



УДК 547.598.458.22+582.736

## СИНТЕЗ И ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИСТЕИНСОДЕРЖАЩИХ ГЛИКОПЕПТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ

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

\*Институт органической химии Уфимского научного центра РАН,  
450054, Уфа, просп., Октября, 71;

\*\*Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

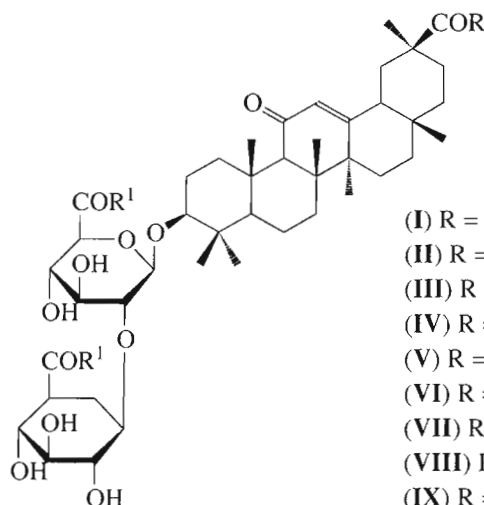
Поступила в редакцию 18.07.2002 г. Принята к печати 28.08.2002 г.

Осуществлен синтез новых цистеинсодержащих пептидных производных глицирризиновой кислоты путем ее конденсации с эфирами Cys(Bzl) или с дипептидом Cys(Bzl)-Val-OBu' методом активированных эфиров (*N*-гидроксисукцинимид + *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид) или с помощью реагента Вудворда К. Производные с остатками Cys(Bzl) и Cys(Bzl)-Val в углеводной части молекулы стимулировали первичный иммунный ответ и реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей в дозе 2 мг/кг.

*Ключевые слова:* глицирризиновая кислота, гликопептиды, цистеин, синтез; иммуностимулирующая активность.

Производные глицирризиновой кислоты (ГК, (I)), содержащие фрагменты аминокислот или дипептидов, представляют интерес для медицины в качестве малотоксичных иммуномодуляторов

нового типа [1–4]. В продолжение работ по поиску новых иммуноактивных производных ГК мы осуществили синтез соединений (II)–(IX), содержащих остатки *L*-цистеина.



- (I) R = R<sup>1</sup> = OH
- (II) R = OH, R<sup>1</sup> = Cys(Bzl)-OMe
- (III) R = OH, R<sup>1</sup> = -Cys(Bzl)-OBu'
- (IV) R = OH, R<sup>1</sup> = -Cys(Bzl)-OBzl
- (V) R = OH, R<sup>1</sup> = -Cys(Bzl)-OH
- (VI) R = R<sup>1</sup> = -Cys(Bzl)-OBu'
- (VII) R = R<sup>1</sup> = -Cys(Bzl)-OH
- (VIII) R = OH, R<sup>1</sup> = -Cys(Bzl)-Val-OBu'
- (IX) R = OH, R<sup>1</sup> = -Cys(Bzl)-Val-OH

Синтез производных (II) и (III) провели методом активированных эфиров с помощью *N*-гидрокси-

сокращения: АОК – антителообразующие клетки; ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа; КХ – колонная хроматография; МDP – *N*-ацетилмураомилдипептид; ГК – глицирризиновая кислота.

# Автор для переписки (эл. почта: baltina@anrb.ru).

сукцинимид (HOSu) и *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (DCC) при молярном соотношении реагентов ГК/HOSu/DCC = 1/4/2.5 в присутствии избытка основания (триэтиламина) в среде тетрагидрофурана при 0...+5°C с использованием в качестве аминокомпонентов гидрохлоридов

метилового и *трет*-бутилового эфиров *S*-бензилцистеина. Выход карбоксизащищенных гликопептидов (II) и (III) после очистки колоночной хроматографией на силикагеле составлял 55 и 60% соответственно.

При использовании избытка  $\text{HOSu}$  и  $\text{DCC}$  и проведении реакции активации карбоксильных групп ГК при 20–22°C в диоксане получили три-терпеновый гликопептид (VI), содержащий три остатка  $\text{Cys(Bzl)-OBu}'$  с выходом 66%. *трет*-Бутиловые сложноэфирные группы удаляли из соединений (III) и (VI) обработкой трифторуксусной кислотой при 20–22°C. Свободные гликопептиды (V) и (VII) выделяли в гомогенном состоянии КХ на силикагеле с выходами 53 и 56% соответственно.

Гликопептиды (IV) и (VIII) были получены конденсацией ГК с гидрохлоридом бензилового эфира *S*-бензилцистеина и с трифторацетатом дипептида  $\text{Cys(Bzl)-Val-OBu}'$  с помощью реагента Вудворда К в DMF в присутствии триэтиламина [4]. Бензиловый эфир соединения (IV) удаляли каталитическим гидрогенолизом в 70% уксусной кислоте в присутствии 10% Pd/C; гликопептид (V) был получен с выходом 56% после хроматографической очистки на силикагеле.

Дипептид  $\text{Woc-Cys(Bzl)-Val-OBu}'$  получали  $\text{DCC}$ -методом в хлористом метиле в присутствии триэтиламина и очищали перекристаллизацией из водного этанола (выход 51%). *Woc*-защитную группу удаляли обработкой трифторуксусной кислотой в мягких условиях и полученный трифторацетат пептида  $\text{Cys(Bzl)-Val-OBu}'$  без дальнейшей очистки вводили в реакцию конденсации с ГК с помощью реагента Вудворда К. Сырой гликопептид (VIII) деблокировали трифторуксусной кислотой при 20–22°C, и гликопептид (IX) выделяли в гомогенном виде КХ (выход 41%).

