



УДК 577.182.9'13

© 1991 г.

А. С. Шашков, Д. В. Ишунский, Ю. В. Жданович*,
Г. В. Докшин*

СТРОЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АНТИБИОТИКА ВАРИАМИЦИНА

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва;

*Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков Минмедпрома СССР,
Москва

Рассмотрены результаты изучения противоопухолевого антибиотика вариамицина и его полного ацетата методами ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. Пересмотрено строение углеводных цепей в молекуле антибиотика. Показано, что в отличие от ранее описанного вариамицина представляет собой 2-[β -*D*-циммарозил-(1 \rightarrow 3)- β -*D*-оливозил-(1 \rightarrow 3)- β -*D*-оливозил]-6-[β -*D*-оливозил-(1 \rightarrow 3)- β -*D*-оливозил]-хромомицинон.

В 1971 г. Ю. В. Ждановичем и др. [1] был описан новый противоопухолевый антибиотик вариамицин (I), являющийся аналогом ауреоловой кислоты (митрамицина). От последнего соединения (I) отличается строением гликозидной цепи при С-2 агликона, концевой фрагмент которой представляет собой остаток 2,6-дидезоксисахара, названного вариозой [1].

На основании химического и спектрального изучения этому сахару было приписано строение 4-О-метил-2,6-дидезокси-*D*-рибо-альдогексозы, причем положение метоксила при С-4 следовало из того, что вариоза в обычных условиях не окислялась иодной кислотой [2]. Одновременно, однако, был отмечен аномально большой сдвиг сигнала протона Н-5 в слабое поле ($\sim 1,5$ м. д.) при сопоставлении ^1H -ЯМР-спектров метилвариоза (II) и его бензоата, что, по мнению авторов [2], могло быть связано с существованием гликозида (II) в виде двух конформеров с аксиальной и экваториальной ориентацией аномерного протона.

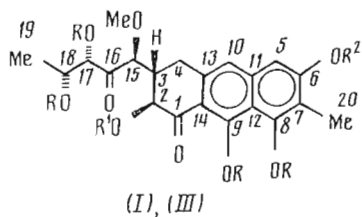
В 1975 г. Такаи и др. [3] осуществили синтез метилвариоза (II) и его бензоата. Спектры ^1H -ЯМР синтезированных соединений, однако, существенно отличались от спектров, описанных в работе [2], и поэтому авторы высказали предположение о фуранозной структуре метилвариоза.

Цель настоящей работы — ревизия ранее предложенной структуры вариозы, а также углеводной части молекулы антибиотика в целом с использованием ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии.

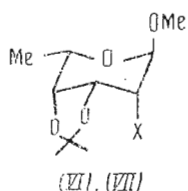
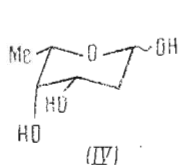
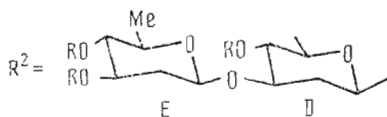
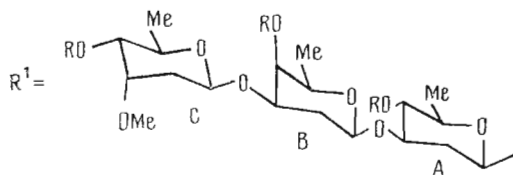
Спектры ^1H -ЯМР вариамицина (пиридин- d_5 , внутренний стандарт — гексаметилдисилазан, 20°C) были расшифрованы с использованием методики двойного гомоядерного резонанса $\text{H}_i - \{\text{H}_j\}$ в обычном и разностном варианте. Величины КССВ протонов углеводных остатков позволяют сделать однозначный вывод о пиранозном размере цикла этих остатков, β -конфигурации всех гликозидных связей и относительной ориентации заместителей в циклах (табл. 1).

Как следует из данных табл. 1, остатки сахаров А, Д и Е (см. формулу I) имеют конфигурацию 2,6-дидезокси- β -арабино-гексопиранозы (β -оливозы), а сахара С — 2,6-дидезокси- β -рибо-гексопиранозы. Сахар В является 2,6-дидезокси- β -ликто-гексопиранозой, конфигурация аномерного центра которой отличается от ранее установленной для этого остатка [4].

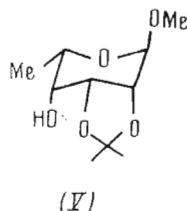
Типы замещения в остатках Д и Е были найдены при сравнении ^1H -ЯМР-спектров самого антибиотика в пиридине- d_5 и его перацетата (III) (полученного по методу [1]) в бензоле- d_6 .



