



УДК [547.455.623'233.1'264'472.3+547.964.4].057

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНОМЕРНЫХ БУТИЛГЛИКОЗИДОВ МУРАМОИЛДИПЕПТИДА

© 1999 г. С. С. Пертель[#], А. Л. Кадун, Е. С. Какаян, В. Я. Чирва, Ю. Л. Криворутченко*,
Ю. С. Кривошеин*, А. А. Бакова*, И. Б. Андроновская**

Симферопольский государственный университет им. М. В. Фрунзе, 333007, Украина, Симферополь,
Ялтинская, 4;

* Крымский медицинский университет им. С. И. Георгиевского, Симферополь;

** Таврический экологический институт, Симферополь

Поступила в редакцию 11.11.98 г. Принята к печати 05.04.99 г.

Описан синтез аномерных бутилгликозидов мурамоилдипептида. 4,6-*O*-Бензилиденирование α -бутилгликозида *N*-ацетил-*D*-глюкозамина и 3-*O*-алкилирование бензилиденового производного (*S*)-2-хлорпропионатом натрия по Вильямсону привели к защищенному α -бутилгликозиду мурамовой кислоты, который конденсировали с *L*-Ala-*D*-iGln-OBzl DCC-HOSu-методом. Мягкий кислотный гидролиз и последующий каталитический гидрогенолиз полученного гликопептида дали целевой α -бутилгликозид *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина. Ключевым соединением в синтезе β -бутилгликозида *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина служило 1-ОН-производное мурамовой кислоты – 2-ацетамидо-4,6-ди-*O*-ацетил-2-дезоксид-3-*O*-[(*R*)-1-(метоксикарбонил)этил]- α -*D*-глюкопираноза. При его взаимодействии с избытком тионилхлорида получен соответствующий гликозилгалогенид, который конденсировали с *n*-бутанолом по Гельфериху. *O*-Деацетилирование, 4,6-*O*-изопропилиденирование и последующий щелочной гидролиз продукта привели к защищенному β -бутилгликозиду мурамовой кислоты. Его активацию, конденсацию с *L*-Ala-*D*-iGln-OBzl и последующее удаление защитных групп проводили, как описано выше для синтеза α -бутилгликозида *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина. Изучены адъювантная активность полученных соединений по отношению к белкам ВИЧ gp160 и gp120, их способность влиять на размножение вируса ВИЧ *in vitro* и на пролиферацию Т-клеток селезенки мышей. Показано, что биологическая активность аномерных мурамоилпептидов существенно зависит от конфигурации их аномерного центра.

Ключевые слова: мурамоилпептиды; адъюванты; гликозидный синтез; аномерные бутилгликозиды; стимуляция продукции антител против gp120 и gp160; репликация ВИЧ-1; пролиферация Т-клеток.

ВВЕДЕНИЕ

По имеющимся данным [1], конфигурация аномерного центра мурамоилпептидов может существенно влиять на их биологическую активность. Однако этот вопрос изучен в недостаточной степени прежде всего потому, что синтезировано сравнительно небольшое число соответствующих аномерных пар. В данной работе нами описан синтез α - и β -бутилгликозидов мурамоилдипептида и изучены некоторые биологические свойства этих соединений, в частности адъювантная активность по отношению к фрагментам белка вируса ВИЧ-1, способность влиять на размножение вируса ВИЧ *in vitro*, а также воздействие на пролиферацию Т-клеток селезенки мышей [2, 3].

Сокращения: MDP – мурамоилдипептид; DP – дипептид; iGln – изоглутамин; HOSu – *N*-гидроксисукцинимид.

[#] Автор для переписки (тел.: (0652) 23-03-20; e-mail: orgchem@ccssu.crimea.ua).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез аномерных бутилгликозидов *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина

В качестве исходного соединения для синтеза гликозидов MDP был использован *N*-ацетил-*D*-глюкозамин (I) (схема 1). α -Бутил- и α -бензилгликозиды *N*-ацетил-*D*-глюкозамина (II) и (VII) получали по методу Фишера. Взаимодействие гликозида (II) с бензальдегидом в присутствии $ZnCl_2$, а гликозида (VII) – с избытком диметилацеталя бензальдегида в присутствии H_2SO_4 привело к 4,6-*O*-бензилиденовым производным (III) и (VIII). Синтез соединения (VIII) был описан ранее [4]. Структуру гликозида (III) подтверждали с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии (см. “Эксперимент. часть”). Сигнал H1 при δ 4.7 с константой $CCW_{J_{1,2}}$ 3 Гц свидетельствует о 1,2-*цис*-конфигурации гликозидной связи. Далее полученные ацетали (III) и (VIII) 3-*O*-алкилировали, обрабатывая их сначала избытком металлического натрия, диспергированного в диоксане, а затем избытком на-

