

УДК 547.455.623'233.1:612.014.46

УГЛЕВОД-АМИНОКИСЛОТНЫЕ КОНЪЮГАТЫ: СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Курьянов В.О., Чупахина Т.А., Шановалова А.А., Дуваджиева Н.Н.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: vladimir@tnu.crimea.ua*

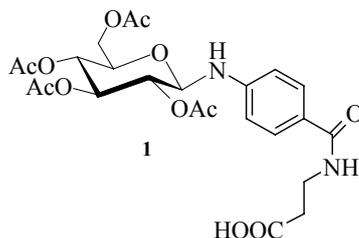
Описан синтез 4-*N*-β-D-глюкопиранозиламинобензойной кислоты и ее конъюгата с β-аланином. В серии поведенческих тестов на белых беспородных крысах, изучена психотропная активность производного β-аланина в сравнении с ранее полученными данными для *N*-(4-глюкозаминилоксибензоил)-β-аланина, отличающегося природой гликозидной связи.

Ключевые слова: гликозилирование, гликозид, β-аланин, седативное действие.

ВВЕДЕНИЕ

N-β-гликозидная связь широко представлена в большом числе природных соединений, прежде всего, в нуклеиновых кислотах и гликопротеинах, некоторых коферментах, а также синтетических аналогах нуклеотидов, так называемых антиметаболитах, которые применяются в терапии опухолевых заболеваний и вирусных инфекций [1]. Введение углеводных фрагментов в молекулы биологически активных соединений позволяет модифицировать направленность их физиологического действия, создавать препараты менее токсичные, с повышенной пролонгированностью действия [2], что делает перспективными дальнейшие исследования в области синтеза различных *N*-гликозидов и изучения спектра их биологического действия.

Ранее описан синтез конъюгатов *n*-карбоксибензилглюкозаминида-с различными аминокислотами и исследованы их биологические свойства [3-6]. В настоящем сообщении обсуждаются особенности синтеза *N*-[4-*N'*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-β-D-глюкопиранозил)]аминобензоил-β-аланина и результаты изучения его психотропной активности в серии поведенческих тестов.



МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Температуры плавления определяли на приборе ПТП, оптическое вращение при 20-25 °С – на поляриметре Polamat-A ($\lambda = 546$ нм).

ТСХ проводили на пластинках Sorbfil-АФВ-УФ («Сорбполимер», Россия). Зоны веществ обнаруживали УФ (254 нм), а также 5% раствором серной кислоты в этаноле с последующим нагреванием до 200-300 °С. Использовали систему растворителей: бутанол – уксусная кислота – вода, 3:1:1 (А), бензол – изопропиловый спирт, 10:1 (Б), бензол – изопропиловый спирт – уксусная кислота, 20:1:0,2 (В). Колоночную хроматографию (КХ) проводили на силикагеле Merck 230-400 меш.

¹Н ЯМР спектры получены на спектрометрах Varian VXR-300 (300 МГц), Varian Mercury-400 (400 МГц), внутренний стандарт – Me₄Si. Приведены химические сдвиги (ХС) (м.д., δ -шкала) и константы спин-спинового взаимодействия (КССВ, *J*, Гц).

***N*-[4-*N'*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -D-глюкопиранозил)]аминобензоил- β -аланин.**

Смесь из 1,8 г (10 ммоль) D-глюкозы с 1,47 г (10,1 ммоль) *n*-аминобензойной кислоты, 0,5 мл воды, 0,3 мл ледяной уксусной кислоты и 15 мл 96 %-го этилового спирта нагревали при частом встряхивании до полного растворения исходных продуктов (2 ч, ТСХ, система А) [7]. После окончания реакции смесь выдерживали при температуре кипения еще 1 час с активированным углем. Горячую смесь отфильтровали, фильтрат упаривали досуха при пониженном давлении. Получили 1,4 г (46%) 4-*N*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -D-глюкопиранозил)аминобензойной кислоты; т.пл. 115-119 °С, $[\alpha]_{546} +10,4^\circ$ (*c* 1,0; ДМСО).