(I) R=H
 (III) R=Ac



(VI) X=OH
 (VII) X=H



В спектре ацетата (III) в слабом поле (ниже 4,5 м. д.) оказались сигналы протонов Н-4 всех углеводных остатков и Н-3 остатка Е. Поскольку слабопольное смещение сигналов в спектре возникло вследствие ацетилирования ОН-групп, очевидно, что в углеводной части молекулы исходного антибиотика все гидроксильные группы при С-4 свободны и гликозилирование может происходить только по гидроксилам при С-3. Отсюда следует, что остатки сахаров С и Е являются концевыми и что метоксильная группа в остатке С расположена при С-3 (а не С-4, как было описано в сообщении [2]). Идентичный остатку С сахар был описан ранее [5] и назван циммарозой. Таким образом, вариоза (остаток С) представляет собой 3-О-метил-2,6-дидезокси-*D*-рибо-пиранозу.

Сделанные нами выводы подтверждены данными спектра ¹³С-ЯМР для антибиотика (I) (табл. 2), полученными при расшифровке его с помощью методики селективного гетероядерного резонанса ¹³С_{*i*} — {H_{*i*}}. Слабопольное положение сигналов С-3 остатков А — D свидетельствует о замещении в них по этому атому углерода.

Величины КССВ (*J*_{Н-1, С-1}) для сигналов аномерных углеродов, определенные из спектров, снятых в условиях сохранения спин-спинового взаимодействия (ССВ) углеродов с протонами, оказались в пределах 157—160 Гц. Это означает, что все гликозидные центры в углеводных остатках имеют β-конфигурацию.

Для определения последовательности соединения остатков сахаров в молекуле обычно анализируют ядерные эффекты Оверхаузера (ЯЭО), возникающие при последовательном предоблучении аномерных протонов [6].

Попытка применить этот прием оказалась успешной лишь для аномер-

Параметры спектра ¹H-ЯМР вариацицина (I) в C₃D₅N (δ, м. д., J, Гц)

Остаток	Протон	Хим. сдвиг	Мультиплетность	КССВ
Оливоза (А)	H-1	5,34	дд	$J_{1, 2a}$ 9,6 $J_{1, 2e}$ 1,5
	H-2e	2,94	ддд	$J_{2e, 2a}$ 12,0 $J_{2e, 3}$ 5,1
	H-2a	1,98	ддд	$J_{2a, 3}$ 11,5
	H-3	4,02	ддд	$J_{3, 4}$ 8,8
	H-4	3,42	дд	$J_{4, 5}$ 9,5
	H-5	3,65	дк	$J_{5, 6}$ 6,0
	H-6	1,56	д	
Олиоза (В)	H-1	4,78	дд	$J_{1, 2a}$ 10,1 $J_{1, 2e}$ 1,9
	H-2e	2,19	ддд	$J_{2e, 2a}$ 12,2 $J_{2e, 3}$ 3,5
	H-2a	2,37	ддд	$J_{2a, 3}$ 9,9
	H-3	4,15	ддд	$J_{3, 4}$ 2,9
	H-4	4,03	дд	$J_{4, 5}$ 1
	H-5	3,73	дк	$J_{5, 6}$ 6,1
	H-6	1,49	д	
Циммароза (С)	H-1	5,26	д	$J_{1, 2a}$ 9,6 $J_{1, 2e}$ 2,0
	H-2e	2,30	ддд	$J_{2e, 2a}$ 13,9 $J_{2e, 3}$ 3,5
	H-2a	1,75	ддд	$J_{2a, 3}$ 2,8
	H-3	3,71	дт	$J_{3, 4}$ 2,8
	H-4	3,52	дд	$J_{4, 5}$ 9,4
	H-5	4,17	дк	$J_{5, 6}$ 6,1
	H-6	1,52	д	
Оливоза (D)	H-1	5,61	дд	$J_{1, 2a}$ 9,6 $J_{1, 2e}$ 1,5
	H-2e	2,66	ддд	$J_{2e, 2a}$ 12,0 $J_{2e, 3}$ 5,3
	H-2a	2,19	ддд	$J_{2a, 3}$ 11,6
	H-3	4,21	ддд	$J_{3, 4}$ 8,8
	H-4	3,58	дд	$J_{4, 5}$ 9,6
	H-5	3,96	дк	$J_{5, 6}$ 6,0
	H-6	1,66	д	
Оливоза (E)	H-1	4,99	дд	$J_{1, 2a}$ 9,7 $J_{1, 2e}$ 1,7
	H-2e	2,61	ддд	$J_{2e, 2a}$ 12,2 $J_{2e, 3}$ 5,1
	H-2a	2,14	ддд	$J_{2a, 3}$ 11,6
	H-3	4,11	ддд	$J_{3, 4}$ 8,6
	H-4	3,53	дд	$J_{4, 5}$ 9,6
	H-5	3,71	дк	$J_{5, 6}$ 6,0
	H-6	1,59	д	

