



УДК 547.458.2 + 576.858

СИНТЕЗ 4'-О-( $\alpha$ -ЭТОКСИПРОПИОН-2"-ИЛ)-ЛАКТОЗЫ  
КАК МОДЕЛИ СУБСТРАТОПОДОБНОГО ИНГИБИТОРА  
ВИРУСНЫХ НЕЙРАМИНИДАЗ

*Валашек И. Е., Шахова М. К., Самохвалов Г. И.,  
Ройхель В. М., Рейзин Ф. Н.*

*Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва;*

*Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

При переэтерификации 2,3,6,2',3',6'-гекса-О-бензоил- $\beta$ -бензиллактозида с диэтилкеталем этилпирувата с последующим омылением защитных бензоильных групп, освобожденным карбоксильной функцией и каталитическим гидрогенолизом 1-О-бензильной группы синтезирована 4'-О-( $\alpha$ -этоксипропион-2"-ил)-лактоза. Натриевая соль 4'-О-( $\alpha$ -этоксипропион-2"-ил)-лактозы в концентрации от 1 до 50 мкг/мл не оказывала влияния на способность вируса гриппа В агглютинировать куриные эритроциты и на размножение вируса болезни Ньюкасла в культуре клеток куриных эмбрионов. В концентрации 10 мкг/мл соединение проявляло биологическую активность, стимулируя вирусиндуцированный интерферогенез.

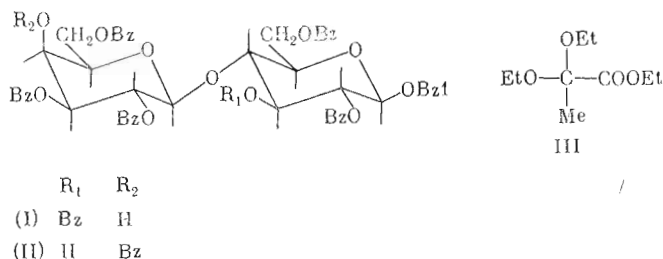
Нейраминиллактоза принадлежит к числу простейших субстратов вирусных нейраминидаз. Поиск противовирусных препаратов по принципу синтеза субстратоподобных ингибиторов может исходить из получения аналогов нейраминиллактозы.

Известны два природных изомерных соединения: N-ацетилнейраминил-(2  $\rightarrow$  3)-О- $\beta$ -D-галактопиранозил-(1  $\rightarrow$  4)-D-глюкопираноза и N-ацетилнейрамшил-(2  $\rightarrow$  6)-О- $\beta$ -D-галактопиранозил-(1  $\rightarrow$  4)-D-глюкопираноза [1]. Оба изомера с разной скоростью расщепляются очищенной нейраминидазой (КФ 3.2.1.18), тем самым обнаруживая зависимость между скоростью распада энзимсубстратного комплекса и типом связи N-ацетилнейраминовой кислоты с лактозой. Показано, что выделенные из женского молока олигосахариды с (2  $\rightarrow$  4)-типом связи между нейраминовой кислотой и глюкозамином являются ингибиторами вирусных нейраминидаз [2].

Представляло интерес получить соединение с вирусингибиторными свойствами, максимально упростив остаток нейраминовой кислоты — редуцировав его до остатка пировиноградной кислоты, присоединенного к лактозе специфической кетозидной связью и сохраняющего важную для взаимодействия с ферментом карбоксильную группу [3, 4].

Синтез подобных соединений осуществлен нами ранее переэтерификацией диэтилкетала этилпирувата с селективно бензоилированными производными  $\beta$ -метил-D-галактопиранозидом [5].

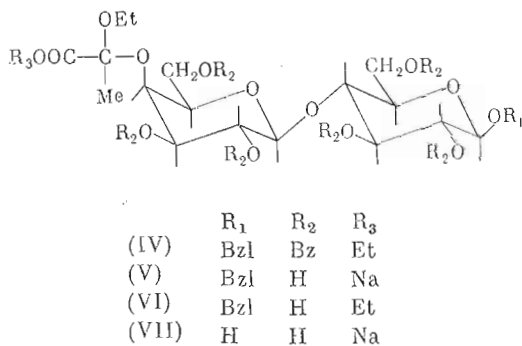
В данной работе полученные при избирательном бензоилировании  $\beta$ -бензиллактозида 2,6,2',3',4',6'-гекса-О-бензоил- $\beta$ -бензиллактозид (I) и 2,3,6,2',3',6'-гекса-О-бензоил- $\beta$ -бензиллактозид (II) подвергнуты переэтерификации с диэтилкеталем этилпирувата (III) в присутствии каталитических количеств *n*-толуолсульфокислоты.



