



УДК 547.589.458.22+582.736

СИНТЕЗ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ДИГЛИКОПЕПТИДОВ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ 30-МЕТИЛОВОГО ЭФИРА

© 2004 г. Р. М. Кондратенко*, Л. А. Балтина***, Е. В. Васильева**, Х. М. Насыров*, Р. М. Киреева*, Н. Ж. Басченко*, С. М. Фридман*, Л. А. Балтина* (мл.), Г. А. Толстикова**

*Баширский государственный медицинский университет, Уфа;

**Институт органической химии УНЦ РАН, 450054, Уфа, просп. Октября, 71

Поступила в редакцию 05.08.2002 г. Принята к печати 15.09.2002 г.

Осуществлен селективный синтез новых дигликопептидов глицирризиновой кислоты и ее 30-метилового эфира методом активированных (*N*-оксисукцинимидных) эфиров. Соединения, содержащие остатки этилового эфира глицина и метилового и бутилового эфиров аланина повышали уровень агглютининов и гемолизинов в сыворотке крови у мышей в 2–3 раза по сравнению с контролем при введении внутрь в дозе 2 мг/кг в течение 14 дней.

Ключевые слова: глицирризиновая кислота, метиловый эфир, дигликопептиды; иммуномодулирующая активность.

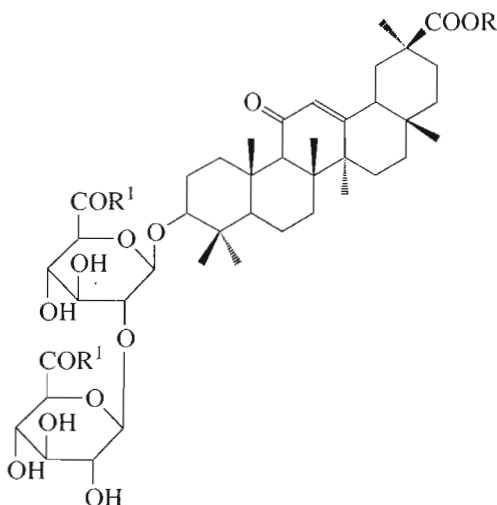
ВВЕДЕНИЕ

Глицирризиновая кислота (ГК) (I) – основной сапонин корня солодки – обладает широким спектром фармакологической активности (противовоспалительной, противоязвенной, противовирусной, противоопухолевой, антидотной, антиаллергической, иммуномодулирующей и т.д.). ГК и ее соли стимулируют выработку γ -интерферона *in vitro* и *in vivo* [1, 2]. Высокоочищенная ГК ($97 \pm 2\%$) обладает умеренной иммуностропной активностью: в дозе 50 мг/кг в 1.6 раза стимулирует антителогенез и независимо от дозы препятствует развитию клеточной иммунной реакции в тесте гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [3]. Ряд производных ГК,

относящихся к группе тритерпеновых гликопептидов, стимулировал выработку антителообразующих клеток (АОК) и клеточную иммунную реакцию в тесте ГЗТ к 2,4-динитрофторбензолу или бычьему сывороточному альбумину у мышей по сравнению с контролем [4–6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В продолжение наших исследований по синтезу иммуноактивных производных ГК [4–6] мы осуществили селективный синтез новой группы дигликопептидов (II)–(VII), содержащих фрагменты алкиловых эфиров аминокислот в углеводной части молекулы ГК.



- (I) R = H, R¹ = OH;
- (IIa) R = H, R¹ = –GlyOEt;
- (IIб) R = Me, R¹ = –GlyOEt;
- (IIIa) R = H, R¹ = –AlaOMe;
- (IIIб) R = Me, R¹ = –AlaOMe;
- (IVa) R = H, R¹ = –AlaOBu;
- (IVб) R = Me, R¹ = –AlaOBu;
- (Va) R = H, R¹ = –ValOBu;
- (Vб) R = Me, R¹ = –ValOBu;
- (VIa) R = H, R¹ = –Arg(Bz)OEt;
- (VIб) R = Me, R¹ = –Arg(Bz)OEt;
- (VIIa) R = H, R¹ = –Glu(OEt)OEt

Сокращения: АК – аминокислотный компонент; АОК – антителообразующие клетки; ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа; ГК – глицирризиновая кислота.

Автор для переписки (эл. почта: baltina@anrb.ru; тел.: (3472) 35-52-88).

