



УДК 547.598.458.22.466.057

© 1994 Л. А. Балтина, С. А. Рыжова, Е. В. Васильева,  
Г. А. Толстикова, Г. М. Сахаутдинова, Ф. С. Зарудий

ТРАНСФОРМАЦИИ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ  
VIII.\* СИНТЕЗ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ГЛИКОПЕПТИДОВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *трет*-БУТИЛОВЫХ ЭФИРОВ АМИНОКИСЛОТ

Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Уфа

Ключевые слова: глицирризиновая кислота, гликопептиды, синтез, *трет*-бутиловые эфиры, аминокислоты, иммуномодулирующие свойства.

С применением *трет*-бутиловых эфиров *L*-аминокислот синтезированы иммуномодулирующие тритерпеновые гликопептиды — производные глицирризиновой кислоты. Конденсацию гликозида с эфирами аминокислот проводили с помощью *N*-гидроксисукцинимидов — *N*, *N'*-дициклогексилкарбодиимидов или *N*-гидроксibenзотриазола — *N*, *N'*-дициклогексилкарбодиимидов в присутствии основания. Защитные группы удаляли трифторуксусной кислотой. Два соединения в дозе 2 мг/кг стимулировали выработку антителообразующих клеток у мышей.

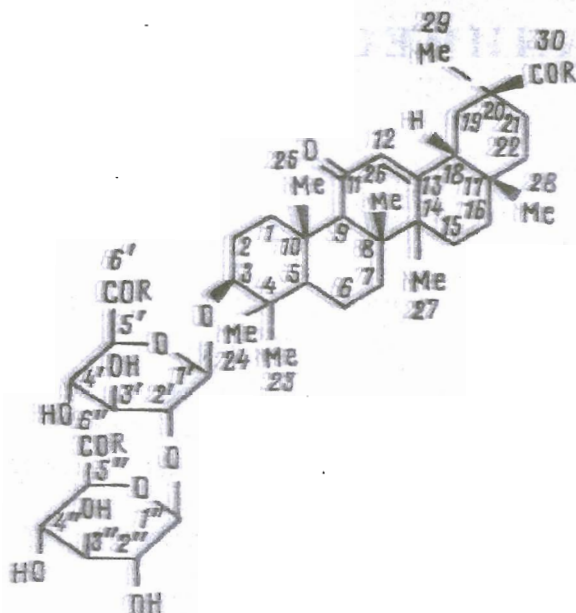
Тритерпеновые гликопептиды — производные глицирризиновой кислоты (ГА) (I) представляют интерес для медицины в качестве противовоспалительных, иммуностимулирующих и антивирусных веществ [1—4].

Ранее нами был предложен синтез тритерпеновых гликопептидов с применением метиловых и бензиловых (*n*-нитробензиловых) эфиров аминокислот [1, 2, 5, 6].

Продолжая работы по синтезу этих производных ГА, мы получили ряд соединений (IIа—ж) с использованием *трет*-бутиловых эфиров *L*-аминокислот. Применение последних значительно упрощает деблокирование целевых соединений (II), которое достигается их обработкой трифторуксусной кислотой в течение 0,5—1 ч.

Конденсацию ГА (I) с эфирами аминокислот проводили с помощью *N*-гидроксисукцинимидов (HDSu), *N*, *N'*-дициклогексилкарбодиимидов (DCC) или *N*-гидроксibenзотриазола (HOBT)—DCC в присутствии основания (триэтиламина, *N*-метил- или этилморфолинов). Выход защищенных гликопептидов при втором варианте конденсации оказался выше и составил 59—73%, тогда как в первом — 48—60%. Деблокированные продукты (IIа—ж) были выделены в аналитически чистом виде хроматографией на колонках с силикагелем с выходами 39—47%.

\* Сообщение VII см. [1]. Использованы сокращения: АОК — антителообразующая клетка, ГЭТ — гиперчувствительность замедленного типа; MDP — мурамилдипептид, ГА — глицирризиновая кислота. Все использованные аминокислоты — *L*-ряда.



(Ia) R - OH;

(IIa) R - Leu(OBu<sup>t</sup>);

(IIIb) R - Val(OBu<sup>t</sup>);

(IIIa) R - Ile(OBu<sup>t</sup>);

(IIIr) R - Pro(OBu<sup>t</sup>);

(IIIд) R - Met(OBu<sup>t</sup>);

(IIIж) R - Phe(OBu<sup>t</sup>);

(IIIa) R - Leu; (IIIб) R - Val;

(IIIв) R - Ile; (IIIr) R - Pro;

(IIIд) R - Met; (IIIж) R - Phe.

При обработке защищенных гликопептидов трифторуксусной кислотой, по-видимому, происходит частичное разложение гликозида (разрыв связи с агликоном или отщепление глюкуронового остатка), поэтому для очистки деблокированных продуктов была необходима хроматография.