Далее полученный *N*-гликозид растворяли в 5 мл пиридина, а затем вносили 5 мл уксусного ангидрида. По окончании реакции (контроль ТСХ, система А) реакционную смесь выливали в 150 мл ледяной воды и экстрагировали хлороформом (3×15 мл). Объединенный экстракт промывали водой (2×15 мл), отделяли, сушили безводным Na₂SO₄. Фильтровали, фильтрат упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток выделяли колоночной хроматографией, элюируя бензол – изопропиловый спирт, 100:1 → бензол – изопропиловый спирт, 50:1. Выход *N*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -D-глюкопиранозил)аминобензойной кислоты составил 1,06 г (50 %); т.пл. 61-65 °С, $[\alpha]_{546} -33,3^\circ$ (*c* 1,0; хлороформ). ¹Н ЯМР (DMSO-*d*₆): 1,93с, 1,94с, 1,96с, 2,00с (1H, 4OAc), 3,96дд (1H, H-6a, *J*_{gem} 10 Гц), 4,14м (2H, H-5, H-6b), 4,90дд (1H, H-2, *J*_{2,3} 9,6 Гц), 4,94дд (1H, H-1, *J*_{1,2} 9,2 Гц), 5,30дд (1H, H-4, *J*_{4,5} 9,6 Гц), 5,34дд (1H, H-3, *J*_{3,4} 9,2 Гц), 6,78д, 7,72д (4H, CH_{аром}), 7,17д (1H, NH, *J*_{NH,1} 9,2 Гц).

К раствору 0,5 г (0,94 ммоль) полученной кислоты в 14 мл безводного ацетонитрила последовательно прибавляли 0,215 г (1,87 ммоль) *N*-гидроксисукцинимид и 0,423 г (2,02 ммоль) *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида. Перемешивали в течение 3 ч до полной конверсии субстрата (ТСХ, система Б). Образовавшийся осадок дициклогексилмочевины отфильтровали, промыли на фильтре ацетонитрилом (2×15мл). Растворитель удаляли при пониженном давлении. Активированный эфир *N*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -D-глюкопиранозил)-аминобензойной кислоты растворяли в 14 мл диметилформамида и смешивали с водным раствором натриевой соли β -аланина (получена из 0,213 г (2,39 ммоль) аминокислоты и 0,399 г (4,75 ммоль) гидрокарбоната натрия) [8]. Реакционную

смесь интенсивно перемешивали до полной конверсии активированного эфира (ТСХ, система В). Растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток разбавляли 15 мл воды, подкисляли 1 н. раствором HCl до pH 3. Аминокислотный конъюгат экстрагировали хлороформом (3x15 мл), объединенный экстракт сушили безводным Na₂SO₄. Осушитель отделяли фильтрованием, фильтрат упаривали досуха на ротационном испарителе.

Выход *N*-[4-*N'*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-β-*D*-глюкопиранозил)]аминобензоил-β-аланин, выделенного колоночной хроматографией (бензол – изопропиловый спирт, 100:1 → бензол – изопропиловый спирт, 60:1), составил 0,21 г (37%); т.пл. 115-120 °С, [α]₅₄₆ -6,25° (с 1,0; хлороформ), ¹H ЯМР (DMSO-d₆): 1,93с, 1,94с, 1,96с, 2,00с (12H, 4OAc), 2,44м и 3,41м (4H, -CH₂-), 3,96дд, 4,14м (2H, H-_{6a,b}, J_{гем} 10,8 Гц), 4,14м (1H, H-5), 4,90дд (1H, H-2, J_{2,3} 9,6 Гц), 4,91дд (1H, H-1, J_{1,2} 9,2 Гц), 5,28дд (1H, H-4, J_{4,5} 10,0 Гц), 5,34дд (1H, H-3, J_{3,4} 9,6 Гц), 6,74д (2H, CH_{аром}), 7,64д (2H, CH_{аром}), 6,93д (1H, NH, J_{NH,1} 9,6 Гц), 8,19м (1H, -CONH-).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