При переэтерификации 2,3,6,2',3',6'-гекса-О-бензоил- $\beta$ -бензиллактозида (I) с диэтилкеталем этилпирувата с выходом 40% получен 2,3,6,2',3',6'-гекса-О-бензоил-4'-О-( $\alpha$ -этоксипропион-2"-ил)- $\beta$ -бензиллактозид (IV). Изомерное соединение (II) со свободной 3-ОН-группой в описанных условиях не вступало в реакцию переэтерификации и было возвращено количественно в неизменном состоянии, что указывало на отсутствие миграции бензоильной группы в условиях реакции переэтерификации.

Наблюдаемая ранее на 2,3,6-три-О-бензоил- $\beta$ -метил-*D*-галактопиранозиде [5] миграция бензоильной группы C<sub>4</sub> → C<sub>6</sub> в условиях переэтерификации на бензоате бензил- $\beta$ -лактозида (I) не обнаружена, так как в условиях ТСХ изомеры соединения (I) различались бы хроматографической подвижностью [6]. Не вступившая в реакцию часть исходного 2,3,6,2',3',6'-гекса-О-бензоил- $\beta$ -бензиллактозида возвращалась в неизменном состоянии в виде хроматографически однородного вещества.

После омыления кетала (IV) метанольным раствором метилата натрия бумажная хроматография продукта реакции показала присутствие двух веществ. Препаративной ВХ выделена преимущественно натриевая соль 4'-О-( $\alpha$ -этоксипропион-2"-ил)- $\beta$ -бензиллактозида (V) и небольшое количество неомыленного эфира (VI). Бензильная



защита в соединении (V) удалена каталитическим гидрогенолизом над палладием на угле, в результате чего получена с выходом 70% натриевая соль 4'-О-( $\alpha$ -этоксипропион-2"-ил)-лактозы (VII). При гидрогенолизе наблюдалось частичное расщепление кетальной группировки и образование свободной лактозы.

Структура и индивидуальность синтезированных соединений подтверждена элементарным анализом, ТСХ, ИК- и УФ-спектрами и определением удельного вращения.

Противовирусная активность полученной натриевой соли 4'-O-( $\alpha$ -этоксипропион-2"-ил)-лактозы (VII) была проверена на модели вирус болезни Ньюкасла — культуры клеток куриных эмбрионов.

Влияние на гемагглютинацию определяли на модели взаимодействия вируса гриппа В. Натриевая соль (VII) хорошо растворялась в ростовых средах (среда Игла), не меняла pH среды при растворении. Испытываемое соединение в концентрациях 0,0001—50 мкг/мл не было цитотоксично для культуры клеток куриных эмбрионов при 120-часовой совместной инкубации. В концентрации 1—50 мкг/мл вещество не влияло на способность гриппа В агглютинировать куриные эритроциты. Вещество не проявляло активности при использовании разных доз вируса гриппа: 8, 16, 32 гемагглютинирующих единиц \* в 0,25 мл.

Для изучения влияния вещества на размножение вируса болезни Ньюкасла соединение (VII) в концентрациях 0,01—50 мкг/мл инкубировали с культурой клеток куриных эмбрионов, заражали в дозе 1000 бляшкообразующих единиц в 0,2 мл и выдерживали 24 ч при 37° в присутствии соединения (VII). В различных опытах варьировали длительность предварительного контакта вещества с культурой до заражения от 10 мин до 5 сут. Титр вируса определяли по его бляшкообразующей активности под агаровым покрытием [7]. В проведенных опытах не отмечено существенных различий уровня размножения вируса в опытных и контрольных группах.

