

## SYNTHÈSE DE LA N-ACÉTYLMURAMYL (OXO- $^{14}\text{C}$ -PROPYL)-L-ALANYL-D-ISOGLUTAMINE (MDP- $^{14}\text{C}$ )

L. PICHAT, J. TOSTAIN, P. LEFRANCIER<sup>+</sup>, P. SINAY<sup>\*</sup> et E. LEDERER<sup>\*\*</sup>

Service des Molécules Marquées - Bât. 47 - Département de Biologie  
C.E.N.-SACLAY - B.P. No 2 - F 91190 GIF SUR YVETTE

+ Institut CHOAY - F 92120 MONTROUGE

\* Laboratoire de Biochimie Structurale, E.R.A. 739  
U.E.R. de Sciences Fondamentales et Appliquées, F 45045 ORLEANS CEDEX

\*\* Institut de Chimie des Substances Naturelle - C.N.R.S.-GIF/YVETTE  
F 91190 GIF SUR YVETTE

### ABSTRACT

SYNTHESIS OF N-ACETYLMURAMYL ( $^{14}\text{C}$ -OXOPROPYL)-L-ALANYL-D-ISOGLUTAMINE  
( $^{14}\text{C}$  - MDP)

Condensation of (1- $^{14}\text{C}$ ) DL-2-bromopropionic acid with benzyl 2-acetamido-4,6-O-benzylidene-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside 7 in presence of sodium hydride gave 50 % of crystalline compound 3, having the correct stereochemistry of natural muramic acid. The latter, in presence of Woodward's reagent, reacted with L-alanyl-D-isoglutamine benzyl ester hydrochloride, leading to compound 4. Removal of benzylidene and benzyl groups by successive acetic acid exposure and hydrogenolysis gave rise to 2-acetamido-2-deoxy-3-O (2-D- $^{14}\text{C}$ ) propionyl-L-alanyl-D-isoglutamine)-D-glucopyranose ( $^{14}\text{C}$ -MDP). Specific activity : 42 mCi/mMole in a 10 % overall yield based on sodium (1- $^{14}\text{C}$ ) propionate.

La N-acétyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) 6 est la plus petite molécule immunoadjuvante pouvant remplacer les mycobactéries entières dans l'adjuvant de Freund (1) ; la première synthèse en a été effectuée par Merser et al. (2). Ensuite, d'autres synthèses de MDP et de ses analogues ont été décrites par Kusumoto et al. (3) et Lefrancier et al. (4,5).

Le MDP est adjuvant, dans l'eau en absence d'huile minérale (6) et même par voie orale (7). Le MDP et ses analogues autorisent des expérimentations uniques in vivo et in vitro, en immunologie humorale et cellulaire (pour une revue récente voir 8). Pour faciliter l'étude du mécanisme d'action, de son métabolisme et de sa pharmacocinétique, nous avons réalisé dès 1975 la synthèse du MDP marqué au carbone 14 sur la fonction oxo du groupe propyle de la partie muramyle 6. Dans l'intervalle, Shiba et al. ont publié une synthèse du MDP marqué au carbone 14 uniformément sur le groupe L-alanyle (9). Nous rapportons notre travail qui conduit au MDP à haute activité spécifique.

Le schéma réactionnel suivi I est celui de Merseur et Sinay (2). L'acide DL-bromo-2 propionique  $^{14}\text{C}$ -1 préparé selon Ostwald et al. (10) par bromuration du propionate de sodium  $^{14}\text{C}$ -1 est condensé sur le dérivé sodé de l'acétamido-2 benzylidène 0-4,6-désoxy-2- $\beta$ -D-glucopyranoside de benzyle 7. Comme l'avait démontré Osawa et Jeanloz (11) dans un cas analogue, la réaction est fortement stéréosélective. On évite donc la préparation pénible de l'isomère optiquement actif de l'acide bromopropionique  $^{14}\text{C}$ . Le rendement global en acétamido-2 benzylidène 0-4,6 (D-carboxy  $^{14}\text{C}$ -1-éthyl)-0-3-désoxy-2- $\beta$ -D-glucopyranoside de benzyle 3 est de 50 % par rapport au propionate de sodium  $^{14}\text{C}$ -1.

