



УДК 547.963.057

## СИНТЕЗ $\beta$ -ХОЛЕСТЕРИЛГЛИКОЗИДА МЕТИЛОВОГО ЭФИРА N-АЦЕТИЛМУРАМОИЛ-L-АЛАНИЛ-D-ИЗОГЛУТАМИНА

© 1996 г. В. О. Курьянов, А. Е. Земляков, В. Я. Чирва<sup>#</sup>Симферопольский государственный университет,  
333036, Украина, Крым, г. Симферополь, ул. Ялтинская, 4

Поступила в редакцию 06.10.95 г.

Осуществлен синтез  $\beta$ -холестерилгликозида метилового эфира N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина.  $\beta$ -Холестерилгликозид N-ацетилглюкозамина был получен гликозилированием холестерина перацетатом N-фталойлглюкозаминилбромидом по методу Гельфериха с последующим N-деблокированием и реацетилированием. Альтернативно этот гликозид синтезировали, используя в качестве гликозил-донора перацетат  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминилхлорида. Полученная на основе гликозида 4,6-O-изопропилиденмурамовая кислота была конденсирована с L-Ala-D-Glu(OMe)-NH<sub>2</sub>. Удаление изопропилиденной защиты привело к целевому гликопептиду.

*Ключевые слова:*  $\beta$ -холестерилгликозид мурамоилдипептида, мурамоилдипептид (MDP), гликозилирование.

Липофильные производные N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина (MDP), содержащие в качестве липофильных компонентов остатки высших  $\alpha$ -разветвленных карбоновых кислот, природных миколевых кислот, фосфатидилэтаноламина, рекомендованы к применению в качестве адъювантов, стимуляторов неспецифической антиинфекционной резистентности и для иммунотерапии опухолей [1, 2]. К числу подобных перспективных препаратов также относится холестерилловый эфир MDP-L-аланина [3], показавший высокую стимулирующую активность в противоопухолевых тестах [4].

С целью изучения взаимосвязи между строением и биологической активностью гликозидов MDP нами осуществлен синтез  $\beta$ -холестерилгликозида метилового эфира N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина (I). Введение липофильного компонента по гликозидному центру позволяет избежать стадий постановки и удаления временной защиты аномерного гидроксильного, а также обеспечивает большую устойчивость липофильного гликопептида в биологических средах по сравнению с липофильными сложными эфирами.

Традиционный метод образования  $\beta$ -гликозидной связи для N-ацетилглюкозамина (оксазолиновый) оказался малоприменимым для такого объемного агликона с вторичным гидроксильным, как холестерин (Chol-OH). Поэтому спирт гликозилировали N-фталойлглюкозаминилбромидом (II) в присутствии Hg(CN)<sub>2</sub> и HgBr<sub>2</sub> (схема 1). Гликозил-

донор (II) получили действием TiBr<sub>4</sub> на тетраацетат N-фталойлглюкозамина [5]. Для облегчения очистки холестерилгликозида (III) от непрореагировавшего спирта продукт реакции предварительно дезацетилировали и колоночной хроматографией с выходом 33% выделили гликозид (IV). Фталимидную защиту удалили гидразинолизом и полученный продукт реацетилировали. В <sup>1</sup>H-ЯМР-спектре перацетата (V) были идентифицированы сигналы протонов пяти метильных групп и двух скелетных протонов (H\*3 и H\*6) агликона, а также четырех ацетильных групп и скелетных протонов углеводного остатка (см. "Экспериментальную часть").  $\beta$ -Конфигурация гликозидной связи подтверждается наличием однопротонного дублета  $\delta$  4.79 м. д.) с константой расщепления 8.5 Гц.

Альтернативно  $\beta$ -холестерилгликозид (V) был получен из легкодоступного перацетата  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминилхлорида [6] по методу Гельфериха. После дезацетилирования выход соединения (VI) составил 35%. Применение N-ацетильного гликозил-донора вместо N-фталойльного позволяет на пять стадий сократить синтез целевого соединения, что делает такой подход более перспективным.