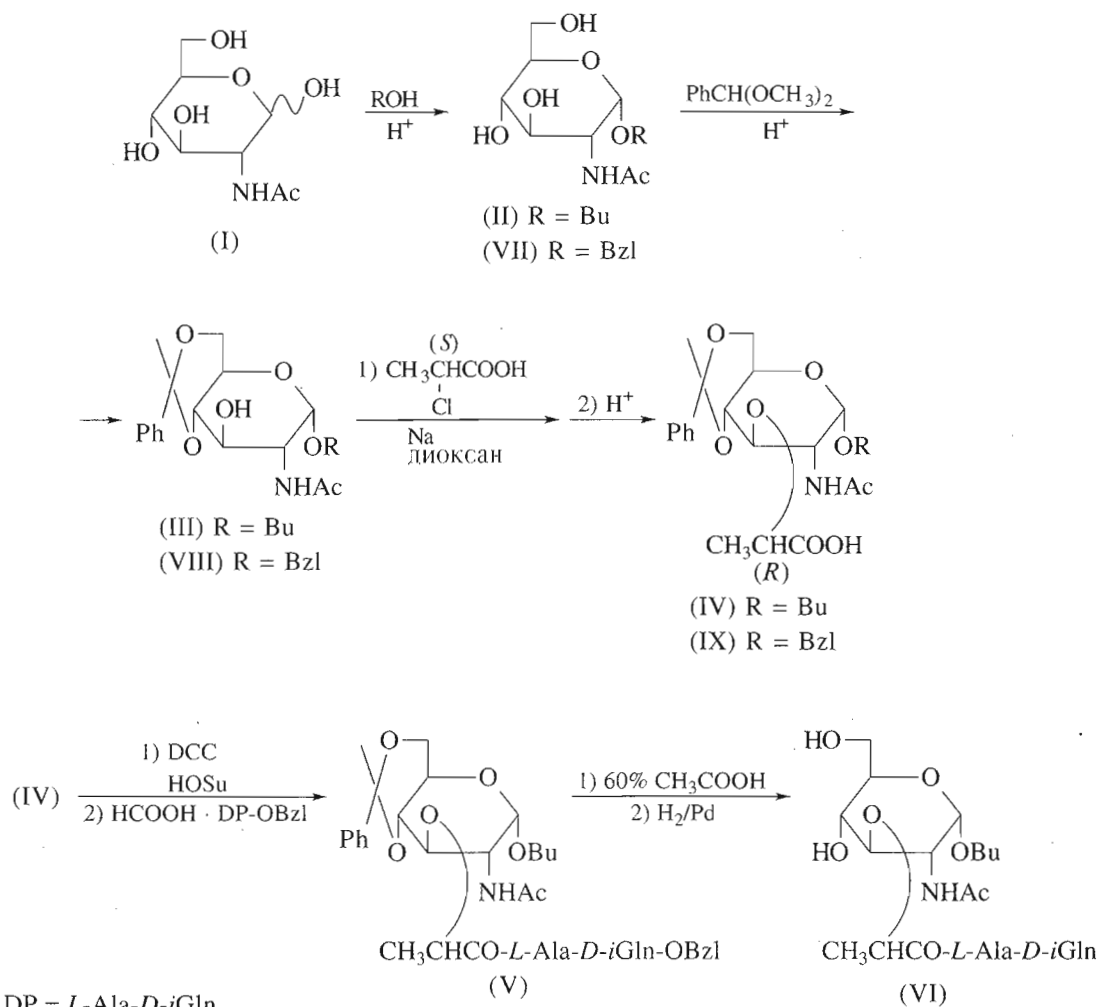


Схема 1.

триевой соли (S)-2-хлорпропионовой кислоты. Стереохимически чистые α -бутил- и α -бензилгликозиды (IV) и (IX) были выделены хроматографическим разделением реакционной смеси и использованы для получения соответственно α -бутил- и β -бутилгликозидов MDP.

Синтез α -бутилгликозида *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина проводили путем активации α -бутилгликозида муравовой кислоты (IV) DCC-HOSu-методом с последующей конденсацией активированного производного с формиатом бензилового эфира *L*-аланил-*D*-изоглутамина (HCOOH · DP-OBzl) в присутствии *N*-метилморфолина (схема 1).

¹H-ЯМР-спектр полученного гликопептида (V) соответствует предполагаемой структуре (см. "Эксперимент. часть"). Снятие бензилиденовой защиты гликопептида (V) кислотным гидролизом и последующее деблокирование карбоксильной группы остатка изоглутамина с помощью каталитического гидрогенолиза над палладиевой чернью привели к целевому α -бутилгликозиду (VI).

Для синтеза β -бутилгликозида *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамина (XVI) (схема 2) был использован α -бензилгликозид (IX). Это соединение метилировали диазометаном, затем дебензилиденировали нагреванием с 60% уксусной кислотой и обрабатывали уксусным ангидридом в пиридине. Каталитический гидрогенолиз полученного ди-*O*-ацетата (X) привел к производному муравовой кислоты (XI), содержащему незащищенный гликозидный гидроксил. Взаимодействие производного (XI) с избытком тионилхлорида в хлороформе дало гликозилхлорид (XII), который перевели в защищенный β -бутилгликозид муравовой кислоты (XIII) по методу Гельфериха. 1,2-*транс*-Конфигурация гликозидной связи в гликозиде (XIII) была подтверждена его ¹H-ЯМР-спектром, который содержит дублет H1 при δ 4.44 м.д. с КССВ $J_{1,2}$ 8 Гц. Остальные данные ЯМР приведены в "Эксперимент. части" и соответствуют предполагаемой структуре.