Le composé 3 est condensé avec le chlorhydrate de l'ester benzylque de la L-alanyl-D-isoglutamine selon Woodward et al. (12) et Merseur et Sinay (2) pour conduire au composé 4. Ce dernier, traité par l'acide acétique à 60 %, fournit le composé 5. Celui-ci, hydrogéné dans l'acide acétique en présence de palladium sur charbon, conduit au MDP (oxo  $^{14}\text{C}$  propyl) 6 d'activité spécifique 42 mCi/mMole avec un rendement global de 10 %, en produit pur, par rapport au propionate de sodium  $^{14}\text{C}$ -1. La pureté radiochimique contrôlée par chromatographie sur papier a été trouvée supérieure à 98 % dans trois systèmes de solvants de chromatographie. Les premiers résultats obtenus avec cette préparation de MDP, après administration à des souris, sont décrits par Parant et al. (15).

## PARTIE EXPERIMENTALE

### I - ACIDE DL-BROMO-2 PROPIONIQUE $^{14}\text{C}$ -1

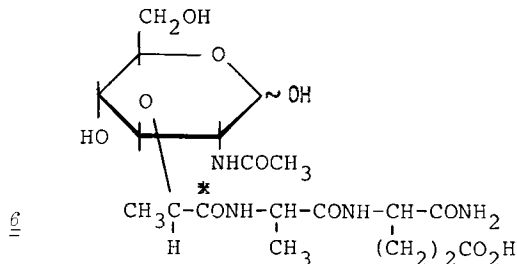
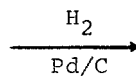
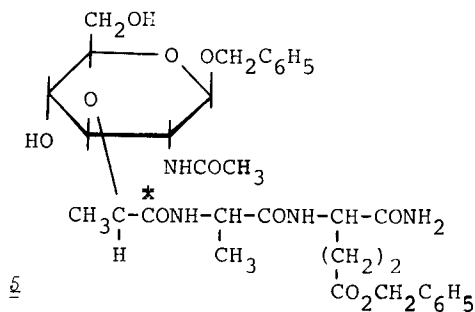
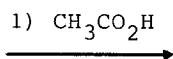
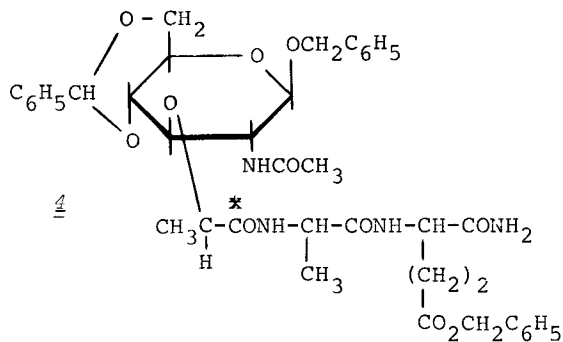
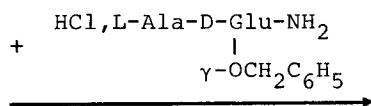
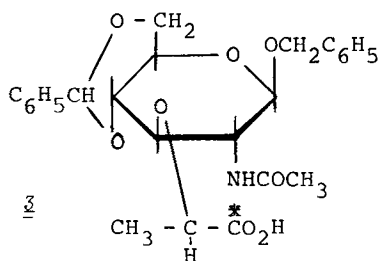
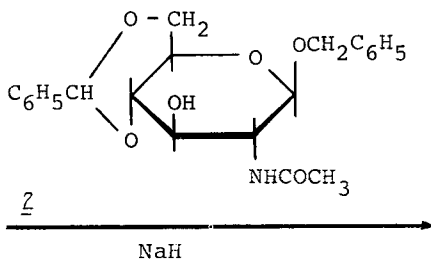
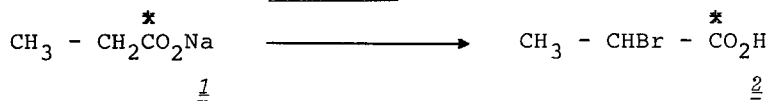
#### a) Acide propionique $^{14}\text{C}$ -1 : 1

A 2 mMoies (# 100 mCi) de propionate de sodium desséché par chauffage à 130° C sous vide pendant 3 heures, on transfère sur rampe à vide 4 mMoies de HCl gazeux sec. Les réactifs sont laissés en présence pendant 3 heures. Le ballon contenant les produits est refroidi à - 80° C, l'excès de HCl étant éliminé sous vide.