В <sup>1</sup>H-ЯМР-спектре гликозида (VI) наблюдаются сигналы характеристических протонов агликона и моносахарида (см. "Экспериментальную часть"), сходные с сигналами протонов соединения (V). ИК-спектры и физико-химические константы соединения (VI), полученного по двум схемам, совпали.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

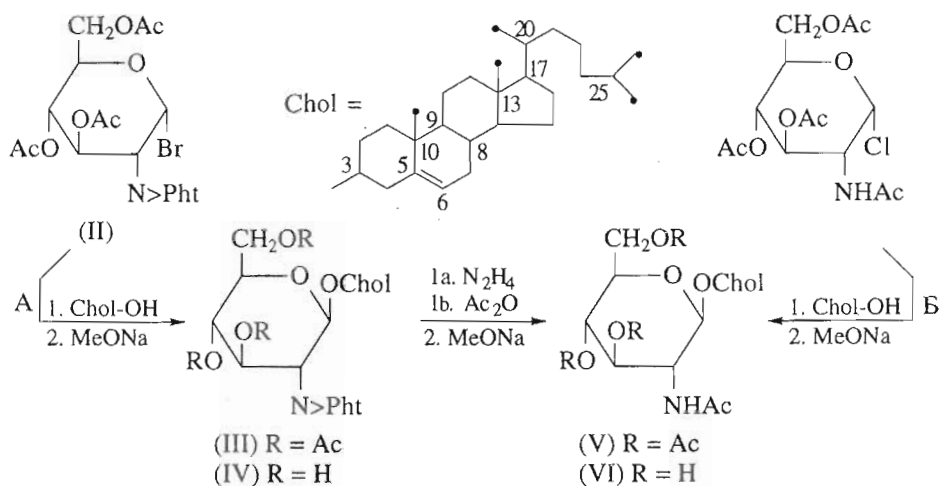


Схема 1.

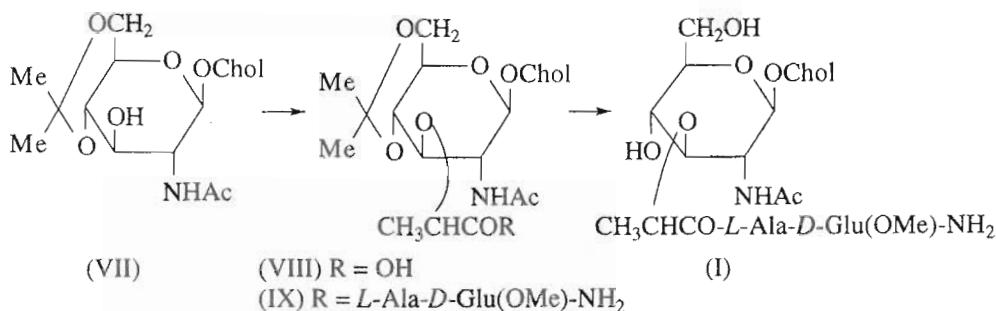


Схема 2.

Дальнейшее изопропилиденирование триола (VI) 2,2-диметоксипропаном с последующим алкилированием свободного гидроксила у С3  $\alpha$ -L-хлорпропионовой кислотой привело к мурамовой кислоте (VIII). Защищенный гликопептид (IX) был получен конденсацией кислоты (VIII) с метиловым эфиром L-аланил-D-изоглутамина по N-оксисукцинимидному методу. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре гликопептида (IX) (см. "Экспериментальную часть") наряду с сигналами протонов углеводной части, которые сопоставимы с сигналами протонов в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах соединений (V) и (VI), идентифицированы сигналы протонов лактоилпептидного фрагмента: два дублета метильных групп остатка молочной кислоты и аланина ( $\delta$  1.37 и 1.43), два синглета  $\text{CONH}_2$ -группы изоглутамина ( $\delta$  5.82 и 6.90), два дублета амидных протонов ( $\delta$  7.46 и 7.48) и синглет метоксильной группы с  $\delta$  3.71. Завершающий кислотный гидролиз изопропилиденной защиты привел к целевому  $\beta$ -холестерилгликозиду MDP (I) (схема 2).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Температуру плавления определяли на приборе ПТП, оптическое вращение при 20–22°C – на поляриметре Polamat-A. Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР получили на

спектрометрах Bruker WP-200 (200 МГц) и Bruker WM-500 (500 МГц), внутренний стандарт –  $\text{Me}_4\text{Si}$ . Приведены химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) и константы спин-спинового расщепления ( $J$ , Гц). ИК-спектры снимали на приборе Specord 75-IR (таблетки KBr). ТСХ проводили на пластинках Silufol UV-254 (Kavalier) в системах растворителей: бензол–этанол, 5 : 1 (А); бензол–ацетон, 3 : 1 (Б); хлороформ–этанол, 15 : 1 (В). Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле L 100–250 мкм (промыт этанолом, высушен при 200°C). Данные элементного анализа для синтезированных соединений соответствуют расчетным значениям.