Далее диацетат (XIII) деацетилювали по Земплону и изопропилиденировали, действуя

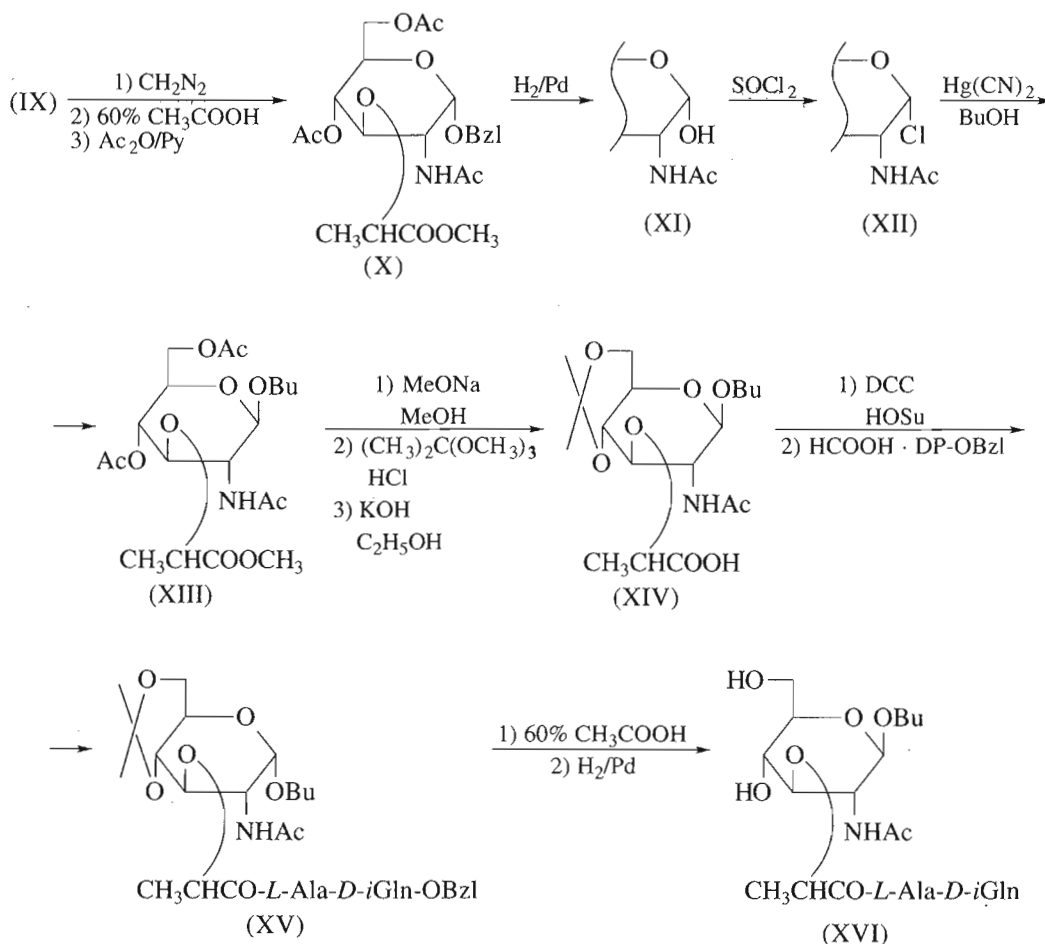


Схема 2.

2,2'-диметоксипропаном в присутствии следов HCl. Соответствующее 4,6-*O*-изопропилиденовое производное подвергали щелочному гидролизу, и полученную кислоту (XIV) превращали в *N*-оксисукцинимидный эфир, используя DCC в качестве конденсирующего агента. В результате взаимодействия активированного эфира с формиатом бензильного эфира *L*-аланил-*D*-изоглутамина в присутствии *N*-метилморфолина был получен гликопептид (XV). Его ¹H-ЯМР-спектр соответствует предполагаемой структуре (см. "Эксперимент. часть"). Деблокирование защищенного производного (XV) с помощью кислотного гидролиза и последующего каталитического гидрогенолиза привело к целевому β-бутилгликозиду (XVI).

Биологические свойства аномерных бутилгликозидов мурамоилдипептида

Исследовалась стимуляция продукции антител против двух рекомбинантных поверхностных белков вируса ВИЧ-1 штамма LAI – grp160 и

grp120. Результаты изучения адьювантной активности аномерных мурамоилпептидов демонстрирует зависимость биологических свойств этих соединений от конфигурации аномерного центра (см. рис. 1).

Как следует из данных, приведенных на диаграмме, адьювантная активность α-бутилгликозида MDP по отношению к белкам gr160 и gr120 уступает адьювантной активности геля фосфата алюминия. В то же время активность β-бутилгликозида MDP значительно превышает адьювантность геля фосфата алюминия в случае gr160 и несколько превосходит последнюю в случае gr120.

Для изучения влияния мурамоилпептидов на репликацию ВИЧ-1 использовали высокопермиссивную для ВИЧ линию Т-клеток Jurkat-tat. Оценка влияния мурамоилпептидов на репликацию ВИЧ-1 производилась с помощью коэффициента репликации (КР), который рассчитывали как отношение концентрации антигена ВИЧ-1 р24 в супернатантах (нг/мл) к количеству жизне-

способных клеток (млн/мл). Значение КР в контролях (среды без добавления мурамоилпептидов) принимали за 100%.

Как следует из данных, приведенных на диаграмме (рис. 2), α -бутилгликозид MDP стимулирует репликацию ВИЧ-1 при использовании как больших, так и малых доз реагента, причем наибольшее повышение уровня КР было зафиксировано на 11-е сутки культивирования клеток.

β -Бутилгликозид MDP при семисуточном культивировании практически не стимулирует продукцию вируса ВИЧ-1 при обеих использованных концентрациях (2 и 10 мкг/мл⁻¹), причем значения КР в обоих случаях одинаковы. Повышение КР на 11-е сутки здесь были менее выражены, чем в случае α -бутилгликозида MDP.

Изучено также воздействие препаратов на пролиферацию Т-клеток селезенки мышей. Клетки были изолированы после завершающей иммунизации [4]. Результаты испытаний приведены в таблице.

Как следует из этих данных, α -бутилгликозид MDP является слабым стимулятором пролиферации Т-клеток и уступает в этом отношении гелю фосфата алюминия. В то же время β -бутилгликозид эффективно стимулирует пролиферацию Т-клеток, превосходя соответствующую активность фосфата алюминия в два раза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ¹H-ЯМР (δ , м.д. относительно Me₄Si, КССВ (J) в герцах) записаны на спектрометре Varian VXR-300 (300 МГц), ИК-спектры – на спектрофотометре Specord 75-IR в таблетках KBr. ТСХ осуществляли на пластинках Silufol UV-254 (алюминиевые пластинки, покрытые силикагелем Silpearl UV-254) (Kavalier, Чешская республика) в системах растворителей хлороформ–этанол 10 : 0.5 (а), 10 : 1 (б), 10 : 2 (в) и *n*-бутанол–уксусная кислота–вода 3 : 1 : 1 (г); детектирование путем нагревания до 300°C; КХ на силикагеле L-40/100 (Lachema, Чешская республика) с градиентным элюированием от хлороформа к смеси хлороформ–этанол 100 : 1 (А), 100 : 2 (Б), 100 : 3 (В). Оптическое вращение регистрировалось на приборе Polamat-S (546 нм) и на поляриметре СМ-1 (589 нм), температура плавления измерена в капиллярах и не корректировалась. Данные элементного анализа синтезированных соединений соответствуют расчетным значениям.