Конденсацию ГК (**I**) с метиловыми, этиловыми и бутиловыми эфирами *L*-аминокислот в виде их гидрохлоридов – аминокомпонент (АК) проводили методом активированных эфиров с помощью *N*-гидроксисукцинимиды и DCC в среде тетрагидрофурана при 0°C в присутствии небольшого избытка (1 ммоль) основания (триэтиламина) при мольном соотношении реагентов ГК–HOSu–DCC–АК = 1 : 3–4 : 2–2.3 : 2–2.5. Целевые гликопептиды со свободной 30-СООН-группой выделяли колоночной хроматографией на силикагеле с выходами 45–55%. Структуры полученных соединений подтверждены спектральными методами и метилированием карбоксильной группы в агликоне диазометаном.

Химические сдвиги сигналов углеродных атомов углеводной и агликоновой частей молекул исследованных соединений (табл. 1) аналогичны сдвигам ГК (**I**) и ее производных [4–6]. Сигналы гликозидных атомов C1' и C2'' углеводной части молекул соединений (**IIa**)–(**VIa**) наблюдаются в области слабого поля при 104–105 м.д.

Аминокислотные фрагменты обнаруживаются по дополнительным сигналам сложноэфирных групп в области 172–175 м.д. (C=O) и сигналам атомов углерода α -аминокислотных остатков (табл. 2). В спектрах ¹³C-ЯМР метилированных дигликопептидов (**IIb**)–(**VIb**) наблюдается сдвиг сигнала C30 агликона до 176–177 м.д. в результате образования сложноэфирной связи [6, 7]. Кроме того, в спектрах ¹H-ЯМР C30-метиловых эфиров (**IIb**)–(**VIb**) появляется интенсивный синглет протонов COOCH₃ группы агликона при 3.4–3.5 м.д.

Изучено влияние дигликопептидов (**IIb**), (**IIIa**), (**IVa**) и (**Vb**) на уровень агглютининов и гемолизинов у мышей в дозах 10 мг/кг (7-дневное введение) и 2 мг/кг (14-дневное введение) по методу [8] при сенсibilизации эритроцитами барана (ЭБ). Реакция гуморального иммунного ответа у мышей оценивалась при помощи величины log₂ титров антител – гемагглютининов и гемолизинов. Результаты опытов приведены в табл. 3.

Как видно из данных табл. 3, соединения (**IIb**), (**IIIa**), (**IVa**) и (**Vb**) статистически достоверно повышают уровень агглютининов при введении в дозе 2 мг/кг в течение 14 дней по сравнению с контролем (~ в 2–3.5 раза). При 7-дневном введении в дозе 10 мг/кг наиболее выраженные эффекты проявили дигликопептиды (**IIb**), (**IVa**) и (**Vb**).

Соединения (**IIIa**), (**IVa**) и (**Vb**) достоверно повышали по сравнению с контролем уровень гемолизинов при введении в течение недели. Через две недели при введении в дозе 2 мг/кг все дигликопептиды стимулировали выработку гемолизинов как по сравнению с контролем (в 3–3.5 раза) (табл. 3), так и по сравнению с группами животных, получавших эти соединения в течение 7 дней.

О влиянии дигликопептидов (**IIb**), (**IIIa**), (**IVa**) и (**Vb**) на клеточное звено иммунного ответа судили по развитию реакции ГЗТ по методу [9] по разнице в массе “воспаленной” и “здоровой” лапок мышей. Результаты опытов представлены в табл. 4.

Как видно из данных табл. 4, исследованные производные ГК не оказали заметного влияния на клеточный иммунитет. Соединения (**IIb**), (**IVa**) и (**Vb**) проявили слабо выраженное стимулирующее влияние на реакцию ГЗТ в дозе 2 мг/кг при 2-недельном введении.

Таким образом, исследованные производные ГК представляют интерес в качестве стимуляторов гуморального иммунного ответа. Наиболее активным из исследованных веществ оказалось соединение (**IVa**), которое стимулировало гуморальный иммунный ответ в дозе 2 мг/кг. Активирующее влияние на гуморальное звено иммунитета, по-видимому, связано с увеличением продукции антител класса IgG, так как именно этот класс антител достигает максимального уровня на 7 день после первичной иммунизации мышей ЭБ и начинает снижаться после 14 дней [10].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ИК-спектры записаны на спектрометре Specord M80 в пасте с вазелиновым маслом. УФ-спектры снимали на приборе Specord M400 в метаноле. Оптическую активность измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 241МС в трубке длиной 1 дм. Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР снимали на приборе Bruker AM-300 с рабочей частотой 75.5 и 300 МГц в дейтерометаноле и дейтеродиметилформамиде, внутренний стандарт – тетраметилсилан.