В работе использовали N,N'-дициклогексилкарбодиимид и молекулярные сита 0.3 нм (Ferak), N-гидроксисукцинимид, 2,2-диметоксипропан, гидрид натрия, цианид ртути(II), бромид ртути(II) (Merck), бромид титана(IV) (Fluka).

**Холестерил-2-дезоксид-2-фталимидо- $\beta$ -D-глюкопиранозид (IV).** Смесь 0.98 г (2.52 ммоль) холестерина, 0.53 г (2.1 ммоль) цианида ртути(II), 0.076 г (2.1 ммоль) бромид ртути(II) и 5 г молекулярных сит 3 Å в 50 мл сухого дихлорэтана перемешивали 3 ч. К смеси добавляли 3,4,6-три-O-ацетил-2-дезоксид-2-фталимидо-D-глюкопиранозилбромид (II)

(получен обработкой 1.0 г (2.1 ммоль) 1,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-2-дезоксид-2-фталимидо-*D*-глюкопиранозы [5] 0.75 г (2.1 ммоль) бромидом титана(IV)). Через 5 ч (контроль ТСХ в системе А) молекулярные сита и соли отфильтровывали. Фильтрат разбавляли 25 мл хлороформа, промывали водой (4 × 25 мл). Органический слой высушивали безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали. Остаток, содержащий холестерин и холестерил-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксид-2-фталимидо- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид (III), растворяли в 30 мл смеси метанол-дихлорметан (2 : 1) и добавляли 1 мл 0.1 н. раствора метилата натрия в метаноле. Через 3 ч раствор нейтрализовали катионитом КУ-2 ( $\text{H}^+$ ), смолу отфильтровывали, промывали 5 мл метанола, фильтрат упаривали. Колоночной хроматографией (элюент – хлороформ) выделяли 0.50 г (33% в расчете на тетраацетат) гликозида (IV); т. пл. 142°C,  $[\alpha]_{546} +6.2^\circ$  (с 0.85; хлороформ),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3450–3250 (ОН), 2950, 2830 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ), 1680 (C=O имид), 690 (аром.).

**Холестерил-2-ацетидамо-2-дезоксид- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид (VI).** А. К раствору 0.50 г (0.67 ммоль) фталимидного производного (IV) в 25 мл этанола добавляли 0.5 мл (10.3 ммоль) гидразингидрата и кипятили с обратным холодильником 2 ч (контроль ТСХ в системе В). Реакционную смесь упаривали досуха и остаток, содержащий холестерил-2-амино-2-дезоксид- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид, ацетилировали 5 мл смеси уксусный ангидрид-пиридин (1 : 1). Аналитический образец холестерил-2-ацетидамо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксид- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид (V) получали кристаллизацией из эфира, т. пл. 206°C,  $[\alpha]_{546} -27^\circ$  (с 0.38; хлороформ),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2900, 2800 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ), 1700 (сл. эфир), 1600, 1500 (амид).  $^1\text{H}$ -ЯМР (200 МГц,  $\text{C}^2\text{HCl}_3$ ): 0.60с и 0.91с (6H, Me-C\*10 и Me-C\*13), 0.79д (6H, Me<sub>2</sub>-C\*25), 0.83д (3H, Me-C\*20), 1.89с, 1.95с, 1.97с, 2.01с (12H, NAc, 3 OAc), 3.40м (1H, H5,  $J_{5,6a}$  4.5,  $J_{5,6b}$  2.5), 3.60м (1H, H\*3), 3.62м (1H, H2,  $J_{2,3}$  10), 4.03дд (1H, H6a), 4.19дд (1H, H6b,  $J_{6a,6b}$  12), 4.79д (1H, H1,  $J_{1,2}$  8), 4.98дд (1H, H4,  $J_{4,5}$  9.5), 5.29д (1H, H\*6), 5.33дд (1H, H3,  $J_{3,4}$  9.5), 5.47д (1H, NH,  $J_{2,NH}$  8.5).