Вещество исследовалось также в отношении влияния на вирусиндуцированный интерферогенез [8]. Для этой цели соединение (VII) в концентрации 0,1—50 мкг/мл инкубировали 20 мин с культурой клеток куриных эмбрионов, после чего вносили интерфероген (вирус гриппа В, штамм Lee) и поддерживающую среду. Через 24 ч инкубации при 37° в культуральной жидкости определяли титр интерферона. Оказалось, что в концентрации 10 мкг/мл соединение (VII) в незначительной степени стимулировало вирусиндуцированный интерферогенез, повышая концентрацию интерферона до 256 ед/мл против 144 ед/мл в контроле. Это указывает на то, что, несмотря на отсутствие активности вещества на гемагглютинирующие свойства вирусов и размножение их, препарат проявляет некоторую биологическую активность.

### Экспериментальная часть

Для адсорбционной хроматографии на колонке использовали силикагель Л (100—160  $\mu$ ) (Сhemapol, ЧССР). Отношение веса вещества к весу сорбента 1 : 10. Элюировали вещества с колонки системами: гексан — хлороформ, 3 : 1 (А); гексан — хлороформ, 1 : 1 (Б). Однородность соединений определяли ТСХ на силуфол в системе хлороформ — метанол, 50 : 1 (В). Проявляли хроматограммы в УФ-свете. БХ проводили восходящим способом на бумаге Ватман № 1 в системе ацетон — *n*-бутанол — H<sub>2</sub>O, 7 : 2 : 1 (Г); восстанавливающие сахара проявляли кислым фталатом анилина, невосстанавливающие — периодатным реактивом [9]. ИК-спектры снимали на спектрометре UR-10 в вазелиновом масле; УФ-спектры — в спирте на Specord UV Vis (ГДР). Удельное вращение определяли на приборе ЕПЛ-1А. Растворители удаляли под уменьшенным давлением при температуре не выше 40°. Данные элементарного анализа синтезированных соединений удовлетворительно совпадали с вычисленными.

\* Гемагглютинирующая единица — это копечное разведение вируса, еще вызывающее гемагглютинацию.

2,3,6,2',3',6'- и 2,6,2',3',4',6'-Гекса-О-бензоил-β-бензиллактозиды (I и II) получены избирательным бензоилированием бензил-β-лактозида.

2,3,6,2',3',6'-Гекса-О-бензоил-4'-О-(α-этоксипропион-2"-ил)-β-бензиллактозид (IV). К раствору 1 г 2,3,6,2',3',6'-гекса-О-бензоил-β-бензиллактозида (I) в 15 мл сухого бензола добавляли 0,025 г *n*-толуолсульфокислоты и 1,9 мл (10 экв.) этилового эфира диэтилкетала пировиноградной кислоты (III). Реакционную смесь нагревали при кипении 4 ч с одновременной отгонкой растворителя для удаления отщепляющегося спирта и с добавлением бензола до постоянного объема реакционной массы. После окончания реакции растворитель удаляли, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем. При элюции системой А получали в виде сиропа 0,45 г соединения (IV) (39,9%).  $[\alpha]_D^{20} + 16,8^\circ$  (с 0,24, хлороформ),  $R_f$  0,21 (В). В ИК-спектре отсутствовала полоса поглощения в области  $3470 \text{ см}^{-1}$ , проявляющаяся в исходном (I). При элюции системой В получили 0,52 г исходного соединения (I).

Натриевая соль 4'-О-(α-этоксипропион-2"-ил)-β-бензиллактозида (V). К раствору 0,23 г лактозида (IV) в 20 мл абс. метанола приливали 2 мл 0,1 М раствора метилата натрия и оставляли при комнатной температуре на 24 ч. Окончание реакции контролировали ТСХ в системе В. При БХ в системе Г реакционная масса обнаруживала два пятна с  $R_f$  0,12 и 0,66. Удаляли часть метанола, остаток препаративно хроматографировали на бумаге. Зону с  $R_f$  0,12 элюировали спиртом. Выход соединения (V) 0,08 г (73,5%).  $[\alpha]_D^{21} - 22,31^\circ$  (с 0,36,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). В ИК-спектре присутствовали полосы поглощения при  $3600-3200$  ( $\text{OH}^-$ ) и  $1610 \text{ см}^{-1}$  ( $-\text{COO}^-$ ). В УФ-спектре наблюдались полосы поглощения в области 260 нм.