Бутил-2-ацетида-4,6-*O*-бензилиден-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозид (III). К 100 мл абсолютного *n*-бутанола прибавляли 5 г *N*-ацетил-*D*-глюкозамина, 10 мл насыщенного раствора HCl в дioxане и перемешивали смесь при 50°C \approx 5 ч, контролируя реакцию с помощью ТСХ (система г). После завершения гликозилирования и аномеризации раствор упаривали, остаток растворяли в 100 мл бутанола и вновь упаривали. К неочищен-

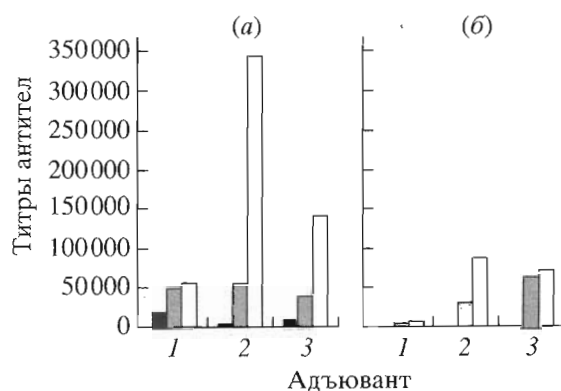


Рис. 1. Продукция антител против gp160 (а) и gp120 (б) у мышей, иммунизированных α -бутилгликозидом MDP (1), β -бутилгликозидом MDP (2), фосфатом алюминия (3), на 24-е, 50-е и 72-е сутки (черные, серые и белые столбики, соответственно).

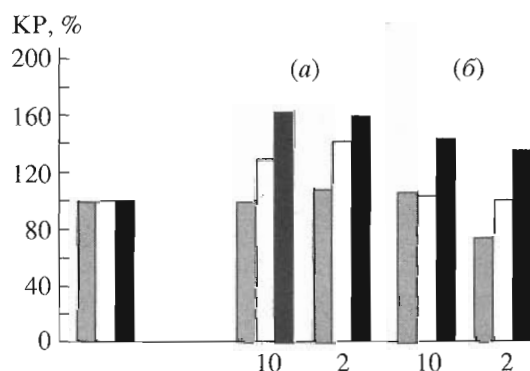


Рис. 2. Влияние α -бутилгликозида MDP (а) и β -бутилгликозида MDP (б) на репликацию ВИЧ-1. КР – коэффициент репликации (отношение концентрации антигена ВИЧ-1 р24 в супернатантах (нг/мл) к количеству жизнеспособных клеток (млн/мл)). Приведены результаты, полученные на 3-и, 7-е и 10-е сутки (серые, белые и черные столбики, соответственно). 2; 10 – концентрация гликозидов MDP, мкг/мл.

ному α -бутилгликозиду прибавляли 16 г измельченного безводного хлорида цинка и 76 мл свежеперегнанного бензальдегида. Смесь встряхивали до растворения хлорида цинка и завершения бензилиденирования (\approx 12 ч) (контроль ТСХ, система б). К смеси добавляли 150 мл воды, выдержи-

Пролиферативный ответ Т-клеток селезенки мышей, иммунизированных ВИЧ-1 gp160 LAI в присутствии адьювантов, на gp160

Адьювант	Индекс стимуляции*
α -Бутилгликозид MDP	2.13
β -Бутилгликозид MDP	13.78
Фосфат алюминия	7.44

* См. "Эксперимент. часть".

вали при 0°C 30 мин, затем прибавляли равный объем гексана и отделяли выделившуюся кристаллическую массу. Продукт (II) кристаллизовали из ацетонитрила. Получено 7.05 г (91%). $[\alpha]_{546}^{21} +9.7^\circ$ (*c* 2.1; CH₃OH). Т. пл. 197–198°C. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 0.89 т (3H, *J* 7, CH₃CH₂), 1.35 кт (2H, *J* CH₂, CH₂ 8, CH₂CH₃), 1.52 ддт (2H, *J* CH₂, CH_a = *J* CH₂, CH_b = *J* CH₂, CH₂ = 8, ОСН₂СН₂), 1.84 с (3H, NAc), 3.48 дд (1H, *J* H₄, H₃ = *J* H₄, H₅ = 9, H₄), 3.65 м (5H, H₂ + H₅ + H_{6a} + H_{6b} + ОСН_a), 3.78 дт (1H, *J* ОСН_b, CH₂ 8, *J* ОСН_b, ОСН_a 11, ОСН_b), 4.13 ддд (1H, *J* H₃, H₄ 9, *J* H₃, OH 5, H₃), 4.72 д (1H, *J* H₁, H₂ 3, H₁), 5.17 д (1H, *J* OH, H₃ 5, OH), 5.61 с (1H, PhCH), 7.37 м (3H, ArH), 7.45 м (2H, ArH), 7.87 д (1H, *J* NH, H₂ 8, NH).

Бензиловый эфир *N*-{2-*O*-[бутил-2-ацетиамидо-4,6-*O*-бензилиден-2,3-дидезокси- α -*D*-глюкопиранозид-3-ил]-*D*-лактоил}-*L*-аланил-*D*-изоглутамина (V). К 80 мл абсолютного диоксана добавляли 3.2 г металлического натрия, нагревали смесь до 100°C и диспергировали натрий с помощью мешалки Гершберга. Затем к полученной суспензии добавляли 5 г бензилиденового производного (III) и перемешивали раствор 1 ч при 90–95°C. Далее реакционную смесь охлаждали до 60–65°C и прибавляли 3.6 г (2 экв.) (*S*)-2-хлорпропионата натрия. Перемешивали при этой температуре еще 3 ч. После охлаждения к раствору небольшими порциями прибавляли 15 мл метанола и затем 400 мл воды. Раствор подкисляли 6 н. HCl до pH 2. Осадок отфильтровывали, дополнительное количество кислоты (IV) получали, экстрагируя маточный раствор хлороформом. Сырой продукт очищали с помощью КХ в системе хлороформ → хлороформ–этанол (100 : 5). Получили 4.6 г (77%) кислоты (IV).