Остаток	Протон	Хим. сдвиг	Мульти- плетность	КССВ
Агликон	H-5	7,01	с	
	H-10	6,62	с	
	H-15	5,44	д	$J_{15, 3} 1,4$
	H-2	4,90	д	$J_{2, 3} 11,2$
	H-18	4,79	дк	$J_{18, 19} 6,0$
	H-17	4,65	д	$J_{18, 17} 2,7$
	СН ₃ O-15	3,67	с	
	H-3	3,37	ддд	$J_{3, 4a} 13,0$
	H-4a	3,24	дд	$J_{3, 4e} 3,9$
	H-4e	3,05	дд	$J_{4e, 4a} 16,2$
	H-20	2,44	с	
	H-19	1,56	д	

ных протонов остатков А и D, причем в случае остатка А в спектрах наблюдается ослабление (отрицательный ЯЭО) на 1,5—3,5% интенсивности сигналов H-2e, H-3 и H-5 этого же остатка и H-2 агликона. Следовательно, остаток А замещает водород гидроксила при C-2 агликона. Аналогично, после предоблучения аномерного протона остатка D наблюдается отрицательный ЯЭО на 1,5—4,0% для сигналов H-2e, H-3 и H-5 этого остатка и на 5% для сигнала в области резонанса ароматических протонов (δ 7,01 м. д.). Это возможно лишь в том случае, если пространственно сближены протон H-5 агликона и аномерный протон остатка D и, следовательно, имеет место замещение остатком D по гидроксилу при C-6 агликона.

При предоблучении аномерных протонов остальных трех углеводных остатков ЯЭО не наблюдались, что связано, по-видимому, с неблагоприятным для данной рабочей частоты прибора временем корреляции [7]. Поэтому была использована методика двумерной J -спектроскопии, позволяющей наблюдать малые КССВ ${}^3J_{H, {}^{13}C}$, в том числе и через гликозидную связь [8]. Обнаружение ССВ аномерного протона одного из углеводных остатков в сигнале атома углерода другого остатка однозначно свидетельствует о наличии гликозидной связи между ними. Селективное обращение намагниченности аномерного протона остатка E вызывает модуляцию в двумерном спектре сигнала C-3 остатка D с частотой ~ 5 Гц. Это означает, что существует ССВ с константой, равной ~ 5 Гц между H-1 остатка E и C-3 остатка D, т. е. имеет место замещение второго первым по гидроксилу при C-3. Таким же образом доказано замещение по C-3 гидроксилам остатка A остатком B (${}^3J_{H-1B, C-3A} \sim 5$ Гц) и остатка B остатком C (${}^3J_{H-1C, C-3B} \sim 3$ Гц). Отсюда также следует, что именно остаток C, замещенный по C-3, может иметь в качестве заместителя только метильную группу и является остатком β -циммарозы.

Как известно [6], точное отнесение сигналов ${}^{13}C$ -ЯМР позволяет найти эффекты гликозилирования и определить тем самым абсолютные конфигурации сахаров.

Эффекты гликозилирования в остатках оливозы А и D могут быть определены из сравнения их спектров со спектром остатка E того же сахара на невозстанавливаемом конце в молекуле антибиотика. Ключевыми при этом являются β -эффекты гликозилирования на углеродах, несущих экваториальный протон (т. е. на C-2). Наличие этого протона при C-2 позволяет использовать для β -замещенного остатка оливозы те же закономерности влияния структурных факторов на эффекты гликозилирования, которые установлены для β -замещенного остатка рамнозы [9]. Большие по модулю отрицательные эффекты гликозилирования для C-2 в спектрах остатка D ($-3,4$ м. д.) и остатка A ($-2,8$ м. д.) отвечают одинаковой аб-

Величины химических сдвигов атомов углерода в спектрах ^{13}C -ЯМР вариамицина (I) в $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (δ , м. д.)