К раствору 0.48 г (0.67 ммоль) перацетата (V) в 20 мл смеси метанол-дихлорметан добавляли 1 мл 0.1 н. раствора метилата натрия в метаноле. Через 3 ч фильтрат нейтрализовали катионитом КУ-2 ( $\text{H}^+$ ), смолу отфильтровывали, промывали 5 мл метанола и фильтрат упаривали. Получали 305 мг (75%) соединения (VI); т. пл. 172–174°C,  $[\alpha]_{546} -15.5^\circ$  (с 0.67; хлороформ-этанол, 3 : 1),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3460–3300 (ОН), 2920, 2850 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ), 1620, 1549 (амид).  $^1\text{H}$ -ЯМР (500 МГц,  $\text{C}^2\text{HCl}_3$  –  $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}_2\text{H}$ ): 0.44с и 0.75с (6H, Me-C\*10 и Me-C\*13),

0.62д (6H, Me<sub>2</sub>-C\*25), 0.68д (3H, Me-C\*20), 1.75с (3H, NAc), 3.03м (1H, H5,  $J_{5,6a}$  5,  $J_{5,6b}$  2.5), 3.11м (1H, H\*3), 3.16т (1H, H4,  $J_{4,5}$  9), 3.27м (2H, H2 и H3,  $J_{3,4}$  9), 3.50дд (1H, H6a), 3.61дд (1H, H6b,  $J_{6a,6b}$  12), 4.34д (1H, H1,  $J_{1,2}$  8), 5.10д (1H, H\*6).

Б. Смесь 1.0 г (2.58 ммоль) холестерина, 0.84 г (3.3 ммоль) цианида ртути(II), 0.1 г (0.2 ммоль) бромидом ртути(II) и 5 г молекулярных сит 3 Å в 50 мл сухого дихлорэтана перемешивали 3 ч, добавляли 0.86 г (2.36 ммоль) 2-ацетидамо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксид- $\alpha$ -*D*-глюкопиранозилхлорида [6] и выдерживали 10 сут (контроль ТСХ в системе Б). Молекулярные сита и соли отфильтровывали. Фильтрат разбавляли 25 мл хлороформа, промывали водой (4 × 25 мл). Органический слой высушивали безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали. Остаток дезацетилировали по Земплону как описано для соединения (IV) и колоночной хроматографией (элюент – хлороформ → хлороформ-этанол, 5 : 1) выделяли 0.5 г (35%) гликозида (VI).

**Холестерил-2-ацетидамо-2-дезоксид-4,6-*O*-изопропилиден- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид (VII).** 275 мг (0.45 ммоль) триола (VI) растворяли в 25 мл тетрагидрофурана при нагревании до 60°C, добавляли 0.2 мл (1.63 ммоль) 2,2-диметоксипропана и 20 мг сухой TsOH. Через 1 ч (контроль ТСХ в системе А) реакционную смесь нейтрализовали пиридином и упаривали. Остаток растворяли в 50 мл хлороформа, промывали водой (3 × 25 мл). Органический слой высушивали безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали досуха. Кристаллизацией из смеси гексан-эфир получали 220 мг (63%) ацетала (VII); т. пл. 157–160°C,  $[\alpha]_{546} -57.8^\circ$  (с 1.15; хлороформ),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2920, 2840 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ), 1620, 1530 (амид), 850 ( $\text{Me}_2\text{C}$ ).

**Холестерил-2-ацетидамо-2-дезоксид-4,6-*O*-изопропилиден-3-*O*-(*D*-1-карбоксиэтил)- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид (VIII).** Суспензию 100 мг (0.15 ммоль) ацетала (VII) и 20 мг гидрида натрия (0.66 ммоль; 80% эмульсия в масле) в 10 мл диоксана нагревали до 90°C, выдерживали при этой температуре 1 ч, охлаждали до 65°C и добавляли 0.03 мл (0.35 ммоль)  $\alpha$ -*L*-хлорпропионовой кислоты. Через 4 ч (контроль ТСХ в системе А) реакционную смесь охлаждали, избыток гидрида натрия разлагали добавлением этанола. Реакционную смесь выливали в 50 мл холодной воды, подкисляли 1 н. HCl до pH 2–3. Выпавшую кислоту экстрагировали хлороформом (2 × 50 мл). Органический слой высушивали безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Перекристаллизацией из водного ацетона получали 108 мг (97%) кислоты (VIII); т. пл. 146–148°C,  $[\alpha]_{546} -17.5^\circ$  (с 0.65; хлороформ),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2910, 2840 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ), 1710 (COOH), 1640, 1520 (амид), 850 ( $\text{Me}_2\text{C}$ ).

\* Отмечены атомы холестерильного остатка.