Полученную кислоту (IV) обрабатывали 1.33 г (1.1 экв.) *N*-гидроксисукцинимидом и 2.37 (1.1 экв.) DCC в ацетонитриле (20 мл). Осадок отфильтровывали и к фильтрату прибавляли формиат бензилового эфира *L*-аланил-*D*-изоглутамина (полученный путем обработки в течение 3 ч 5.1 г (1.2 экв.) Вос-*L*-Ala-*D*-iGln-OBzl 20 мл муравьиной кислоты при комнатной температуре с последующим упариванием избытка реагента) и 2.7 мл (2 экв.) *N*-метилморфолина. Реакцию контролировали с помощью ТСХ (система хлороформ–метанол, 10 : 2). Растворитель упаривали, остаток подвергали КХ, используя систему хлороформ → хлороформ–этанол (100 : 6). Получено 5.6 г (72%) соединения (V). $[\alpha]_{546}^{21} +6.7^\circ$ (*c* 1.2; CH₃OH). Т. пл. 211–212°C. ¹H-ЯМР (CDCl₃ + CD₃OD): 0.80 т (3H, *J* 7, CH₃CH₂), 1.28 д (3H, *J* 3, CH₃CH (Ala))* , 1.25 д (3H, *J* 3, CH₃CH (Lact))* , 1.26 м (2H, ОСН₂СН₂СН₂),

1.84 с (3H, NAc), 1.85 м (1H, CHCH_aH_b (iGln)), 2.09 м (1H, CHCH_aH_b (iGln)), 2.33 м (2H, COCH₂ (iGln)), 2.32 м (2H, CH₂O), 3.50 м (4H, H₅ + H₂ + H_{6a} + H_{6b}), 4.04 м (4H, H₃ + H₄ + CH(Ala) + CH(iGln)), 4.26 к (1H, *J* 3, CH₃CH (Lact)), 4.76 д (1H, *J* H₁, H₂ 3.7, H₁), 4.98 с (2H, CH₂Ph), 5.4 с (1H, CHPh), 7.21 м (13H, 10ArH + 3NH), 7.33 м (2H, 2NH).

***N*-{2-*O*-[Бутил-2-ацетиамидо-2,3-дидезокси- α -*D*-глюкопиранозид-3-ил]-*D*-лактоил}-*L*-аланил-*D*-изоглутамин (VI).** 200 мг производного (V) растворяли в 5 мл 60% уксусной кислоты и нагревали 5 мин при 100°C (контроль ТСХ, система в). Раствор упаривали, остаток растворяли в 3 мл этанола и гидрировали при нормальном давлении над 50 мг палладиевой черни. По окончании реакции (контроль ТСХ, система в) катализатор отфильтровывали и раствор упаривали. Целевой гликопептид (VI) кристаллизовали из смеси этанол–этил-ацетат–диэтиловый эфир. Получено 138 мг (85%) вещества (VI). $[\alpha]_{546}^{21} +10.8^\circ$ (*c* 2.0; CH₃OH), т. пл. 123–125°C.

Бензил-2-ацетиамидо-2-дезокси- α -*D*-глюкопиранозид (VII). К суспензии 20 г *N*-ацетил-*D*-глюкозамина в 200 мл безводного бензилового спирта прибавляли 8 мл хлористого ацетила, перемешивали 4 ч при 75°C, контролируя ход реакции с помощью ТСХ (система г). Избыток бензилового спирта упаривали в вакууме. К сиропобразному остатку прибавляли 200 мл изопропанола и полученный раствор выдерживали 16 ч при 0–5°C. Осадок отфильтровывали, промывали на фильтре холодным изопропиловым спиртом и эфиром, получали 15 г гликозида (VII). Выход 53%. Т. пл. 164–166°C, $[\alpha]_D^{20} 167.8^\circ$ (*c* 0.2; H₂O); лит. [5]: т. пл. 165–166°C, $[\alpha]_D^{20} 168.0^\circ$ (*c* 0.2; H₂O).

Бензил-2-ацетиамидо-4,6-*O*-бензилиден-2-дезокси- α -*D*-глюкопиранозид (VIII). 4 г измельченного гликозида (VII), 12 мл диметилацетата бензальдегида и 0.5 мл 10% раствора конц. H₂SO₄ в метаноле нагревали до 100°C при непрерывном перемешивании до растворения и выдерживали при этой температуре еще 2–3 мин (контроль ТСХ, система б). Вязкий сироп после охлаждения при интенсивном перемешивании вливали в 80 мл гексана. Осадок целевого продукта (VIII) тщательно растирали под слоем гексана и отфильтровывали. Получено 4.5 г (58%). Т. пл. 264–265°C, $[\alpha]_D^{20} 115.0^\circ$ (*c* 1.0; C₅H₅N), лит. [4]: т. пл. 264–265°C (сублимация при 195–200°C), $[\alpha]_D^{20} 115.0^\circ$ (*c* 1.0; C₅H₅N).

Бензил-2-ацетиамидо-4,6-*O*-бензилиден-2-дезокси-3-*O*-[(*R*)-1-карбоксиэтил]- α -*D*-глюкопиранозид (IX). При 100°C в 100 мл абсолютного диоксана диспергировали 4.6 г металлического натрия, интенсивно перемешивая смесь с помощью мешалки Гершберга. Затем к суспензии прибавляли

* Отяеснение может быть обратным.

8 г 4,6-*O*-бензилиденового производного (VIII) и перемешивали еще 1 ч при 90–95°C. К охлажденной до 60–65°C смеси прибавляли 5 г (1.9 экв.) (*S*)-2-хлорпропионата натрия и перемешивали 3 ч при этой температуре. В реакционную смесь после охлаждения добавляли постепенно 15 мл метанола и затем 600 мл воды. Раствор подкисляли 6 н. HCl до pH 2. Осадок целевого производного (IX) отфильтровывали, высушивали и перекристаллизовывали из смеси хлороформ–метанол (50 : 1). Т. пл. 241–243°C, $[\alpha]_D^{20}$ 102.0° (с 0.89; MeOH), лит. [6]: т. пл. 264–265°C (сублимация при 230–233°C), $[\alpha]_D^{20}$ 103.0° (с 0.89; MeOH).