Остатки сахаров	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OCH_3
Оливоза (А)	101,4 (158) *	38,19 (2,8) *	81,28	78,85	72,97	18,69	
Олиоза (В)	99,99 (157) *	32,73 (5,3) *	76,66	69,57	71,81	17,22	
Циммароза (С)	97,12 (158) *	35,80	78,79	74,07	71,16	19,04	58,91
Оливоза (D)	97,58 (160) *	37,52 (3,4) *	80,00	75,56	73,32	18,78	—
Оливоза (Е)	99,21 (160) *	40,95	71,81	78,05	73,43	18,47	—

Агликов: 212,88 (C-16); 203,67 (C-1); 165,33; 160,03; 156,66; 139,06; 136,90; 111,24; 109,11; 108,63 (C-6 – C-9, C-11 – C-14); 116,93 (C-10); 101,83 (C-5); 82,69 (C-15); 80,58 (C-17); 77,76 (C-2); 68,94 (C-18); 42,43 (C-3); 27,93 (C-4); 20,40 (C-19); 8,73 (C-20); 58,03 (15- OCH_3).

* В скобках КССВ $J_{\text{C-1}}^1$, Н-1 (Гц).

Таблица 3

Величины химических сдвигов атомов углерода в спектрах ^{13}C -ЯМР L-олиозы (IV) (δ , м. д.)

Аномер	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α	92,7	34,95	66,5	71,5	66,75	18,1
β	95,55	38,05	70,15	71,25	72,0	17,95

солютной конфигурации обоих сахаров дисахаридного фрагмента молекулы вариамицина.

В связи с отсутствием в литературе данных о величинах хим. сдвигов в ^{13}C -ЯМР-спектре свободной олиозы (IV), необходимых для определения абсолютной конфигурации остатка этого сахара в антибиотике, нами был осуществлен синтез сахара (IV) из производного рамнозы (V) [10] и снят его ^{13}C -ЯМР-спектр в пиридине (табл. 3).

Большой по модулю отрицательный эффект гликозилирования для C-2 остатка олиозы в антибиотике (ср. табл. 2, 3) свидетельствует о принадлежности этого сахара, как и циммарозы, к D-ряду.

Совокупность всех приведенных данных позволяет предложить для вариамицина в отличие от описанного ранее [4] строение 2-[β -D-циммарозил-(1 \rightarrow 3)- β -D-олиозил-(1 \rightarrow 3)- β -D-оливозил]-6-[β -D-оливозил-(1 \rightarrow 3)- β -D-оливозил]-хромомидинона.

Экспериментальная часть

Контроль протекания реакций осуществляли на пластинках DC-Fertigplatten Kieselgel 60. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Silpearl. ЯМР-спектры были измерены на приборах Bruker WM-250 и Bruker AM-300 в указанных растворителях без стандарта. Величины КССВ (J) приведены в герцах. Измерение оптического вращения осуществляли на поляриметре Jasco DH-360.

Метил-6-дезоксидеокси-3,4-О-изопропилиден- α -L-манно-гексопиранозид (VI). Смесь 1080 мг (5 ммоль) производного рамнозы (V) [10], 20 мг *n*-толуолсульфокислоты, 4 мл ацетона и 4 мл 2,2-диметоксипропана выдерживали

($\sim 20^\circ \text{C}$, 10 ч), нейтрализовали NaHCO_3 , упаривали досуха и добавляли хлороформ и воду. Водный слой отделяли, экстрагировали хлороформом. Объединенный экстракт промывали насыщенным раствором NaCl , сушили фильтрованием через слой безводного Na_2SO_4 , упаривали досуха и остаток подвергали хроматографии на колонке с силикагелем в смеси гексан — этилацетат (1 : 1). Получили 774 мг (71,6%) соединения (VI), R_f 0,14 (гексан — этилацетат, 1 : 1), сироп, $[\alpha]_D^{25} -79,4^\circ$ (c 1,0, хлороформ). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): 1,25 (д, 3H, $J_{\text{CH}_3,5}$ 6,6, CH_3 -5); 1,36 и 1,52 (синглеты, 6H, $(\text{CH}_3)_2$ C-3,4); 2,55 (уш. д, 1H, $J_{\text{OH},2}$ 7,3, HO-2); 3,43 (с, 3H, CH_2O -1); 3,68 (м, 1H, $J_{2,1}$ 5,7, $J_{2,3}$ 3,5, H-2); 3,80 (дк, 1H, $J_{5,4}$ 2, H-5); 4,10 (дд, 1H, $J_{4,3}$ 7,5, H-4); 4,5 (дд, 1H, H-3); 4,65 (д, 1H, H-1).