Триэтиламин сушили над КОН и перегоняли. Тетрагидрофуран сушили над Na и перегоняли.

ТСХ проводили на пластинках Silufol (Чехия), используя систему растворителей CHCl₃–EtOH, 25 : 1. Пятна веществ обнаруживали 20% раствором фосфорновольфрамовой кислоты в этаноле с последующим нагреванием при 110–120°C в течение 2–3 мин. Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле L (40/100 мкм) (Чехия).

Для работы использовали глицирризиновую кислоту с содержанием основного вещества 92 ± 2%, полученную по методике [11], и алкиловые эфиры *L*-аминокислот в виде гидрохлоридов, полученные по методикам [12, 13].

Общая методика получения дигликопептидов (IIa)–(VIa). К раствору 1 ммоль ГК в 30 мл тетрагидрофурана при 0°C прибавляли 3–4 ммоль *N*-гидроксисукцинимиды, 2.0–2.3 ммоль DCC и перемешивали смесь при охлаждении в течение 3 ч. Смесь выдерживали в холодильнике в течение ночи, осадок *N,N'*-дициклогексилмочевины отфильтровывали, а к фильтрату, охлажденному до

Таблица 1. Параметры спектров ^{13}C -ЯМР дигликопептидов (IIa)–(VIIa) (агликоновая и углеводная части) (в CD_3OD , δ , м. д.; 25°C ; 75.5 МГц)

Атом углерода	(IIa)	(IIIa)	(IVa)	(Va)	(VIa)	(VIIa)
C1	41.4	40.7	40.7	39.5	41.4	40.7
C2	27.3	27.7	27.3	27.5	27.1	27.4
C3	91.4	90.8	90.6	88.6	90.7	90.6
C4	41.4	40.9	40.7	39.1	41.9	40.7
C5	57.2	56.7	56.4	55.1	55.9	56.5
C6	19.1	18.8	17.9	18.3	18.1	18.4
C8	45.2	44.9	44.8	43.7	44.5	44.8
C9	63.8	63.4	63.0	61.8	62.2	63.1
C11	202.9	202.8	202.3	199.9	201.9	202.3
C12	128.8	129.2	128.9	127.7	128.6	129.0
C13	171.5	171.8	171.2	169.6	170.8	171.4
C14	47.4	47.0	46.7	45.4	46.2	46.7
C16	28.3	27.9	27.3	27.5	28.2	27.9
C20	45.7	45.2	45.0	45.4	46.2	44.6
C21	32.8	32.3	31.7	31.9	31.8	31.4
C22	38.7	39.3	38.0	36.8	38.4	38.9
C23	28.9	28.7	28.2	28.4	28.7	28.5
C24	17.7	17.4	17.1	16.2	16.8	17.0
C25	17.8	17.6	17.3	16.3	16.8	17.3
C26	20.0	19.6	19.3	19.2	19.2	19.4
C27	24.7	23.5	24.1	23.0	23.7	23.9
C28	29.1	28.7	28.9	28.0	28.7	28.8
C29	29.6	29.5	29.3	28.4	28.9	29.2
C30	180.9	180.7	180.2	179.5	179.9	180.3
C1'	105.9	105.4	105.2	104.5	104.2	105.0
C2'	82.4	82.0	81.9	81.4	91.5	81.6
C3'	76.5	76.3	75.8	75.9	75.4	76.1
C4'	74.2	73.6	73.3	72.5	72.6	73.8
C5'	78.1	78.0	77.4	76.6	76.9	77.8
C6'	172.8	173.2	172.8	172.2	171.7	171.7
C1''	105.9	105.4	105.0	103.9	104.2	105.0
C2''	76.6	76.3	75.8	75.2	75.4	75.9
C3''	77.0	76.5	75.8	74.9	75.4	75.9
C4''	74.2	73.3	73.3	71.9	72.6	73.8
C5''	77.8	77.6	77.0	76.3	76.9	77.2
C6''	172.5	173.2	171.8	171.7	171.7	171.7