Строение полученных соединений подтверждено данными элементного анализа, ИК-, УФ- и <sup>13</sup>C-ЯМР-спектрами (табл. 1, 2).

Отнесение сигналов C-атомов в спектрах <sup>13</sup>C-ЯМР гликопептидов (III) сделано на основании литературных данных для гликозида (I) и сло гликопептидов [6, 7]. Спектры <sup>13</sup>C-ЯМР-соединений (IIIа, д, ж) рассмотрены ранее [6].

Изучено влияние гликопептидов (IIIб, в, д) на первичный иммунный ответ у белых беспородных мышей методом Эрне в модификации Каннинггема [8].

Об иммунотропных свойствах соединений судили по количеству антителообразующих клеток (АОК) в селезенке при иммунизации мышей эритроцитами барана. Исследуемые вещества вводили животным внутривенно однократно через 1 сут после иммунизации в дозах 0,5 и 2,0 мг/кг (табл. 3, 4). Таким путем обнаружен эффект стимуляции антителогенеза у гликопептида (IIIв) в дозе 2,0 мг/кг, а соединение (IIIб) незначительно влияло на гуморальный иммунный ответ по сравнению с контролем (табл. 3). Гликопептид (IIIд) в дозе 2,0 мг/кг стимулировал выработку АОК (табл. 4), причем иммуностимулирующее действие препарата в данной дозе аналогично эффекту известного иммуностимулятора — N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамин (MDP).

Влияние соединений (IIIб) и (IIIв) на клеточный иммунитет мышей определяли на модели гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к 2,4-динитрофторбензолу. Как видно из данных табл. 5, гликопептиды (IIIб, в, ж) показали эффект стимуляции клеточно опосредованной реакции в тесте ГЗТ (в ~2 раза по сравнению с контролем) при однократном внутривенном введении в дозах 0,5 и 2,0 мг/кг, однако стимулирующая активность исследованных производных GA была выражена слабее, чем у MDP в дозе 10 мкг/мышь.

Таким образом, новые тритерпеновые гликопептиды GA представляют определенный интерес для дальнейших исследований в качестве иммуномодуляторов.

Химические сдвиги сигналов агликоновой и углеводной частей в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР гликопептидов глицирризиновой кислоты ( $\delta$ , м. д.,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $25^\circ\text{C}$ , 75,5 МГц)

C	(Шб)	(Шв)	(Шг)
C1	40,37	40,33	40,32
C2	27,90	27,62	28,26
C3	90,28	90,34	90,88
C4	40,73	40,69	40,82
C5	56,49	56,42	56,47
C6	18,20	18,48	18,44
C7	33,92	33,84	33,82
C8	44,65	44,65	44,66
C9	63,20	63,16	63,17
C10	38,15	38,10	38,14
C11	202,70	202,67	202,51
C12	129,19	126,93	128,97
C13	171,57	171,34	168,94
C14	46,79	46,79	46,78
C15	27,49	27,42	27,43
C16	28,69	27,42	27,63
C17	33,0	32,98	32,99
C18	48,20	48,20	48,19
C19	42,77	42,46	42,54
C20	44,71	44,92	44,95
C21	32,09	32,04	32,09
C22	38,78	38,67	39,04
C23	28,79	28,45	28,53
C24	16,97	17,03	16,72
C25	17,29	17,28	17,09
C26	19,41	19,36	19,38
C27	23,77	23,88	23,88
C28	29,14	28,79	28,82
C29	29,40	29,22	29,22
C30	178,62	180,47	180,50
C1'	104,85	104,90	105,39
C2'	81,66	81,68	83,83
C3'	76,36	76,31	75,74
C4'	73,76	73,36	72,39
C5'	77,35	77,30	77,26
C6'	171,68	171,39	172,73
C1''	105,0	105,05	106,11
C2''	75,24	75,16	74,83
C3''	76,08	76,06	75,14
C4''	73,76	73,59	72,24
C5''	77,80	77,75	77,64
C6''	172,43	171,45	173,00



Химические сдвиги сигналов аминокислот в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР гликопептидов глицирризиновой кислоты ( $\delta$ , м. д.,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $75,5\text{ МГц}$ )