Метил-2,6-дидезокси-3,4-О-изопропилиден- α -L-ликсо-гексопиранозид (VII). К суспензии 96 мг (4 ммоль, ~ 4 экв.) гидрида натрия в 4 мл тетрагидрофурана добавляли 10 мг имидазола и затем раствор 207 мг (0,96 ммоль) соединения (VI) в 2 мл тетрагидрофурана. Через 20 мин при перемешивании приливали 0,24 мл (4 ммоль, ~ 4 экв.) сероуглерода и еще через 20 мин 0,25 мл (4 ммоль, ~ 4 экв.) подистого метила. После 10-минутной выдержки реакционную смесь разлагали водой и экстрагировали хлороформом. Хлороформный экстракт промывали водой, насыщенным раствором NaCl , сушили фильтрованием через слой безводного Na_2SO_4 и упаривали. К раствору остатка (ксантогенат соединения (VI), R_f 0,5 (гексан — этилацетат, 3 : 1)) в 4 мл толуола в атмосфере аргона добавляли 0,54 мл (2 ммоль, 2 экв.) три-*n*-бутилового гидрида и 10 мг N,N -азоизобутиронитрила.

Смесь кипятили 30 мин в токе аргона, охлаждали и пропускали через слой силикагеля в градиенте гексан — смесь гексана и этилацетата (4 : 1). Полученный продукт очищали колоночной хроматографией в смеси гексан — этилацетат, 4 : 1. Получили 165 мг (86%) соединения (VII), R_f 0,35 (гексан — этилацетат, 3 : 1), сироп, $[\alpha]_D^{24} -62^\circ$ (c 1,0, хлороформ). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): 1,23 (д, 3H, $J_{\text{CH}_3,5}$ 6,5 CH_3 -5); 1,31 и 1,46 (синглеты, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ -3,4); 1,68 (ддд, 1H, $J_{2a,1}$ 6, $J_{2a,3}$ 4, J_{2ae} 10,3; H-2a); 2,5 (дм, 1H, $J_{2e,3} = J_{2e,1}$ 5,2, H-2e); 3,34 (с, 3H, CH_2O -1); 3,82 (дк, 1H, $J_{5,4}$ 1,9, H-5); 3,94 (дд, 1H, $J_{4,3}$ 7, H-4); 4,43 (ддд, 1H, H-3); 4,77 (дд, 1H, H-1).

L-Олиоза (IV). Смесь 60 мг (0,3 ммоль) производного (VII), 0,8 мл уксусной кислоты и 0,2 мл воды нагревали 1 ч при 80°C . Раствор упаривали досуха, добавляли 2 мл толуола и вновь упаривали досуха, после чего остаток высушивали в вакууме. Получили 44 мг ($\sim 100\%$) соединения (IV) [10].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жданович Ю. В., Локшин Г. Б., Кузовков А. Д., Рудая С. М. // Химия природных соедин. 1971. № 5. С. 646—649.
2. Локшин Г. Б., Жданович Ю. В., Кузовков А. Д., Шейченко В. И. // Химия природных соедин. 1973. № 3. С. 418—421.
3. Takai H., Yuki H., Takiura K. // Tetrahedron Lett. 1975. V. 16. № 36. P. 3647—3650.
4. Локшин Г. Б., Жданович Ю. В., Кузовков А. Д. // Биооргани. химия. 1975. Т. 1. № 4. С. 479—482.
5. Prinps D. A. // Helv. chim. acta. 1946. V. 29. № 2. P. 378—382.
6. Чижов О. С., Шашков А. С. // Прогресс химии углеводов / Ред. Торгов И. В. М.: Наука, 1985. С. 50—53.
7. Bock K., Josephson S., Bundle B. R. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1982. P. 59—70.
8. Galey M. J., Vociek S. H. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1985. № 4. P. 220—222.
9. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. P. 173—185.
10. Brimacombe J. S., Ching O. A., Stacey M. // J. Chem. Soc. (C). 1969. P. 1270—1274.

Поступила в редакцию
25.IV.1990

A. S. SHASHKOV, D. V. JASHUNSKY, Yu. V. ZHDANOVICH*, G. B. LOKSHIN*

STRUCTURE OF ANTITUMOUR ANTIBIOTIC VARIAMYCIN

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow;*

** All-Union Research Institute of Antibiotics, Moscow*

The results of the structural study of antitumour antibiotic variamycin and its peracetyl derivative by ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy are reported.

Structures of carbohydrate chains of the antibiotics molecule are revised. Variamycin is shown to be 2-[β -cymmarosyl(1-3)- β -oliosyl (1-3)- β -olivosyl (1-3)- β -olivosyl]chromomycinone.