#### b) Acide DL-bromo-2 propionique $^{14}\text{C}$ -1 : 2

A 2 mMoies d'acide propionique 1, on ajoute 8 mg de phosphore rouge, 4 mg d'iode et 0,37 mMoies de chlorure de propionyle. On chauffe pendant 10 mn à 100° C, puis on transfère sous vide 0,27 ml de brome préalablement séché sur  $\text{P}_2\text{O}_5$ . On chauffe le mélange réactionnel à 100° C pendant 3 heures. L'excès de brome est ensuite éliminé sous vide. L'acide 2 est extrait à l'éther et lavé avec très peu d'eau. L'éther est distillé. Une nouvelle distillation azéotropique avec 100 mL de dichlorométhane permet d'obtenir 2 suffisamment anhydre pour l'opération suivante.

SCHEMA I



La pureté radiochimique contrôlée en CPV sur silicone OVI à 125° C en présence d'un échantillon inactif témoin est de 98 %.

II - ACETAMIDO-2 BENZYLIDENE O-4,6 (D-CARBOXY-1-<sup>14</sup>C ETHYL)-O-3 DESOXY-2 β-D-GLUCOPYRANOSIDE DE BENZYLE : 3

800 mg (# 2 mMoles) du composé 7 sont dissous à 90° C dans 65 mL de dioxanne anhydre et dépéroxydé. Après addition de 560 mg d'une suspension à 50 % d'hydrure de sodium dans l'huile, le mélange est agité pendant 2 heures à 90° C. En boîte à gants, on ajoute l'acide DL-bromo-2 propionique <sup>14</sup>C-1 en solution dans 10 mL de dioxanne anhydre. Au bout de 2 heures, on fait une seconde addition de 560 mg d'hydrure de sodium en suspension dans l'huile. Le mélange est agité pendant 16 heures à 65° C. Après refroidissement, on ajoute 50 mL d'eau. Le dioxanne est évaporé sous vide. Le résidu est dilué avec 50 mL d'eau. La solution aqueuse est extraite du chloroforme. La phase aqueuse étant refroidie à 0° C, on l'acidifie par addition de HCl 2,5 M jusqu'à pH = 3. Le produit 3 précipité est essoré, lavé avec de l'eau froide puis dissous dans du méthanol bouillant. Après cristallisation dans le méthanol, on obtient 50 mCi de composé 3. La pureté radiochimique contrôlée par radiochromatographie sur couche mince de silice Merck 60, solvant : chloroforme = 80, méthanol = 20 (v/v) est ≥ 98 %. L'activité spécifique déterminée par spectrométrie de masse est de 46 mCi/mMole.

III - ACETAMIDO-2 BENZYLIDENE O-4,6 DESOXY-2 (D-PROPIONYL-2-<sup>14</sup>CO-L-ALANYL-D-ISOGUTAMINATE DE BENZYLE) O-3 β-D-GLUCOPYRANOSIDE DE BENZYLE : 4

Une solution de 38 mCi (# 0,82 mMole) de 3 dans 13 mL du mélange CH<sub>3</sub>CN-DMF (2:1) v/v contenant 0,82 mMole de triéthylamine est versée dans une suspension maintenue à 0° C de 209 mg de réactif K de Woodward (N-ethyl-5-phénylisoxazolium-3' sulfonate) dans 13 mL d'acétonitrile. Le mélange est agité à 0° C pendant 1 h 30. Une solution de 284 mg (# 0,82 mMole) de chlorhydrate de l'ester benzylique de la L-alanyl-D-isoglutamine dans 13 mL du mélange de CH<sub>3</sub>CN-DMF contenant 0,82 mMole de triéthylamine est alors ajoutée. Après 15 heures d'agitation à la température ambiante, les solvants sont évaporés sous vide. Le résidu est extrait à l'eau chaude, filtré et séché. Il est utilisé sans purification pour l'étape suivante. L'évolution de la réaction est contrôlée par radiochromatographie sur couche mince de silice Merck 60 dans le solvant : CHCl<sub>3</sub> = 80, Méthanol = 20 (v/v).