2-Ацетидамо-4,6-ди-*O*-ацетил-2-дезоксид-3-*O*-[(*R*)-1-(метоксикарбонил)этил]- α -*D*-глюкопираноза (XI). Раствор 2 г производного (IX) в 10 мл этанола обрабатывали избытком эфирного раствора диазометана (контроль ТСХ, система а). После упаривания полученный метиловый эфир растворяли в 30 мл 60% водной уксусной кислоты и нагревали на кипящей водяной бане до удаления бензилиденовой защиты (контроль ТСХ, система б). Раствор упаривали, сиропообразный остаток обрабатывали 15 мл смеси уксусный ангидрид–пиридин (1 : 1). Избыток ацетилирующей смеси удаляли путем соупаривания с толуолом. Продукт очищали с помощью КХ (система А). Полученное вещество растворяли в 15 мл ледяной CH₃COOH, добавляли 0.3 мл насыщенного раствора HCl в диоксане и гидрировали над палладиевой чернью (100 мг). После завершения гидрогенолиза растворитель удаляли, остаток подвергали колоночной хроматографии (система В) и кристаллизовали из смеси хлороформ–диэтиловый эфир. Получено 850 мг (51%) соединения (XI), $[\alpha]_{546}^{18}$ +86° (с 2.0; CHCl₃). Т. пл. 175–177°C (с разл.), ИК (ν , см⁻¹): 3330 (ν_{N-H} ассоц.), 3200 (ν_{O-H} ассоц.) 2970 ($\nu_{CH_3}^a$), 2890 ($\nu_{CH_3}^s$), 1750, 1720 ($\nu_{C=O}$ сл. эф.), 1660 ($\nu_{C=O}$ амид I), 1570 ($(\nu_{C-N} + \delta_{N-H})$ амид II), 1230 (ν_{C-O-C} сл. эф.). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 1.35 д (3H, J 7, CH₃CH), 2.04 с (3H), 2.06 с (3H), 2.09 с (9H, NAc + OAc), 3.77 с (3H, COOCH₃), 3.78 м (1H, H2), 3.80 т (1H, J_{H4,H3} = J_{H4,H5} = 9, H4)*, 4.05 м (1H, H5), 4.05 дд (1H, J_{H6a,H6b} 13, H6a), 4.13 дд (1H, J_{H6b,H6a} 13, J_{H6b,H5} 5, H6b), 4.24 к (1H, J 7, CH₂CH), 5.05 дд (1H, J_{H3,H4} = J_{H3,H2} = 9, H3)*, 5.72 д (1H, J_{H1,H2} 9, H1), 7.92 д (1H, J_{NH,H2} 4, NH).

Бутил-2-ацетидамо-4,6-ди-*O*-ацетил-2-дезоксид-3-*O*-[(*R*)-1-(метоксикарбонил)этил]- β -*D*-глюкопиранозид (XIII). К раствору 1.0 г соединения (XI) в 5 мл абсолютного хлороформа добавляли 0.6 мл (3 экв.) тионилхлорида. После завершения реакции (\approx 8 ч, контроль ТСХ, система а) смесь упари-

вали и дважды соупаривали с дихлорэтаном для удаления остатков тионилхлорида. Полученный неочищенный гликозилгалогенид (XII) использовали для гликозилирования *n*-бутанола по способу Гельфериха, для чего соединение (XII) растворяли в 4 мл абсолютного CHCl₃, к раствору добавляли 280 мкл (1.1 экв.) бутанола и 1.406 г (2 экв.) цианида ртути. Смесь перемешивали \approx 12 ч, контролируя ход реакции с помощью ТСХ (система а). Добавляли 50 мл хлороформа, промывали 10% раствором KI, а затем водой. Органическую фазу высушивали безводным сульфатом натрия и упаривали. Остаток подвергали КХ (система А). Выделенный β -бутилгликозид (XIII) кристаллизовали из смеси хлороформ–диэтиловый эфир. Получено 756 мг (67%). $[\alpha]_{546}^{21}$ -0.1° (с 1.3; CH₃OH). Т. пл. 164–164.5°C. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 0.85 т (3H, J 7.6, CH₃CH₂), 1.14 д (3H, J 6.5, CH₃CH), 1.29 кт (2H, J_{CH₂,CH₃} = J_{CH₂,CH₂} = 7, CH₂CH₂CH₃), 1.43 ддт (2H, J_{CH₂,CH₂} = J_{CH₂,CH₂} = J_{CH₂,CH₂} = 7, OCH₂CH₂), 1.77 с (3H, NAc), 2.00 с (3H, OAc), 2.07 с (3H, OAc), 3.41 дт (1H, J_{OCH₂,CH₂} 7, J_{OCH₂,OCH₂} 20, OCH₂), 3.47 дт (1H, J_{OCH₂,CH₂} 7, J_{OCH₂,OCH₂} 20, OCH₂), 3.60 с (3H, OCH₃), 3.66 м (3H, H3* + H2 + H5), 3.94 дд (1H, J_{H6a,H5} 2, J_{H6a,H6b} 12, H6a), 4.10 к (1H, J_{CH,CH₃} 6.5, CHCH₃), 4.11 дд (1H, J_{H6b,H5} 4, J_{H6b,H6a} 12, H6b), 4.44 д (1H, J_{H1,H2} 8, H1), 4.72 дд (1H, J_{H4,H3} = J_{H4,H5} = 10, H4*), 7.83 д (1H, J_{NH,H2} 8, NH).

