13. Kurochkina N.A., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. // *Russian J. Organic Chemistry.* 2014. V. 50 (10). P. 1496–1503.
14. Gur'eva L.Yu., Bol'sheborodova A.K., Sebyakin Yu.L. // *Russian J. Organic Chemistry.* 2012. V. 48 (8). P. 1047–1054.