0°C , прибавляли 2.5–3.0 ммоль эфира аминокислоты и триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при охлаждении, выдерживали 20–22 ч при $20\text{--}22^\circ\text{C}$ и разбавляли холодной водой, подкисленной лимонной кислотой до pH 3–4. Осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили. Продукты хроматографировали на колонке, заполненной силикагелем L (40/100 мкм), элю-

ируя ступенчатым градиентом смесей хлороформ–метанол–вода 200 : 10 : 1, 100 : 10 : 1 и 50 : 10 : 1. Фракции с целевым продуктом объединяли и упаривали.

Общая методика метилирования дигликопептидов. К раствору 0.5 ммоль дигликопептида в 20 мл смеси метанол–диоксан прибавляли эфирный раствор диазометана при $0\text{--}+5^\circ\text{C}$ до устойчивой

Таблица 2. Химические сдвиги сигналов атомов углерода аминокислотных фрагментов в спектрах ¹³C-ЯМР дигликопептидов (IIa)–(VIIa) (δ, м.д.; 25°C; 75.5 МГц)

Аминокислотные фрагменты в соединениях	C1	C2	C3	C4	C5
(IIa) $\begin{matrix} {}^2\text{CH}_2-\text{NH}- \\ \\ {}^1\text{COOC}_2\text{H}_5 \end{matrix}$	173.5 173.9	63.2 63.8			
(IIIa) $\begin{matrix} \text{CH}_3-{}^2\text{CH}-\text{NH}- \\ \\ {}^1\text{COOCH}_3 \end{matrix}$	173.2 174.5	52.3 53.2	22.2 22.5		
(IVa) $\begin{matrix} \text{CH}_3-{}^2\text{CH}-\text{NH}- \\ \\ {}^1\text{COOC}_4\text{H}_9 \end{matrix}$	173.6 174.1	53.1 53.1	20.1 20.1		
(Va) $(\text{CH}_3)_2-{}^3\text{CH}-{}^2\text{CH}-\text{NH}-$ $\begin{matrix} \\ {}^1\text{COOC}_4\text{H}_9 \end{matrix}$	172.6 174.7	57.8 58.2	30.7 30.9	18.5 18.8	18.7 19.0
(VIa) $\begin{matrix} \text{NH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5\text{CONH}-\text{CH}-\text{NH}-{}^5\text{CH}_2-{}^4\text{HC}_2-{}^3\text{CH}_2-{}^2\text{CH}-\text{NH}- \\ \\ {}^1\text{COOC}_2\text{H}_5 \end{matrix}$	172.6 173.0	53.3 53.3	25.4 25.9	44.0 44.3	62.5 62.5
(VIIa) $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}^5\text{CO}-{}^4\text{CH}_2-{}^3\text{CH}_2-{}^2\text{CH}-\text{NH}-$ $\begin{matrix} \\ {}^1\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$	172.6 173.0	52.7 53.0	27.2 28.2	31.0 31.7	174.2 174.0

Другие сигналы для (IIa): 52.9, 52.8, 28.6, 28.4 (C₂H₅), (IIIa): 51.9, 51.4 (CH₃), (IVa): 66.3, 44.5, 44.4, 34.7, 33.7 (C₄H₉), (VIa): 134.3, 132.5, 129.1, 128.9, 128.6 (C₆H₅).

Таблица 3. Влияние дигликопептидов на уровень агглютининов и гемолизинов у сенсibilизированных животных (приведено log₂ агглютининов (А) и log₂ гемолизинов (Б))

Соединение	Через 7 дней (10 мг/кг)		Через 14 дней (2 мг/кг)	
	А	Б	А	Б
(IIb)	1.3 ± 0.2*	0.8 ± 0.2	3.0 ± 0.2*	2.9 ± 0.1*
(IIIa)	0 ± 0	1.3 ± 0.2*	2.1 ± 0.1*	2.4 ± 0.4*
(IVa)	1.5 ± 0.15*	1.2 ± 0.2*	2.4 ± 0.2*	2.3 ± 0.3*
(Va)	1.3 ± 0.2	1.01 ± 0.1	1.5 ± 0.3	2.0 ± 0.1*
Контроль**	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.75 ± 0.3

* Достоверно относительно контроля (при p < 0.05).