Соединение	Аминокислотный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
(Шб)	$  \begin{array}{c}  {}^4\text{CH}_3 \\  \diagdown \\  \text{---} \text{C} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{NH} \text{---} \\  \diagup \\  {}^5\text{CH}_3  \end{array}  $ $  \begin{array}{c}  \text{---} \text{CH} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{NH} \text{---} \\    \\  \text{COOH}  \end{array}  $	174,95	58,99	32,25	19,84	18,73	
		174,22	58,90	32,09	19,58	18,49	
		172,78	58,35	31,80	19,46	18,00	
(Шв)	$  \begin{array}{c}  {}^5\text{CH}_3 \text{---} {}^4\text{CH}_2 \text{---} {}^3\text{CH} \text{---} {}^2\text{CH} \text{---} \text{NH} \text{---} \\    \qquad \qquad   \\  \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{COOH}  \end{array}  $	180,48	57,94	39,02	26,55	12,10	16,05
		174,50	57,94	38,88	26,19	12,01	16,05
		172,93	57,65	38,68	26,11	11,84	16,05
(Шг)	$  \begin{array}{c}  {}^4\text{CH}_2 \text{---} {}^3\text{C} \\    \qquad \qquad   \\  {}^5\text{CH}_2 \qquad \qquad \text{CH} \text{---} \text{COOH} \\  \diagdown \qquad \qquad \diagup \\  \qquad \qquad \qquad \text{N}  \end{array}  $	176,0	61,66	30,29	26,31	44,91	
		175,0	61,66	30,19	25,80	44,91	
		173,17	61,26	30,14	25,60	44,58	

Таблица 3

Влияние гликопептидов глицирризиновой кислоты на первичный иммунный ответ у мышей\* (АОК)

Соединение (R)	Доза, мг/кг	АОК на $10^6$ селезеночных клеток
Контроль**		$462 \pm 139$
(Шб) (Val)	2	$469 \pm 81$
(Шв) (Ile)	2	$1115 \pm 234$

\*Число животных в группе 6,  $p < 0,05$ .

\*\* Физиологический раствор.

### Экспериментальная часть

ТСХ проводили на пластинках Silufol (Chemapol, ЧСФР), используя систему растворителей хлороформ — метанол — вода, 45 : 10 : 1 (А), 37 : 10 : 1 (Б), хлороформ — спирт, 7 : 1 (В), 10 : 1 (Г), 4 : 1 (Д). Пятна веществ обнаруживали 20% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты в этаноле (96%) с последующим нагреванием при  $110\text{--}120^\circ\text{C}$  в течение 2—3 мин. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L (40/100 и 100/250 мкм; Chemapol, ЧСФР).

ИК-спектры снимали на спектрофотометрах Specord M80 и UR-20 в пасте с вазелиновым маслом. УФ-спектры записаны на спектрофотометрах Specord M40 и Shimadzu UV-365 в этаноле и метаноле.

Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР снимали на спектрометре Bruker AM-300 с рабочей частотой  $75,7\text{ МГц}$  в  $\text{CD}_3\text{OD}$ , внутренний стандарт — тетраметилсилан.

Температуры плавления определяли на микростолике Voetsius. Оптическую активность измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 241 MC в трубке длиной 1 дм.

Влияние гликопептидов глицирризиновой кислоты на образование АОК у белых беспородных мышей

Соединения	Доза, мг/кг	АОК во всей селезенке	АОК на $10^6$ спленоцитов
(Шд)	0,5	4105±1403	488±174
»	2,0	27429±457	2900±967
(Шж)	0,5	5391±156	267±21
»	2,0	6493±2181	1158±325
MDP	$10^{**}$	15721±1870	2774±418
Контроль*		5739±768	355±29

\* Число животных в группе 7,  $p \leq 0,05$ .

\*\* мкг/мышь.

Таблица 5

Влияние гликопептидов глицирризиновой кислоты на реакцию ГЗТ к 2,4-динитрофторбензолу у беспородных мышей

Соединение	Доза, мг/кг	Отск уха, %
(Шб)	0,5	38,5±11
»	2,0	36,0±7,4
(Шв)	0,5	37,3±16,0
»	2,0	34,0±4,1
(Шд)	2,0	15,2±1,8
(Шж)	2,0	35,0±5,8
MDP	$10^{**}$	51,0±8,3
Контроль*		18,0±3,0

\*  $p \leq 0,05$ .

\*\* мкг/мышь.

Триэтиламин и N-метил(этил)морфолин сушили над КОН и перегоняли. Растворители упаривали в вакууме при 45° С.

Применяли очищенную глицирризиновую кислоту (с содержанием основного вещества ~95%) [2], N,N'-дициклогексилкарбодиимид (Ferak, Германия) и трет-бутиловые эфиры L-аминокислот в виде гидрохлоридов (Reanal, ВНР).

#### Методики получения карбоксизащищенных гликопептидов глицирризиновой кислоты (IIa—ж)

А. К раствору 2 ммоль глицирризиновой кислоты в 30—50 мл диоксана при 0—5° С прибавляли при перемешивании 6,0—7,0 ммоль N-гидроксibenзотриазола, 6,8—8,0 ммоль N,N'-дициклогексилкарбодиимида и смесь перемешивали при охлаждении 1—1,5 ч, а затем 6 ч при 20—22° С. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали и к фильтрату, охлажденному в бане со льдом, прибавляли 8 ммоль гидрохлорида трет-бутилового эфира аминокислоты, 8—10 ммоль основания (триэтиламина, N-метилморфолина) и смесь выдерживали с периодическим перемешиванием 24 ч при 20° С. Смесь выливали в 400 мл холодной воды,



подкисляли лимонной кислотой до pH ~3—4, осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Продукты выделяли переосаждением из ацетона гексаном или из смеси хлороформ — спирт (5 : 1) эфиром.