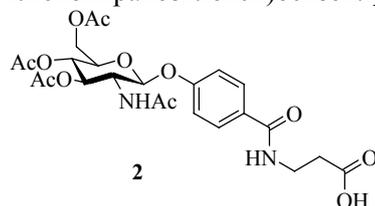
Ранее нами было показано, что метод «солевых защит» является удобным способом получения конъюгатов глицина, α- и β-аланина, ГАМК и других аминокислот, исходя из *o*- и *n*-карбокисфенилгликозидов и диацетонгалактуроновой кислоты [6, 9].

Синтез исходного соединения – 4-*N*-(β-*D*-глюкопиранозил)аминобензойной кислоты, а также сполна ацетилированного производного был осуществлен по стандартной методике [7]. Тот факт, что ацилирование 4-*N*-(β-*D*-глюкопиранозил)-аминобензойной кислоты прошло только по свободным гидроксильным группам, подтверждается наличием в спектре соединения синглетов протонов *O*-ацетильных групп в области 1,93 – 2,00 м.д и наличием дублета протона NH-группы с ХС 7,17 м.д. *O* β-конфигурации гликозидной связи свидетельствует величина константы спин-спинового взаимодействия дублета-дублетов аномерного протона – 9,2 Гц.

Конденсация активированного эфира 4-*N*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-β-*D*-глюкопиранозил)аминобензойной кислоты в смеси ацетонитрил-вода приводила к низким выходам целевого конъюгата, что, по-видимому, связано с низкой растворимостью активированного эфира кислоты. Поэтому, с целью повышения выхода конечного продукта, реакцию конденсации провели в диметилформамиде. Для этого, по окончании реакции, активированный эфир кислоты отделили фильтрованием от осадка дициклогексилмочевины и упарили растворитель при пониженном давлении. Остаток, содержащий активированный эфир, растворяли в диметилформамиде и смешивали с подготовленным водным раствором натриевой соли β-аланина. применение такого подхода позволило повысить степень конверсии исходной кислоты в целевой конъюгат до 37%. Строение полученного производного **1** доказано ПМР-спектроскопией. В частности, об образовании конъюгата β-аланина свидетельствует наличие в ПМР-спектре сигналов метиленовых протонов с ХС 2,44 м.д. и 3,41 м.д и триплета протона амидной

группы с ХС 8,19 м.д. В спектре также идентифицированы сигналы скелетных протонов и *O*-ацетильных защитных групп углеводного остатка.

Для исследования влияния типа гликозидной связи на биологическую активность в серии поведенческих тестов изучено действие *N*-[4-*N'*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-β-*D*-глюкопиранозил)]аминобензоил-β-аланина (**1**) в сравнении с *N*-[4-(2-ацетамидо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксид-β-*D*-глюкопиранозилокси)бензоил]-β-аланином (**2**).



Исследования проводились на белых беспородных крысах-самцах со средним уровнем двигательной активности. Соединения в виде натриевой соли растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривенно в дозе 12,5 мг/кг. Для выявления психотропных свойств использовались экспериментальные модели стресса – «открытое поле» (ОП), тест Порсолта, «подвешивание за хвост» (ПХ), «крестообразно-приподнятый лабиринт» (КПЛ). Результаты представлены на диаграммах в виде процентных величин от контроля.

В тесте Порсолта (рис. 1) введение вещества **2** приводит к достоверному увеличению латентного периода первого зависания (ЛП), времени активного плавания (АП) и числа актов освобождения от воды. Для соединения **1** наблюдалось значительное уменьшение латентного периода первого зависания, а также некоторое снижение количества актов освобождения от воды, в сравнении с гликозидом **2**.

В тесте ПХ (рис. 2) для обоих соединений уменьшается время иммобилизации животных, однако, соединение **2** проявляет вдвое большую активность. Это свидетельствует о более сильном антидепрессантном эффекте гликозида **2**.