** Физиологический раствор.

желтой окраски. Раствор фильтровали и упаривали в вакууме при 40–45°C. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесями хлороформ–метанол–вода 200 : 10 : 1, 100 : 10 : 1. Однородные по ТСХ фракции объединяли и упаривали.

3-О-{2-О-[N-(β-D-глюкопиранозилуроноилглицина этиловый эфир)]-N-(β-D-глюкопиранозилуроноилглицина этиловый эфир)}-(3β,20β)-11-оксо-18β-олеан-12-ен-30-овая кислота (IIa); выход 52%; R_f 0.48; [α]_D²⁰ +48° (с 0.02, MeOH);

Таблица 4. Влияние дигликопептидов на реакцию ГЗТ у мышей (приведены: разница в массе лапок, мг (А) и прирост объема лапок, % (Б) при сенсibilизации в течение 7 и 14 дней)

Соединение	7 дней (10 мг/кг)		14 дней (2 мг/кг)	
	А	Б	А	Б
(IIб)	8.00 ± 0.75	7.33 ± 0.60	10.60 ± 0.90*	10.12 ± 0.51*
(IIIа)	7.14 ± 0.35	6.88 ± 0.90	8.00 ± 0.45	7.34 ± 1.21
(IVа)	6.28 ± 0.60*	7.05 ± 0.21	12.20 ± 1.51*	10.70 ± 1.39
(Vб)	7.14 ± 0.60	5.94 ± 0.6	14.60 ± 1.43*	10.32 ± 1.51
Контроль	8.14 ± 0.45	7.59 ± 0.73	8.14 ± 0.45	7.59 ± 0.73

* Достоверно относительно контроля ($p < 0.05$).

ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3600–3200 (ОН, NH), 1740 (COOEt), 1670 (11-C=O), 1550 (CONH); УФ-спектр [MeOH, λ_{max} , нм ($\lg \epsilon$): 249 (3.95). Найдено, %: N 2.70. $\text{C}_{50}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{18}$. Вычислено, %: N 2.78. Спектр ^{13}C -ЯМР приведен в табл. 1 и 2.

Метилловый эфир (IIб). Выход 79%; $[\alpha]_D^{20} +45^\circ$ (c 0.02, MeOH); спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., CD_3OD): 0.80, 1.00, 1.04, 1.22, 1.24, 1.36 (21 H, все с, 7 CH_3), 3.64 (3 H, с, COOCH_3 агликона), 5.54 (1 H, с, H12); спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д., CD_3OD): 202.1 (C11), 178.5 (C30), 175.7 и 174.4 (C1 аминокислот), 171.6 (C6' и C6''), 170.6 (C13), 129.1 (C12), 104.9 (C1' и C1''), 90.6 (C3), 81.7 (C2'), 77.4 (C5'), 77.2 (C5''), 96.1 (C3'), 75.8 (C2''), 75.6 (C3''), 73.4 (C4'), 72.8 (C4''), 62.9 (C9), 56.4 (C5), 52.4 (C31).

Соединение (IIIа); выход 55%; R_f 0.52; $[\alpha]_D^{20} +44^\circ$ (c 0.02, EtOH); ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3600–3200 (ОН, NH), 1740 (COOMe), 1670 (11-C=O), 1540 (CONH); УФ-спектр [MeOH, λ_{max} , нм ($\lg \epsilon$): 248 (4.15). Найдено, %: N 2.70. $\text{C}_{50}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{18}$. Вычислено, %: N 2.80. Спектр ^{13}C -ЯМР приведен в табл. 1 и 2.

Метилловый эфир (IIIб); выход 78%; $[\alpha]_D^{20} +42^\circ$ (c 0.02, MeOH); спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., CD_3OD): 0.7–1.7 (21 H, м, 7 CH_3), 3.54 (3 H, с, COOCH_3 агликона), 3.66 и 3.72 (6 H, оба с, COOCH_3 аланина), 5.64 (1 H, с, H12); спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д., CD_3OD): 201.9 (C11), 177.0 (C30), 175.8 и 174.7 (C1 аминокислот), 171.3 (C6' и C6''), 170.7 (C13), 128.8 (C12), 105.9 (C1'), 104.6 (C1''), 90.5 (C3), 83.0 (C2'), 77.2 (C5' и C5''), 76.8 (C3'), 75.8 (C2'), 74.2 (C3''), 72.4 (C4' и C4''), 62.7 (C9), 55.9 (C5), 52.3 (C31).