Б. К раствору 2 ммоль глицирризиновой кислоты в 30—50 мл диоксана или тетрагидрофурана при 0—5° С прибавляли 10—11 ммоль N-гидроксисукцинимид, 6—6,8 ммоль N,N'-дициклогексилкарбодиимида и смесь перемешивали при этой температуре 1,5—3,0 ч, а затем 6—7 ч при 20° С. Смесь оставляли на ночь в холодильнике (4—8° С); осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали и к фильтрату, охлажденному в бане со льдом, прибавляли 6—8 ммоль гидрохлорида *трет*-бутилового эфира аминокислоты, 9—10 ммоль основания (триэтиламина, N-этилморфолина), смесь перемешивали 0,5—1,0 ч при охлаждении, затем выдерживали 24 ч при 20° С с периодическим перемешиванием. Реакционную смесь обрабатывали аналогично способу А либо упаривали растворитель в вакууме при 40—45° С, остаток растворяли в хлористом метиле, промывали последовательно 5% раствором лимонной кислоты, водой, 5% раствором NH<sub>4</sub>OH, водой, сушили органическую фазу MgSO<sub>4</sub> и упаривали растворитель.

3-О-{2-О-[N-(β-D-глюкопиранозилуруноил)-O'-*трет*-бутил-L-лейцин]-N-(β-D-глюкопиранозилуруноил)-O'-*трет*-бутил-L-лейцин}-(3β, 20β)-11-оксо-30-(N-карбонил-O'-*трет*-бутил-L-лейцин)-30-норолеан-12-ен-3-ол (IIa)

а) По методике А из 1,64 г (2 ммоль) глицирризиновой кислоты, 1,0 г (7,4 ммоль) N-гидроксисбензотриазола, 1,4 г (6,8 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимида, 1,79 г (8 ммоль) гидрохлорида *трет*-бутилового эфира L-лейцина, 1,4 мл (10,2 ммоль) триэтиламина в 30 мл диоксана получили 2,05 г (77,1%) гликопептида (IIa), который переосадили из ацетона гексаном. Выход 1,75 г (65,8%). R<sub>f</sub> 0,79 (В). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +45° (с 0,02; MeOH). ИК-спектр, ν, см<sup>-1</sup>: 3600—3200 (ОН, NH), 1740 (COOR), 1665 (C11=O), 1540 (CONH). УФ-спектр, λ<sub>max</sub><sup>MeOH</sup> (lg ε): 251 нм (4,05). Найдено, %: С 64,73; Н 9,40; N 2,73. C<sub>72</sub>H<sub>119</sub>N<sub>3</sub>O<sub>19</sub>. Вычислено, %: С 64,97; Н 9,03; N 3,16.

б) По методике Б из 1,64 г (2 ммоль) глицирризиновой кислоты, 1,2 г (10,4 ммоль) N-гидроксисукцинимид, 1,4 г (6,8 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимида, 1,79 г (8 ммоль) гидрохлорида *трет*-бутилового эфира L-лейцина, 1,2 мл (10 ммоль) N-этилморфолина в 30 мл диоксана получили 1,99 г (74,9%) гликопептида (IIa), который переосадили из смеси хлороформ — метанол (5 : 1) эфиром. Выход 1,0 г (60%).

3-О-{2-О-[N-(β-D-глюкопиранозилуруноил)-O'-*трет*-бутил-L-валин]-N-(β-D-глюкопиранозилуруноил)-O'-*трет*-бутил-L-валин}-(3β, 20β)-11-оксо-30-(N-карбонил-O'-*трет*-бутил-L-валин)-30-норолеан-12-ен-3-ол (IIб)

а) По методике А из 0,41 г (0,5 ммоль) глицирризиновой кислоты, 0,25 г (1,8 ммоль) N-гидроксисбензотриазола, 0,4 г (1,9 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимида, 0,42 г (2 ммоль) гидрохлорида *трет*-бутилового эфира L-валина, 0,5 мл (3,6 ммоль) триэтиламина получили 0,53 г (85,5%) гликопептида (IIб), который переосадили из ацетона гексаном. Выход 0,39 г (63,5%). R<sub>f</sub> 0,5 (В); 0,3 (Г); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +30° (с 0,04; MeOH). ИК-спектр, ν, см<sup>-1</sup>: 3600—3200 (ОН, NH); 1740 (COOR); 1670 (C11=O); 1540 (CONH). УФ, λ<sub>max</sub><sup>MeOH</sup> (lg ε): 249 нм (3,99). Найдено, %: С 63,96; Н 8,85; N 3,47. C<sub>69</sub>H<sub>113</sub>N<sub>3</sub>O<sub>19</sub>. Вычислено, %: С 64,16; Н 9,04; N 3,25.