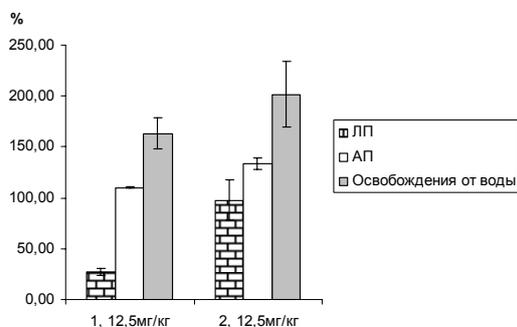


Рис. 1 Влияние гликозидов на поведенческие реакции крыс в тесте Порсолта.

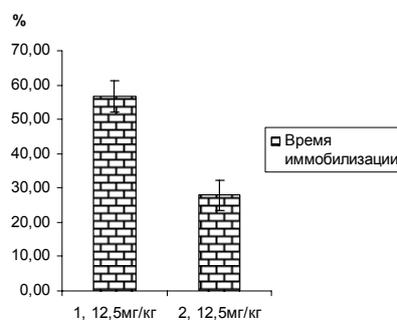


Рис. 2 Влияние гликозидов на реакцию крыс в тесте «подвешивание за хвост».

В тесте ОП (рис. 3) обнаружено, что при слабом стрессе действие соединений сопровождалось общим угнетением локомоции. Так, наблюдалось снижение уровня горизонтальной (ГДА) и вертикальной (ВДА) двигательной активности, а также исследовательской активности (ИА). Это свидетельствует о тормозном действии данных соединений на нервную систему, и позволяет предположить наличие у них седативного эффекта.

В тесте КПЛ (рис. 4) время (В откр.) и частота (Ч откр.) пребывания в открытых рукавах достоверно уменьшались, а время пребывания в закрытых рукавах (В закр.) – увеличивалось, что наряду со снижением исследовательской активности животных, уровня груминга, частоты заходов в закрытые рукава (Ч закр.) и пересечения центра, а также данными, полученными в тесте ОП, позволяет предположить наличие сильного седативного эффекта изучаемых соединений.

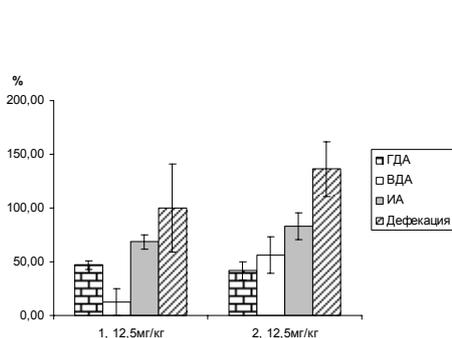


Рис. 3 Влияние гликозидов на поведенческие реакции крыс в тесте «открытое поле».

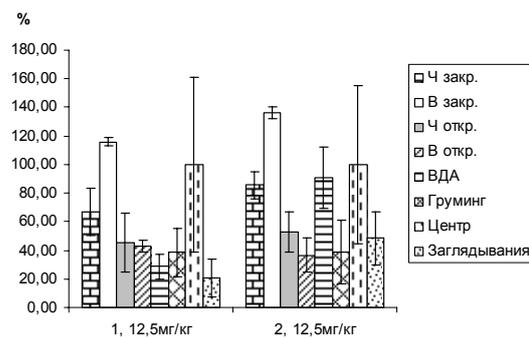


Рис. 4 Влияние гликозидов на поведенческие реакции крыс в тесте «крестообразно-приподнятый лабиринт».

ВЫВОД

В результате проведенного исследования подобраны условия синтеза аминокислотного конъюгата глюкопиранозиламинобензойной кислоты. В серии поведенческих тестов изучено действие *N*-[4-*N'*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-β-*D*-глюкопиранозил)]аминобензоил-β-аланина, показано, что он обладает антидепрессантным и седативным действием.