Бензиловый эфир *N*-{2-*O*-[бутил-2-ацетидамо-4,6-*O*-изопропилиден-2,3-ди-дезоксид- β -*D*-глюкопиранозид-3-ил]-*D*-лактоил}-*L*-аланил-*D*-изоглутамина (XV). К раствору 300 мг бутилгликозида (XIII) в 5 мл абсолютного метанола добавляли раствор метилата натрия в метаноле до pH 9. После завершения деацетилирования (контроль ТСХ, система б) нейтрализовали избытком катионита КУ-2 в H⁺-форме, раствор упаривали, к остатку добавляли 2 мл ацетонитрила, 182 мкл (2 экв.) 2,2-диметоксипропана и 2 мкл насыщенного раствора HCl в диоксане. Смесь нагревали до кипения, ход реакции контролировали с помощью ТСХ (система б). После завершения процесса добавляли каплю пиридина, растворитель упаривали, полученные изопропилиденные производные очищали с помощью КХ (система А). Выделенный продукт растворяли в 3 мл этанола и добавляли при перемешивании 1.24 мл 5% водного раствора КОН (1.5 экв.). Через 2 ч к смеси добавляли избыток катионита КУ-2 в H⁺-форме и интенсивно перемешивали 0.5 ч. Катионит и растворитель удаляли. К раствору кислоты (XIV) в 2 мл абсолютного хлороформа прибавляли 93 мг (1.1 экв.) *N*-гидроксисукцинимиды и 168 мг (1.1 экв.) DCC (кон-

* Отнесение может быть обратным.

* Отнесение может быть обратным.

троль ТСХ, система б). Осадок выделившейся N,N' -дициклогексилмочевины отделяли и к раствору активированного эфира прибавляли 200 мкл (2 экв.) N -метилморфолина, раствор формиата бензильного эфира L -аланил- D -изоглутамин (полученного из 362 мг (1.2 экв.) Вос- L -Ala- D -iGln-OBzl действием 5 мл муравьиной кислоты (3 ч) с последующим упариванием избытка кислоты и двукратным соупариванием с диоксаном) в диоксане. Реакцию контролировали с помощью ТСХ (система в). Растворитель упаривали и гликопептид (XV) выделяли с помощью КХ (система В).

Получено 333 мг (65%). $[\alpha]_{546}^{21} -0.9^\circ$ (c 1.5; CH_3OH). Т. пл. 82–84°C. ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 0.84 т (3H, J 7, CH_2CH_2), 1.19 д (3H, J 6.3, CH_3CH (Lact)), 1.24 д (3H, J 7, CH_2CH (Ala)), 1.26 м (2H, CH_2CH_2), 1.31 с (3H, CH_3C), 1.39 м (2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.45 с (3H, CH_3C), 1.77 с (3H, NAC), 1.78 м (1H, CHCHaHb (iGln)), 2.00 м (1H, CHCHaHb (iGln)), 2.35 дд (2H, $J_{\text{COCH}_2, \text{CHa}} = J_{\text{COCH}_2, \text{CHb}} = 8$, COCH_2 (iGln)), 3.20 м (2H, OCH_2), 3.46 м (1H, H4^*), 3.58 дд (1H, $J_{\text{H3, H4}} = J_{\text{H3, H2}} = 10$, H3^*), 3.68 м (3H, $\text{H2} + \text{H6a} + \text{H5}$), 3.80 дд (1H, $J_{\text{H6a, H6b}} 10.5$, $J_{\text{H6a, H5}} 5.7$, H6b), 3.98 к (1H, J 6.3, CHCH_3 (Lact)), 4.18 ддд (1H, $J_{\text{CH, CHa}} 4.8$, $J_{\text{CH, CHb}} 8$, $J_{\text{CH, NH}} 8$, (iGln)), 4.27 дк (1H, $J_{\text{CH, CH}_3} 7$, $J_{\text{CH, NH}} 7$, CHCH_3 (Ala)), 4.40 д (1H, $J_{\text{H1, H2}} 8.1$, H1), 5.07 с (2H, PhCH_2), 7.10 с (1H, NH_2), 7.27 д (1H, $J_{\text{NH, CH}} 7$, NH (Ala)), 7.33 с (1H, NH_2), 7.35 уш.с (5H, ArH), 7.89 д (1H, $J_{\text{NH, H2}} 9$, NHAc), 8.11 д (1H, $J_{\text{NH, CH}} 8$, NH (iGln)).

N -{2- O -[Бутил-2-ацетиамидо-2,3-дидезокси- β - D -глюкопиранозид-3-ил]- D -лактоил}- L -аланил- D -изоглутамин (XVI). Вещество получено по методике, описанной выше для получения соединения (VI). Целевой гликопептид (XVI) кристаллизовали из смеси этанол-диэтиловый эфир. Получено 133 мг (82%). $[\alpha]_{546}^{21} +1.0^\circ$ (c 1.25; CH_3OH). Продукт разлагается без плавления при 160–170°C.

Изучение воздействия мурамоилпептидов на продукцию антител. Для изучения адъювантной активности синтезированных соединений по отношению к белкам ВИЧ-1 использовались мыши BALB/c (B&K Universal, Stockholm, Sweden). Мышей иммунизировали путем внутримышечного введения 1 мкг gp160 и 100 мкг мурамоилпептида. Иммунизация была повторена троекратно через 14, 40 и 62 сут после первого введения. Мыши были забиты спустя 10 сут после третьей бустерной иммунизации. Контрольная группа получала равную дозу gp160 адсорбированного на геле фосфата алюминия. Уровень продукции антител определяли через 24, 50 и 72 сут после первой бустерной

* Отнесение может быть обратным.

иммунизации с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) [7].

Определение воздействия мурамоилпептидов на репликацию ВИЧ-1. Для изучения влияния мурамоилпептидов на репликацию ВИЧ-1 использовали линию Т-клеток Jurkat-tat. Клетки культивировали в среде RPMJ-1640 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коров, 2 мМ/л глутамин, 100 мкг/мл пенициллина и 100 МЕ/мл стрептомицина. Инфицированные и неинфицированные клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Культуральную жидкость, содержащую вирус ВИЧ-1 штамм LAI (около 20 TCID_{50}^*) (50 мкл на лунку 96-луночного культурального планшета), и соответствующие разведения мурамоилпептидов (до 25 мкл на лунку; разведения готовили на среде RPMJ-1640) одновременно приливали к неинфицированным клеткам (250000 клеток/мл; 200 мкл суспензии на лунку). Использовали концентрации мурамоилпептидов 10 и 2 мкг/мл. Далее клетки экспонировали в присутствии ВИЧ и реагентов до 11 сут. Культуральные жидкости собирали на 3-и, 7-е и 11-е сутки и исследовали на наличие сердцевинного антигена ВИЧ-1 p24 с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) [8]. Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с трипановым синим.