б) По методике Б из 1,64 г (2 ммоль) глицирризиновой кислоты, 1,2 г (10,4 ммоль) N-гидроксисукцинимид, 1,3 г (6 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимида, 1,3 г (6 ммоль) гидрохлорида *трет*-бутилового эфира L-валина, 1,3 мл (9,5 ммоль) триэтиламина в 50 мл тетрагидрофурана получили 1,9 г (76%) продукта (IIб), который выделяли путем упаривания растворителя в вакууме при ~45° С, растворения остатка в хлористом метиле (200 мл) и промывания 5% раствором лимонной кислоты, водой, 5% раствором NH<sub>4</sub>OH и снова водой.



Органическую фазу сушили  $MgSO_4$  и упаривали растворитель в вакууме при  $-50^\circ C$ .

Сухой продукт (IIб) пересажали из ацетона гексаном. Выход (IIб) 1,2 г (48%).

3-О-{2-О-[N-(β-D-гликопиранозилуруноил)-O'-трет-бутил-L-изолейцин]-N-(β-D-гликопиранозилуруноил)-O'-трет-бутил-L-изолейцин]}-(3β, 20β)-11-оксо-30-(N-карбонил-O'-трет-бутил-L-изолейцин)-30-норолеан-12-ен-3-ол (IIв)

а) По методике А из 0,82 г (1 ммоль) глицирризиновой кислоты, 0,4 г (3 ммоль) N-гидроксисукцинимид, 0,8 г (4 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодимида, 1,03 г (4 ммоль) гидрохлорида трет-бутилового эфира L-изолейцина, 1,4 мл (10,2 ммоль) триэтиламина в 30 мл диоксана получили 1,22 г (91,7%) гликопептида (IIв), который пересажали из смеси хлороформ — этанол (5 : 1) эфиром. Выход 1,0 г (75,2%).

б) По методике Б из 1,64 г (2 ммоль) глицирризиновой кислоты, 1,2 г (10,4 ммоль) N-гидроксисукцинимид, 1,3 г (6 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодимида, 1,55 г (6 ммоль) гидрохлорида трет-бутилового эфира L-изолейцина, 1,3 мл (9,5 ммоль) триэтиламина в 50 мл диоксана после обработки реакционной смеси как описано выше для соединения (IIб) получали 2,0 г (75,2%) защищенного гликопептида (IIв), который пересажали из ацетона гексаном. Выход 1,28 г (48,1%). Т. пл.  $88-90^\circ C$ .  $R_f$  0,66 (А); 0,36 (Г).  $[\alpha]_D^{20} +29^\circ$  (с 0,086; EtOH). ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 3600—3200 (ОН, NH); 1740 (COOR); 1660 (C11=O); 1530 (CONH). УФ-спектр,  $\lambda_{max}^{E_{OH}}$  (lg ε): 246 нм (3,93). Найдено, %: С 64,86; Н 8,96; N 3,52.  $C_{72}H_{119}N_3O_{19}$ . Вычислено, %: С 64,97; Н 9,03; N 3,16.

3-О-{2-О-[N-(β-D-гликопиранозилуруноил)-O'-трет-бутил-L-пролин]-N-(β-D-гликопиранозилуруноил)-O'-трет-бутил-L-пролин]}-(3β, 20β)-11-оксо-30-(N-карбонил-O'-трет-бутил-L-пролин)-30-норолеан-12-ен-3-ол (IIг)

По методике Б из 1,64 г (2 ммоль) глицирризиновой кислоты, 1,3 г (11,3 ммоль) N-гидроксисукцинимид, 1,3 г (6 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодимида, 1,24 г (6 ммоль) гидрохлорида трет-бутилового эфира L-пролина, 1,2 мл (8,7 ммоль) триэтиламина в 50 мл диоксана получили 1,0 г (42,8%) гликопептида (IIг), который пересажали из ацетона гексаном. Выход 0,6 г (23,3%).  $R_f$  0,58 (Д).  $[\alpha]_D^{20} +32^\circ$  (с 0,02; MeOH). ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 3600—3200 (ОН, NH); 1735 (COOR); 1660 (C11=O); 1540 (CONH). УФ-спектр,  $\lambda_{max}^{MeOH}$  (lg ε): 248 нм (4,24). Найдено, %: С 63,74; Н 8,11; N 3,62.  $C_{69}H_{107}N_3O_{19}$ . Вычислено, %: С 64,60; Н 8,42; N 3,27.