Список литературы

1. Preparation of *N*-acryloyl and *N*-(*N*-acryloyl)glycyl derivatives of 2-acetoamido-2-deoxy-β-*D*-glucopyranosylamine / J.-S. Kim, Y.K Pak., K.H. Chun [et al.] // Bull. Korean Chem. Soc. – 2001. – Vol. 22, № 7. – P. 4243
2. Кулаков И.В. Синтез *N*-аминогликозидов на основе алкалоида цитизина / И.В. Кулаков // Химия природных соединений. – 2008. – № 6. – С. 596–597.
3. Chupakhina T.A. A simple rout to carboxyphenyl- and methoxycarbonylphenyl glycosides of neutral and aminosugars / T.A. Chupakhina, V.O. Kuryanov, V.Ya. Chirva // The 1st International conference of the Moldavian chemical society. Chisinau (Moldova), October 6–8, 2003. – Chisinau, 2003. – P. 158.

4. Курьянов В.О. Простой способ синтеза карбоксифенилгликозидов N-ацетилглюкозамина и глюкозы / В.О. Курьянов, Т.А. Чупахина // Ученые записки Таврического национального университета. – 2005. – Т. 18 (58), № 2. – С. 120–124.
5. Патент 9082 України, МПК 7 C07H3/02, C07H5/06. Спосіб синтезу о- і п-карбоксифенілглікозидів N-ацетилглюкозаміну / Курьянов В.О., Чупахіна Т.О., Чирва В.Я.; Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського (UA). – № 20041210441; Заявл. 20.12.2004; Опубл. 15.09.2005. Бюл. № 9. – 3 с.
6. Катализ: способ получения 2- и 4-карбоксифенилгликозидов N-ацетилглюкозамина / В.О. Курьянов, Т.А. Чупахина, С.А. Котляр [и др.] // Межфазный Журн. орг. та фарм. хімії. – 2007. – Т.5, Вып. 4(20). – С.44–48.
7. Дорофеенко Ю.А. Практикум по химии углеводов: Учеб. пособие / Дорофеенко Ю.А., Корольченко Г.А., Богданова Г.В.; 2-е изд., под ред. Ю.Д.Жданова. – М.: Высшая школа, 1973. – 64 с.
8. Гершкович А.А. Химический синтез пептидов / А.А. Гершкович, В.К. Киберев – К.: Наукова думка, 1992. – С. 81–83.
9. Нейро- и психотропная активность N-уроноиламинокислот и N-уроноилдипептидов / М.Ю. Раваева, И.И. Коренюк, В.О. Курьянов [и др.] // Биоорган. химия. – 2008. – Т. 34, № 6. – С.734–738.

Кур'янов В.О. Вуглевод-амінокислотні кон'югати: синтез і біологічна активність / В.О. Кур'янов, Т.О. Чупахіна, Г.О. Шаповалова [та ін.] // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62). – № 2. – С. 238-243.

Описано синтез 4-N-β-D-глюкопіранозиламінобензойної кислоти і її кон'югата з β-аланином. В серії поведінкових тестів на білих безпородних щурах, вивчена психотропна активність похідного β-аланіну у порівнянні з раніше отриманими даними для N-(4-глюкозамінілоксибензоїл)-β-аланіну, що відрізняється природою глікозидного зв'язку.

Ключові слова: глікозилування, глікозид, β-аланін, седативна дія.

Kuryanov V.O. Carbohydrate amino acid conjugates. Synthesis and biological activity / V.O. Kuryanov, T.A. Chupakhina, A.A. Shapovalova [et al.] // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – V.23 (62). – № 2. – P. 238-243.

Synthesis of 4-N-β-D-glucopyranosylamonobenzoic acid and their β-alanine conjugate was described. Psychotropic activity of β-alanine derivative in the series of behavioral tests on the white outbred rats in comparison with N-(4-glucosaminylloxibenzoil)-β-alanine was investigated.

Keywords: glycosilation, glycoside, β-alanine, sedative action.

Поступила в редакцію 18.05.2010 г.