Элюируя зону с  $R_f$  0,66, получили в виде сиропа 0,013 г (11,4%) 4'-О-(α-этоксипропион-2"-ил)-β-бензиллактозида (VI). В ИК-спектре присутствовали полосы поглощения при  $3600-3200$  ( $\text{OH}^-$ ) и  $1735 \text{ см}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ ).

Натриевая соль 4'-О-(α-этоксипропион-2"-ил)-лактозы (VII). Раствор 0,026 г натриевой соли (V) в 5 мл абс. метанола при атмосферном давлении гидрировали над предварительно отмытым до pH 7,4 10% Pd/C до полного удаления бензильной группы (отсутствие поглощения в области 260 нм в УФ-спектре). Катализатор отфильтровывали, промывали метанолом. После удаления растворителя получали смесь, содержащую наряду с основным количеством соединения (VII) с  $R_f$  0,16 (Г) незначительное количество лактозы с  $R_f$  0,21 (Г). Разделение смеси препарат ивной БХ привело к образованию 0,016 г (70,5%) аморфного продукта (VII).  $[\alpha]_D^{20} + 36,7^\circ$  (20 мин)  $\rightarrow + 73,4^\circ$  (оконч., с 0,18,  $\text{H}_2\text{O}$ ). В ИК-спектре присутствовали полосы поглощения в области  $3600-3200$  ( $\text{OH}^-$ ) и  $1610 \text{ см}^{-1}$  ( $-\text{COO}^-$ ).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Schneir M. L., Rafelson M. E., Jr. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **130**, 1—11.
2. Huang R. T. C., Orlich M. (1972) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **353**, 318—322.
3. Haskell T. H., Peterson F. E., Watson D., Plessas N. R. (1970) *J. Med. Chem.*, **13**, 697—704.
4. Brossmer R., Bürk G., Eschenfelder V., Holmquist L., Jäckh R., Neumann B., Rose U. (1974) in *Behring Institute Mitteilungen*, **55**, pp. 119—123.
5. Валашек И. Е., Шахова М. К., Минаев В. А., Самохвалов Г. И. (1974) *Ж. общ. химии*, **44**, 1161—1164.
6. Ballard J. M., Hough L., Richardson A. C. (1974) *Carbohydr. Res.*, **34**, 184—188.
7. Hsiung G. D., Melnick J. L. (1955) *Virology*, **1**, 533—535.
8. Зейтленок Н. А., Ройхель В. М., Горбачкова Е. А. (1969) *Бюл. эксп. биол. мед.*, **67**, 76—79.
9. Bonner T. G. (1960) *Chem. Ind.*, 345.

Поступила в редакцию  
24.II.1976

После переработки  
3.V.1976

THE SYNTHESIS OF 4'-O-( $\alpha$ -ETHOXYPROPION-2''YL)-LACTOSE,  
A MODEL OF SUBSTRATE-LIKE INHIBITOR OF VIRUS NEURAMINIDASES

VALASHEK I. E., SHAKHOVA M. K., SAMOKHVALOV G. I.,  
ROYHEL V. M., REYZIN F. N.

*All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow,  
Institute of Poliomyelitis and Virus Encephalitides,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

4'-O-( $\alpha$ -ethoxypropion-2''-yl)-lactose (I) was synthesized by transesterification of benzyl 2,3,6,2',3',6'-hexa-O-benzoyl- $\beta$ -lactoside with diethylketal of ethylpyruvate, followed by removal of the protecting benzoyl groups, liberation of carboxylic function and catalytic hydrogenolysis of 1-O-benzyl group. Sodium salt of (I) over a concentration range from 1 to 50  $\mu\text{g/ml}$  was found to be without effect on influenza B virus ability to agglutinate chicken erythrocytes and it also failed to affect the Newcastle disease virus reproduction in the cell culture of chicken embryos. On the other hand, the title compound in 10  $\mu\text{g/ml}$  concentration showed biological activity, namely, it stimulated virus-induced interferonogenesis.

---