Соединение (IVа); выход 49%; R_f 0.54; $[\alpha]_D^{20} +52^\circ$ (c 0.04, MeOH); УФ-спектр [MeOH, λ_{max} , нм ($\lg \epsilon$): 248 (4.08). Найдено, %: N 2.54. $\text{C}_{56}\text{H}_{88}\text{N}_2\text{O}_{18}$. Вычислено, %: N 2.59. Спектр ^{13}C -ЯМР приведен в табл. 1 и 2.

Метилловый эфир (IVб); выход 72%; $[\alpha]_D^{20} +50^\circ$ (c 0.02, MeOH); спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д., $\text{DMF}-d_7$): 199.7 (C11), 178.4 (C30), 173.4 и 173.3 (C1 аминокислот), 172.9 и 172.6 (C6' и C6''), 170.0 (C13), 128.5 (C12), 105.3 (C1'), 104.4 (C1''), 89.2 (C3), 82.4 (C2'), 77.1 (C5'), 76.9 (C5''), 76.2 (C3'), 75.8 (C3''), 75.6 (C2''), 72.8 (C4'), 72.7 (C4''), 62.1 (C9), 55.4 (C5), 51.9 (C31).

Соединение (Va); выход 45%; R_f 0.54; $[\alpha]_D^{20} +60^\circ$ (c 0.08, MeOH); УФ-спектр [EtOH, λ_{max} , нм ($\lg \epsilon$): 247 (4.02). Найдено, %: N 2.49. $\text{C}_{50}\text{H}_{97}\text{N}_2\text{O}_{18}$. Вычислено, %: N 2.46. Спектр ^{13}C -ЯМР приведен в табл. 1 и 2.

Метилловый эфир (Vб); выход 74%; $[\alpha]_D^{20} +58^\circ$ (c 0.05, MeOH); спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., CD_3OD): 0.8–1.7 (21 H, м, 7 CH_3), 3.64 (3 H, с, COOCH_3 агликона), 5.60 (1 H, с, H12); спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д., CD_3OD): 201.5 (C11), 178.0 (C30), 174.2 и 174.0 (C1 аминокислот), 172.3 (C6' и C6''), 171.8 (C13), 129.0 (C12), 104.9 (C1' и C1''), 90.0 (C3), 81.5 (C2'), 77.2 (C5'), 76.8 (C5''), 76.1 (C3'), 75.8 (C3''), 75.2 (C2''), 73.3 (C4' и C4''), 62.8 (C9), 56.2 (C5), 52.4 (C31).

Соединение (VIa); выход 49%; R_f 0.52; УФ-спектр [MeOH, λ_{max} , нм ($\lg \epsilon$): 249 (3.98). Найдено, %: N 7.85. $\text{C}_{77}\text{H}_{102}\text{N}_8\text{O}_{20}$. Вычислено, %: N 7.93. Спектр ^{13}C -ЯМР приведен в табл. 1 и 2.

Метилловый эфир (VIб); выход 70%; $[\alpha]_D^{20} +20^\circ$ (c 0.04, MeOH); спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., ацетон- d_6): 0.77, 0.80, 1.10, 1.12, 1.14, 1.26, 1.42 (21 H, все с, 7 CH_3), 3.62 (3 H, с, COOCH_3 агликона), 5.50 (1 H, с, H12); спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д., ацетон- d_6): 198.7 (C11), 176.5 (C30), 172.5 (C1 аминокислот), 127.9 (C12), 169.0 (C6' и C6''), 168.7 (C13), 105.5 (C1'), 104.5 (C1''), 89.0 (C3), 83.6 (C2'), 51.3 (C31).

Соединение (VIIa); выход 50%; R_f 0.54; $[\alpha]_D^{20} +50^\circ$ (c 0.04, MeOH); ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3600–

3200 (OH, NH), 1720 (COOH), 1740 (COOEt), 1660 (11-C=O), 1540 (CONH); УФ-спектр [MeOH, λ_{\max} , nm (lg ϵ): 248 (4.15). Найдено, %: N 2.40, C₆₀H₉₂N₂O₂₂. Вычислено, %: N 2.32.