**Метилловый эфир О-(холестерил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-4,6-О-изопротилден-β-D-гликопиранозид-3-ил)-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (IX).** К раствору 110 мг (0.15 ммоль) кислоты (VIII) в 5 мл тетрагидрофурана добавляли 21 мг (0.18 ммоль) N-гидроксисукцинимид и 37 мг (0.18 ммоль) DCC. Через 3 ч (контроль ТСХ в системе А) отфильтровывали осадок дициклогексилмочевины, промывали его 3 мл растворителя и к фильтрату добавляли раствор трифторацетата метилового эфира L-аланил-D-изоглутамин (получен обработкой 52 мг (0.16 ммоль) соответствующего N-Вос-производного 2 мл трифторуксусной кислоты с последующим упариванием досуха) в 3 мл тетрагидрофурана и триэтиламина до pH 8. Через 2 ч реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 50 мл хлороформа, промывали водой (3 × 25 мл). Органический слой высушивали безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Получали 125 мг (88%) аморфного гликопептида (IX); [α]<sub>546</sub> -7.4° (с 0.85; хлороформ). ν (см<sup>-1</sup>): 3300 (NH<sub>2</sub>, NH), 2910, 2820 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>), 1720 (сл. эфир), 1650, 1610, 1560 (амид), 840 (Me<sub>2</sub>C). <sup>1</sup>H-ЯМР (500 МГц, С<sup>2</sup>HCl<sub>3</sub>): 0.68с и 0.99с (6H, Me-C\*10 и Me-C\*13), 0.87д и 0.88д (6H, Me<sub>2</sub>-C\*25), 0.92д (3H, Me-C\*20), 1.37д и 1.43д (6H, 2 MeCH, J<sub>Me,CH</sub> 7), 1.40с и 1.49с (6H, Me<sub>2</sub>C), 1.98с (3H, NAc), 3.71с (3H, COOMe), 4.16к (1H, CHMe), 4.32м (1H, CH Ala), 4.48м (1H, CH Glu), 4.96д (1H, H1, J<sub>1,2</sub> 8), 5.35д (1H, H\*6), 5.82с и 6.90с (2H, CONH<sub>2</sub>), 6.57д, 7.46д и 7.48д (3H, 3NH).

**Метилловый эфир О-(холестерил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-гликопиранозид-3-ил)-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамин (I).** 90 мг (0.096 ммоль) изопротилденевого производного (IX) растворяли при нагревании в кипящей водяной бане в 3 мл 80% уксусной кислоты. Через 30 мин (контроль ТСХ в системе В) реакционную смесь упаривали досуха и кристаллизацией из эфира получали 70 мг (81%) соединения (I); т. пл. 197°C (с разл.), [α]<sub>546</sub> -9.8° (с 0.85; этанол). ν (см<sup>-1</sup>): 3400-3300 (OH, NH<sub>2</sub>, NH), 2910, 2820 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>), 1720 (сл. эфир), 1640, 1550 (амид).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ледерер Э. // Перспективы биоорганической химии и молекулярной биологии / Ред. Ю.А. Овчинников. М.: Наука, 1986. С. 294-298.
2. Baschang G. // Tetrahedron. 1989. V. 45. P. 6331-6360.
3. Tenu J.P., Bernard I.M., Petit J.F., Phillips N. Пат. 2557758 Франция. // Chem. Abstr. 1986. V. 104. 19825k.
4. Barratt G.M., Yu W.P., Fessi H., Devissaguet J.Ph., Petit J.F., Tenu J.P., Israel L., Morere J.F., Puisieux F. // Cancer J. 1989. V. 2. P. 439-443.
5. Grundler G., Schmidt R.S. // Carbohydr. Res. 1985. V. 135. P. 203-218.
6. Хортон Д. // Методы исследования углеводов / Ред. А.Я. Хорлин. М.: Мир, 1975. С. 221-224.

## Synthesis of β-Cholesterylglycoside of N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamine Methyl Ester

V. O. Kur'yanov, A. E. Zemlyakov, and V. Ya. Chirva<sup>1</sup>

Simferopol' State University, ul. Yaltinskaya 4, Simferopol', 333036 Ukraine

**Abstract**—β-Cholesterylglycoside of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine methyl ester was synthesized. N-Acetylglucosamine β-cholesterylglycoside was obtained by glycosylation of cholesterol with peracetate of N-phthaloylglucosaminyl bromide using the Helferich method followed by N-deprotection and reacylation. Alternatively, this glycoside was synthesized using peracetate of α-N-acetylglucosaminyl chloride as a glycosyl donor. 4,6-O-Isopropylidenemuramic acid prepared from the glycoside was coupled with L-Ala-D-Glu(OMe)-NH<sub>2</sub>. The target glycopeptide was obtained by the removal of isopropylidene protection.

*Key words:* muramyl dipeptide β-cholesteryl glycoside, muramyl dipeptide, glycosylation.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.