3-О-{2-О-[N-(β-D-гликопиранозилуруноил)-O'-трет-бутил-L-метионин]-N-(β-D-гликопиранозилуруноил)-O'-трет-бутил-L-метионин]}-(3β, 20β)-11-оксо-30-(N-карбонил-O'-трет-бутил-L-метионин)-30-норолеан-12-ен-3-ол (IIд)

По методике Б из 1,64 г (2 ммоль) глицирризиновой кислоты, 1,2 г (10,4 ммоль) N-гидроксисукцинимид, 1,4 г (6,8 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодимида, 1,93 г (8 ммоль) гидрохлорида трет-бутилового эфира L-метионина, 1,2 г (10 ммоль) N-этилморфолина в 30 мл тетрагидрофурана получили 2,15 г (77,2%) гликопептида (IIд), который пересажали из смеси хлороформ — метанол (5 : 1) эфиром. Выход 1,35 г (48,5%).  $R_f$  0,6 (А). ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 3600—3200 (ОН, NH); 1740 (COOR); 1670 (C11=O); 1540 (CONH). УФ-спектр,  $\lambda_{max}^{MeOH}$  (lg ε): 249 нм (4,07). Найдено, %: С 59,41; Н 7,85; N 2,73.  $C_{69}H_{113}N_3O_{19}S_3$ . Вычислено, %: С 59,84; Н 8,24; N 3,03.

3-О-{2-О-[N-(β-D-гликопиранозилуруноил)-O'-трет-бутил-L-фенилаланин]-N-(β-D-гликопиранозилуруноил)-O'-трет-бутил-L-фенилаланин]}-(3β, 20β)-11-оксо-30-(N-карбонил-O'-трет-бутил-L-фенилаланин)-30-норолеан-12-ен-3-ол (IIж)

По методике А из 0,82 г (1 ммоль) глицирризиновой кислоты, 0,48 г (3,5 ммоль) N-гидроксисукцинимид, 0,72 г (3,5 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодимида, 1,07 г (4 ммоль) гидрохлорида трет-бутилового эфира L-фенилаланина, 0,5 мл (4,3 ммоль) N-метилморфолина в 30 мл диоксана получили 1,0 г (70,0%)



гликопептида (Пж), который пересадили из ацетона гексаном. Выход 0,85 г (59,4%).  $R_f$  0,56 (А).  $[\alpha]_D^{20} +35^\circ$  (с 0,04; EtOH). ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600—3200 (ОН, NH); 1735 (COOR); 1660 (C11=O); 1535 (CONH). УФ-спектр,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  (lg  $\epsilon$ ): 248 нм (4,08). Найдено, %: С 66,91; Н 7,59; N 2,89.  $\text{C}_{81}\text{H}_{113}\text{N}_3\text{O}_{19}$ . Вычислено, %: С 67,89; Н 7,96; N 2,93.

*Методика деблокирования гликопептидов (Па—Пж)*

В. К раствору 1,0 г защищенного гликопептида (П) в 20 мл хлористого метилена прибавили 20 мл трифторуксусной кислоты и смесь перемешивали 1 ч при 20° С. Растворитель и  $\text{CF}_3\text{COOH}$  отгоняли в вакууме при ~30° С. Остаток упаривали с сухим бензолом, сушили в вакууме при ~50° С и хроматографировали на колонке с силикагелем L (40/100 мкм), элюируя смесью хлороформ — метанол — вода, 200 : 10 : 1 (Е), 100 : 10 : 1 (Ж) 50 : 10 : 1 (З), 25 : 10 : 1 (И).

Г. Смесь 1,0 г защищенного гликопептида и 20 мл трифторуксусной кислоты перемешивали 0,5—1 ч при 20° С и упаривали в вакууме при ~30° С. Остаток растирали с сухим эфиром, сушили в вакууме 3 ч при 40—45° С и хроматографировали на колонке с силикагелем L (40—100 мкм), элюируя системами Ж—И.

3-О-{2-О-[N-(β-D-Глюкопиранозилуруноил)-L-лейцин]-N-(β-D-глюкопиранозилуруноил)-L-лейцин}-(3β, 20β)-11-оксо-30-(N-карбонил-L-лейцин)-30-норолеан-12-ен-3-ол (IIIa). Из 1,0 г (0,75 ммоль) защищенного гликопептида (Па) после обработки  $\text{CF}_3\text{COOH}$  по методике В и хроматографии на силикагеле L (элюент — система З) получили 0,45 г (39,4%) гомогенного продукта (IIIa) в виде аморфного вещества,  $R_f$  0,50 (А);  $[\alpha]_D^{20} +65^\circ$  (с 0,02; MeOH). ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600—3200 (ОН, NH); 1720 (COOH); 1660 (C11=O); 1550 (CONH). УФ-спектр,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  (lg  $\epsilon$ ): 247 нм (4,14). Найдено, %: С 61,43; Н 7,83; N 3,42.  $\text{C}_{60}\text{H}_{95}\text{N}_3\text{O}_{19}$ . Вычислено, %: С 61,99; Н 8,24; N 3,62. Данные [6]:  $[\alpha]_D^{20} +70^\circ$  (с 0,01; EtOH).