Изучение влияния мурамоилпептидов на пролиферацию Т-клеток. Для изучения воздействия синтезированных мурамоилпептидов на пролиферацию Т-клеток селезенки мышей использовались клетки, изолированные после завершающей иммунизации. Культивация клеток осуществлялась в 96-луночном планшете (Nunc) при плотности 1.5×10^6 клеток/мл в среде RPMI (Gibco, Life Technologies, UK), содержащей 2 мМ/л L -глутамин, 50 мкг/мл стрептомицина, 50 МЕ/мл пенициллина и 10% (объемн.) эмбриональной сыворотки коров. В лунки микропланшета вносили либо баккуловирный рекомбинантный антиген gp160 (MicroGeneSys) по 0.01 мг/лунку, либо контрольный рекомбинантный антиген (MicroGeneSys). Клетки инкубировались в течение 5 сут при 37°C в присутствии 5% CO_2 . [^3H]Тимидин (1 мкКи) добавлялся за 4 ч до отделения клеток от среды. Радиоактивность клеток измеряли с помощью β -сцинтилляционного счетчика. Включение [^3H]тимидина рассчитывали как число импульсов в минуту. Индекс стимуляции определяли как отношение включения [^3H]тимидина для экспериментальных культур и контрольных культур. Фоновая пролиферация контрольных культур изменялась от 80 до 500 имп/мин.

* Доза вируса, вызывающая инфицирование 50% клеток в культуре ткани.

Настоящая работа была выполнена при финансовой поддержке INTAS (грант № INTAS-UKRAINE 95-0055).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baschang G. // *Tetrahedron*. 1989. V. 45. P. 6331–6360.
2. Krivorutchenko Yu.L., Andronovskaya I.B., Hinkula J., Krivoshein Yu.S., Ljungdahl-Stehle E., Pertel S.S., Grishkovets V.I., Zemlyakov A.E., Wahren B. // *Vaccine*. 1997. V. 15. P. 1479–1486.
3. Криворутченко Ю.Л., Андроновская И.Б., Чирва В.Я., Пертель С.С., Гришкова В.И., Земляков А.Е., Курьянов В.О., Кривошеин Ю.С. // *Вопр. вирусол.* 1997. № 1. С. 34–36.
4. Kusumoto S., Yamamoto K., Shiba T. // *Tetrahedron Lett.* 1978. V. 45. P. 4407–4410.
5. Hasegawa A., Kaneda Y., Amano M., Kiso M., Azuma I. // *Agric. Biol. Chem.* 1978. V. 42. P. 2187–2189.
6. Durette P.L., Meitzner E.P., Shen T.J. // *Carbohydr. Res.* 1979. V. 77. P. 1–4.
7. Viscidi R., Ellerback E., Midthun K., Clements M.L., Clayman B., Fernie B., Smith G. // *AIDS Research on Human Retroviruses*. 1990. V. 6. P. 1251–1256.
8. Sundquist V.-A., Albert J., Ohlsson E., Hinkula J., Fenyo E.M., Wahren B. // *Journal of Medical Virology*. 1989. V. 29. P. 170–175.

The Synthesis and Biological Activities of Anomeric Butyl Glycosides of Muramyl Dipeptide

S. S. Pertel^{*#}, A. L. Kadun^{*}, E. S. Kakayan^{*}, V. Ya. Chirva^{*}, Yu. L. Krivorutchenko^{**},
Yu. S. Krivoshein^{**}, A. A. Bakova^{**}, and I. B. Andronovskaya^{***}

^{*}*Frunze State University, Simferopol, ul. Yaltinskaya 4, Simferopol, 333007 Ukraine*

^{**}*Georgievskii Crimean Medical University, Simferopol, Ukraine*

^{***}*Tauvridiyan Institute of Ecology, Simferopol, Ukraine*

The synthesis of anomeric butyl glycosides of muramyl dipeptide was reported. α -Butyl glycoside of *N*-acetyl-*D*-glucosamine was 4,6-*O*-benzylidened and the benzylidene derivative was 3-*O*-alkylated by the Williamson reaction with sodium (*S*)-2-chloropropionate. The resulting protected α -butyl glycoside of muramic acid was then condensed with *L*-Ala-*D*-iGln-OBzl by the DCC-HOSu method. Mild acidic hydrolysis and subsequent catalytic hydrogenolysis of the resulting glycopeptide yielded the target α -butyl glycoside of *N*-acetyl-*L*-alanyl-*D*-isoglutamine. In the synthesis of β -butyl glycoside of *N*-acetylmuramyl-*L*-alanyl-*D*-isoglutamine, 2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy-3-*O*-[(*R*)-1-(methoxycarbonyl)ethyl]- α -*D*-glucopyranose, a 1-OH derivative of muramic acid, was the key compound. Its interaction with the excess thionyl chloride resulted in the corresponding glycosyl halide, which was condensed with *n*-butanol according to Helferich. *O*-Deacetylation, 4,6-isopropylidene, and subsequent alkaline hydrolysis of the resulting compound gave the protected β -butyl glycoside of muramic acid. Its activation and condensation with *L*-Ala-*D*-iGln-OBzl and the subsequent removal of protective groups were performed in the same manner as the reactions in the synthesis of α -butyl glycoside of *N*-acetyl-*L*-alanyl-*D*-isoglutamine. The adjuvant activity of the butyl glycosides to HIV proteins rgp160 and rgp120 and their ability to affect *in vitro* HIV replication and the proliferation of mouse spleen T-cells were examined. The biological activity of anomeric muramyl dipeptides was shown to depend essentially on the configuration of their anomeric center.

Key words: *adjuvants, anomeric butyl glycosides, glycoside synthesis, muramyl peptides, proliferation of T cells, replication of HIV-1, stimulation of antibody production to rgp120 and rgp160*

[#] *To whom correspondence should be addressed; phone: (0652) 23-0320; e-mail: orgchem@ccssu.crimea.ua.*