IV - ACETAMIDO-2 DESOXY-2 (D-PROPIONYL-2-<sup>14</sup>CO-L-ALANYL-D-ISOGUTAMINATE DE BENZYLE)-O-3 β-D-GLUCOPYRANOSIDE DE BENZYLE : 5

Le composé 4 est mis en suspension dans 20 mL d'acide acétique à 60 %. On chauffe pendant 1 heure à 100° C. Après refroidis-

sement de la solution, l'acide acétique est évaporé sous vide. Le produit brut est purifié sur une colonne de gel de silice Merck prête à l'emploi type B, solvant : Chloroforme = 85, Méthanol = 15 (v/v). On obtient 10 mCi de produit pur 5.

V - ACETAMIDO-2 DESOXY-2 (D-PROPIONYL-2 <sup>14</sup>CO-L-ALANYL-D-ISOGLUTAMINE)-0-3 D-GLUCOPYRANOSE (<sup>14</sup>C-MDP) : 6

Le produit 5 est hydrogéné catalytiquement à la pression atmosphérique pendant 6 heures dans 25 mL d'acide acétique glacial en présence de 65 mg de Palladium sur charbon à 10 %. Après filtration, la solution est évaporée à sec sous vide. Le produit en solution aqueuse est purifié sur gel de Séphadex G 10 avec élution à l'eau. La pureté radiochimique, contrôlée par radiochromatographie sur papier Whatman n° 1 dans les systèmes de solvants (n-Propanol : 70, Eau = 30 ; Pyridine = 50, n-Butanol = 50, Eau = 50 ; n-Butanol = 50 Eau = 20, acide acétique = 10), est supérieure à 98 %. Sur les radiochromatogrammes, le produit présente un R<sub>F</sub> identique à celui d'un témoin révélé à l'aide du réactif de Sharon (13) et à l'aide de nitrate d'argent selon Trevelyan et al. (14).

L'activité totale est de 8 mCi et l'activité spécifique de 42 mCi/mMole.

#### REFERENCES

- 1 - ELLOUZ F., ADAM A., CIORBARU R. et LEDERER E. - Biochem. Biophys. Res. Comm. 59 : 1317 (1974)
- 2 - MERSER C., SINAY P. et ADAM A. - Biochem. Biophys. Res. Comm. 66 : 1316 (1975)
- 3 - KUSUMOTO S., TARUMI Y., IKENAKA K. et SHIBA T. - Bull. Chem. Soc. Japan 49 : 533 (1976)
- 4 - LEFRANCIER P., CHOAY J., DERRIEN M. et LEDERMAN I. - Intern. J. Peptide and Protein Res. 9 : 249 (1977)
- 5 - LEFRANCIER P., DERRIEN M., LEDERMAN I., NIEF F., CHOAY J. et LEDERER E. - Intern. J. Peptide Protein Res., (1978, sous presse)
- 6 - AUDIBERT F., CHEDID L., LEFRANCIER P. et CHOAY J. - Cell. Immunol. 21 : 243 (1976)
- 7 - CHEDID L., PARANT M. et PARANT F. - C.R. Acad. Sci. Paris, série D, 284 : 405 (1977)
- 8 - L. CHEDID et E. LEDERER, Biochem. Pharmacol., (1978, sous presse)
- 9 - KUSUMOTO S., IKENAKA K. et SHIBA T. - Tetrahedron Letters 46 : 4055 (1977)
- 10 - OSTWALDR., ADAMSP.T. et TOLBERT B.M. - J. Am. Chem. Soc. 74 : 2425 (1952)
- 11 - OSAWA T. et JEANLOZ R.W. - J. Org. Chem. 30 : 448 (1965)

- 12 - WOODWARD R.B., OLOFSON R.A. et MAYER H. - Tetrahedron, Suppl. 8 : 321 (1966)
- 13 - SHARON N. et SEIFTER S. - J. Biol. Chem. 239 : PC 2398 (1964)
- 14 - TREVELYAN W.E., PROCTER D.P. et HARRISON J.S. - Nature 166 : 444 (1950)
- 15 - PARANT M., PETIT J.F. YAPO A., CHEDID L. et LEDERER E. Int. & J. Immunopharmacology (sous presse)