3-О-{2-О-[N-(β-D-Глюкопиранозилуруноил)-L-валин]-N-(β-D-глюкопиранозилуруноил)-L-валин}-(3β, 20β)-11-оксо-30-(N-карбонил-L-валин)-30-норолеан-12-ен-3-ол (IIIб). 1,0 г (0,8 ммоль) защищенного гликопептида (Пб) обработали трифторуксусной кислотой по методике Г, продукт хроматографировали на силикагеле L (элюент — система З) и вымывали 0,42 г (46,7%) гомогенного продукта (IIIб) в виде аморфного вещества желтоватого цвета.  $R_f$  0,5 (А);  $[\alpha]_D^{20} +45^\circ$  (с 0,02; EtOH). ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600—3200 (ОН, NH); 1720, 1710 (COOH); 1660 (C11=O); 1550 (CONH). УФ-спектр,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  (lg  $\epsilon$ ): 249 нм (3,94). Найдено, %: С 61,58; Н 8,44; N 3,40.  $\text{C}_{57}\text{H}_{89}\text{N}_3\text{O}_{19}$ . Вычислено, %: С 61,09; Н 8,02; N 3,75.

3-О-{2-О-[N-(β-D-Глюкопиранозилуруноил)-L-изолейцин]-N-(β-D-глюкопиранозилуруноил)-L-изолейцин}-(3β, 20β)-11-оксо-30-(N-карбонил-L-изолейцин)-30-норолеан-12-ен-3-ол (IIIв). 1,0 г (0,86 ммоль) защищенного гликопептида (Пв) обработали  $\text{CF}_3\text{COOH}$  по методике Г. Хроматографией на силикагеле L (элюент — система З) получили 0,50 г (43%) гомогенного продукта (IIIв) в виде аморфного вещества.  $R_f$  0,48 (А);  $[\alpha]_D^{20} +55^\circ$  (с 0,015; EtOH). ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600—3200 (ОН, NH); 1720 (COOH); 1670 (C11=O); 1550 (CONH). УФ-спектр,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  (lg  $\epsilon$ ): 249 нм (4,04). Найдено, %: С 61,92; Н 7,65; N 3,26.  $\text{C}_{60}\text{H}_{95}\text{N}_3\text{O}_{19}$ . Вычислено, %: С 61,99; Н 8,24; N 3,62.

3-О-{2-О-[N-(β-D-Глюкопиранозилуруноил)-L-пролин]-N-(β-D-глюкопиранозилуруноил)-L-пролин}-(3β, 20β)-11-оксо-30-(N-карбонил-L-пролин)-30-норолеан-12-ен-3-ол (IIIг). Раствор 0,85 г (0,76 ммоль) защищенного гликопептида (Пг) в 10 мл хлористого метилена обработали 10 мл трифторуксусной кислоты по методике В. Хроматографией на колонке с силикагелем L, как описано выше, выделили 0,47 г (42,2%) гомогенного продукта (IIIг).  $R_f$  0,54 (А);  $[\alpha]_D^{20} +35^\circ$  (с 0,02; MeOH). ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600—3200 (ОН, NH); 1720 (COOH); 1650



(C11=O). УФ-спектр,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  (lg  $\epsilon$ ): 251 нм (4,06). Найдено, %: С 60,78; Н 7,44; N 3,50.  $\text{C}_{57}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{19}$ . Вычислено, %: С 61,44; Н 7,50; N 3,77.

3-О-{2-О-[N-( $\beta$ -D-Глюкопиранозилуроноил)-L-метионин]-N-( $\beta$ -D-глюкопиранозилуроноил)-L-метионин]}-(3 $\beta$ , 20 $\beta$ )-11-оксо-3 $\beta$ -(N-карбонил-L-метионин)-3 $\beta$ -норолеан-12-ен-3-ол (IIIд). 1,2 г (0,98 ммоль) защищенного гликопептида (IIд) обработали 20 мл трифторуксусной кислоты по методике Г. Хроматографированием на силикагеле L (100/250 мкм) (элюент — система Ж) получили 0,57 г (46,9%) гомогенного продукта (IIIд).  $R_f$  0,52 (А);  $[\alpha]_D^{20} +45^\circ$  (с 0,02; MeOH). ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600—3200 (ОН, NH); 1720 (COOH); 1660 (C11=O); 1550 (CONH). УФ-спектр,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  (lg  $\epsilon$ ): 248,5 нм (4,10). Данные [6]:  $[\alpha]_D^{20} +35^\circ$  (с 0,025; EtOH).