Иммуотропная активность производных ГК была изучена на мышах. Животных сенсибилизировали внутрибрюшинным введением 3% взвеси эритроцитов барана по 0.5 мл на мышь. С первого дня сенсибилизации животные получали внутрь исследованные соединения в дозах 10 мг/кг (7-дневное введение) и 2 мг/кг (14-дневное введение). Контрольным животным внутрь вводили физиологический раствор. На 7 и 14 день сенсибилизации мышам каждой подгруппы ($n = 7$) субплантарно в правую лапку вводили разрешающую дозу ЭБ в концентрации 10^8 , другая лапка оставалась интактной. Через сутки у животных путем декапитации собирали кровь, в сыворотке которой определяли титр агглютининов и гемолизинов по методу [8]. Реакцию оценивали при помощи log₂ титров антител – гемагглютининов и гемолизинов. Далее животным отрезали задние лапки, взвешивали их и по разнице в мг и в % воспаленной и здоровой лапок судили о развитии реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [9]. Результаты опытов приведены в табл. 3 и 4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Толстиков Г.А., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстикова Т.Г. // Химия в интересах устойчивого развития. 1997. № 5. С. 57–73.
2. Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Шульц Э.Э., Покровский А.Г. // Биоорг. химия. 1997. Т. 23. С. 826–831.
3. Кондратенко Р.М., Балтина Л.А., Мустафина С.Р., Макарова Н.В., Насыров Х.М., Толстиков Г.А. // Хим.-фарм. журн. 2001. Т. 35. С. 39–42.
4. Балтина Л.А., Сахаутдинова Г.М., Зарудий Ф.С., Лазарева Д.Н., Толстиков Г.А. // Хим.-фарм. журн. 1990. Т. 24. С. 119–121.
5. Балтина Л.А., Рыжова С.А., Васильева Е.В., Толстиков Г.А., Сахаутдинова Г.М., Зарудий Ф.С. // Биоорг. химия. 1994. Т. 20. С. 1365–1373.
6. Балтина Л.А., Рыжова С.А., Васильева Е.В., Толстиков Г.А., Сахаутдинова Г.М., Лазарева Д.Н., Кондратенко Р.М. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 926–930.
7. Халилов Л.М., Балтина Л.А., Спирихин Л.В., Васильева Е.В., Кондратенко Р.М., Панасенко А.А., Толстиков Г.А. // Химия природ. соед. 1989. № 4. С. 500–505.
8. Сперанский В.В. Роль хорионического гонадотропина, аутоантител к нему и его аналогов в системе иммунитета в норме и патологии. Автореферат дис. ... д-ра мед. наук, Казань, 1990. 38 с.
9. Lagange H.Y., Mackaness G.B., Miller T.E. // T. Exp. Med. 1974. V. 139. С. 1529–1540.
10. Петров Р.В. Иммунология. М.: Медицина, 1982. 368 с.
11. Балтина Л.А., Кондратенко Р.М., Мустафина С.Р. // Хим.-фарм. журн. 2001. Т. 35. С. 38–41.
12. Балтина Л.А., Рыжова С.А., Васильева Е.В., Толстиков Г.А. // Химия природ. соед. 1994. № 2. С. 261–268.
13. Балтина Л.А., Толстиков Г.А. // Журн. общ. химии. 1991. Т. 61. С. 1227–1233.

Synthesis and Immunomodulating Activity of New Amino Acid Derivatives of Glycyrrhizic Acid and Its Methyl Ester

R. M. Kondratenko*, L. A. Baltina***, E. V. Vasil'eva**, Kh. M. Nasyrov*,
R. M. Kireeva*, N. Zh. Baschenko*, S. M. Fridman*,
L. A. Baltina (Jr.)*, and G. A. Tolstikov**

Phone: (3472) 355-288; e-mail: baltina@anrb.ru

*Bashkortostan State Medical University, Ufa, Bashkortostan, 450074 Russia

**Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
pr. Oktyabrya 71, Ufa, Bashkortostan, 450054 Russia

New amino acid derivatives of glycyrrhizic acid and its methyl ester were selectively synthesized using active *N*-succinimide esters. The compounds with residues of glycine ethyl ester and alanine methyl and butyl esters increased the level of agglutinins and hemolysins in blood serum of mice two- to threefold in comparison with the control upon parenteral administration at a dose of 2 mg/kg for 14 days. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: glycyrrhizic acid, amino acid derivatives, methyl ester; immunomodulating activity