3-О-{2-О-[N-( $\beta$ -D-Глюкопиранозилуроноил)-L-фенилаланин]-N-( $\beta$ -D-глюкопиранозилуроноил)-L-фенилаланин]}-(3 $\beta$ , 20 $\beta$ )-11-оксо-3 $\beta$ -(N-карбонил-L-фенилаланин)-3 $\beta$ -норолеан-12-ен-3-ол (IIIж). 0,8 г (0,56 ммоль) защищенного гликопептида (IIж) обработали 20 мл трифторуксусной кислоты по методике Г. Хроматографией на силикагеле L (элюент — система З) получили 0,65 г (46,1%) гомогенного продукта (IIIж).  $R_f$  0,5 (А);  $[\alpha]_D^{20} +57^\circ$  (с 0,02; EtOH). ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600—3200 (ОН, NH); 1720 (COOH); 1660 (C11=O); 1545 (CONH); 1500 (Ph). УФ-спектр,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  (lg  $\epsilon$ ): 250 нм (4,04). Данные [6]:  $[\alpha]_D^{20} +65^\circ$  (с 0,01; EtOH).

Изучение иммуномодулирующих свойств гликопептидов глицерризиновой кислоты. Животных массой 18—20 г иммунизировали 5% взвесью эритроцитов барана по 0,5 мл внутривенно. Исследуемые вещества вводили животным внутривенно однократно через 1 сут после иммунизации в дозах 0,5 и 2,0 мг/кг. Через 4 сут определяли количество АОК в селезенке.

Действие гликопептидов на клеточный иммунитет исследовали по модели гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на белых беспородных мышах, в качестве тест-антигена использовали динитрофторбензол. О реакции ГЗТ судили по величине отека уха. В качестве препарата сравнения использовали МДП в дозе 10 мкг/мышь. Животных сенсibilизировали 3% раствором динитрофторбензола, нанося по капле и втирая его в участок боковой поверхности тела. Исследуемые соединения вводили в дозах 0,5 и 2,0 мг/кг однократно внутривенно через 1 сут после сенсibilизации. Через 10 сут наносили разрешающую дозу 1% раствора динитрофторбензола на обе стороны уха. Через 24 ч оценивали выраженность реакции ГЗТ по среднему проценту увеличения отека уха.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балтина Л. А., Сахаутдинова Г. М., Зарудий Ф. С., Лазарева Д. Н., Толстиков Г. А., Давыдова В. А. // Хим.-фарм. журн. 1990. № 2. С. 119—121.
2. Балтина Л. А., Толстиков Г. А. // Журн. общ. химии. 1991. Т. 61. Вып. 5. С. 1227—1233.
3. Сахаутдинова Г. М., Балтина Л. А., Исмаилова А. Ф., Зарудий Ф. С., Лазарева Д. Н., Кутлубаева А. Г. // «Стресс и иммунитет» Всесоюз. конф. Тез. докл. Ростов-на-Дону, 1989. С. 42.
4. Толстиков Г. А., Балтина Л. А., Рыжова С. А., Покровский А. Г., Плясунова О. А., Муринов Ю. И., Сандахчиев Л. С. // IV Симпоз. по изучению и использованию солодки в народном хозяйстве СССР. Тез. докл. Алма-Ата: Гылым, 1991. С. 160—164.
5. Толстиков Г. А., Балтина Л. А., Кондратенко Р. М., Насыров Х. М., Басченко Н. Ж., Лазарева Д. Н. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 3. С. 392—398.
6. Балтина Л. А., Рыжова С. А., Васильева Е. В., Толстиков Г. А. // Биоорг. химия. 1994. Т. 20. № 1. С. 55—62.
7. Халилов Л. М., Балтина Л. А., Спирихин Л. В., Васильева Е. В., Кондратенко Р. М., Панасенко А. А., Толстиков Г. А. // Химия природн. соедин. 1989. № 4. С. 500—504.
8. Jerne N. U., Nordian A. A. // Science. 1963. V. 140. P. 405.

Поступила в редакцию  
22.XII.1993

После доработки  
3.III.1994

L. A. Baltina, S. A. Ryzhova, E. V. Vasil'eva, G. A. Tolstikov,  
G. M. Sakhautdinova, F. S. Zarudyi

TRANSFORMATIONS OF GLYCYRRIZIC ACID.

VIII. THE SYNTHESIS OF IMMUNOMODULATING GLYCOPEPTIDES  
WITH *tert*-BUTYL ESTERS OF AMINO ACIDS

*Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Centre,  
Russian Academy of Sciences, Ufa*

Key words: glycyrrizic acid, glycopeptides, synthesis, *tert*-butyl esters, amino acids.

Triterpene glycopeptides, derivatives of glycyrrizic acid, were synthesized with the use of *tert*-butyl esters of *L*-amino acids. The condensation of glycoside with esters was carried out with *N*-hydroxysuccinimide — *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide or *N*-hydroxybenzotriazol — *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide in the presence of a base (triethylamine, *N*-methyl- or *N*-ethylmorpholine). The protection groups were removed with the use of trifluoroacetic acid.