Строение полученных соединений (II)–(IX) подтверждали спектральными методами (ИК, УФ,  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР) и данными элементного анализа. Резонансные сигналы в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР гликопептидов (II), (III), (V), (VII) и (IX) (табл. 1 и 2) были отнесены на основании литературных данных для ГК и ее производных [2–5], аминокислот и пептидов [6, 7].

Так, в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР соединений (II), (III) и (V) остатки цистеина обнаруживаются по двум группам сигналов: сигналов  $\text{CO}$ -групп в области 169.8–173.3 м.д. и  $\alpha$ - $\text{CH}$ -групп при 54.6–58.9 м.д. Углероды карбоксильных групп остатков валина в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР дипептидного производного (IX) резонируют при 175.5 и 175.4 м.д., а углероды  $\text{CONH}$ -групп пептидной цепи – при 172.8 и 172.9 м.д. Сигналы ароматических атомов углерода бензильных остатков имеют значения химических сдвигов 127–139 м.д. в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР у всех исследованных веществ (табл. 2).

Сигнал атома углерода  $\text{C30}$  карбоксильной группы агликона в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР соединений (II), (III), (V) и (IX) резонирует при 178.3–180.5 м.д., как и в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР глицерретовой кислоты [5]. При образовании  $\text{CONH}$ -связи по  $\text{C30-OOH}$ -группе в соединении (VI) химический сдвиг данного атома углерода смещается до 177.6 м.д. (табл. 1), как это наблюдалось ранее в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР у амидов и других производных ГК [2–5, 8].

Мы изучили иммуотропную активность гликопептидов (V) и (IX) на белых беспородных мышях в дозах 2 и 10 мг/кг. О влиянии гликопептидов на гуморальный иммунный ответ судили по количеству антителообразующих клеток (АОК) во всей селезенке и в пересчете на  $10^6$  спленоцитов. В качестве препарата сравнения использовали MDP – известный иммуностимулятор класса гликопептидов в дозе 1/10 от  $\text{LD}_{50}$  (10 мкг/мышь) [9, 10]. Результаты опытов представлены в табл. 3. Установлено, что гликопептиды (V) и (IX) стимулируют в 3–5 раз выработку АОК у мышей по сравнению с контролем при внутрибрюшинном введении в дозе 2 мг/кг (табл. 3). Оба соединения оказались активнее MDP в данном тесте.

Влияние гликопептида (V) на первичный иммунный ответ оценивали также по уровню агглютининов и гемолизинов в крови у мышей при введении в дозах 10 (7-дневное введение) и 2 мг/кг (14-дневное введение). В обеих сериях экспериментов наблюдалось увеличение количества агглютининов и гемолизинов по сравнению с контрольной группой (табл. 4).

Влияние гликопептидов (V) и (IX) на клеточно-опосредованную иммунную реакцию определяли на модели ГЗТ у мышей при сенсibilизации 2,4-динитрофторбензолом при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 2 мг/кг. О развитии реакции ГЗТ судили по степени увеличения отека уха у мышей. Как видно из данных табл. 5, гликопептид (IX) в дозе 2 мг/кг вызывает достоверное усиление реакции ГЗТ по сравнению с контролем. Однако его влияние на клеточно-опосредованную реакцию менее выражено, чем у MDP: гликопептид (IX) оказался менее токсичным и его  $\text{LD}_{50}$  составляло  $700 \pm 20$  мг/кг (внутрибрюшинно), в то время как для MDP  $\text{LD}_{50} = 1000$  мкг/кг [10].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ИК-спектры записаны на спектрофотометре Specord M-80 в пасте с вазелиновым маслом. Электронные спектры поглощения растворов веществ в метаноле снимали на спектрофотометрах Specord M-40 и Specord UF-400. Спектры  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР измерены в  $\delta$ -шкале на спектрометре Bruker AM-300 с рабочей частотой 300 и 75.5 МГц соответственно, с широкополосным и внерезонансным подавлением по протонам, внутренний стандарт – тетраме-

**Таблица 1.** Химические сдвиги ( $\delta$ , м.д.) сигналов атомов углерода в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР гликопептидов ГК ( $25^\circ\text{C}$ ,  $75.5\text{ МГц}$ )

Номер С-атома	(II) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )	(III) (ацетон- $d_6$ )	(V) ( $\text{DMF-}d_7$ )	(VII) (ацетон- $d_6$ )	(IX) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )
3	90.56	89.06	89.04	88.10	90.62
4	40.71	39.84	39.57	38.84	38.78
5	56.43	55.36	55.49	54.27	56.42
8	44.62	43.97	44.00	44.65	44.92
9	63.14	62.03	62.17	61.04	62.65
11	202.47	199.69	199.74	199.04	202.62
12	128.23	127.48	127.49	127.70	128.28
13	171.45	170.53	170.06	170.73	171.30
14	46.74	45.64	45.77	45.66	46.78
17	32.99	32.22	33.04	32.24	32.99
21	32.16	32.22	32.32	31.90	32.04
24	17.14	16.60	16.66	15.74	17.00
25	17.47	16.74	16.76	16.62	17.33
29	29.23	29.55	29.56	29.35	29.25
30	180.50	178.55	178.34	177.57	180.44
1'	105.00	105.04	105.20	103.20	105.08
2'	81.54	82.22	82.44	80.08	81.81
3'	75.99	75.82	75.98	74.10	75.96
4'	73.46	72.79	73.05	72.55	73.52
5'	77.65	76.95	77.00	75.31	77.77
6'	171.55	169.93	170.36	169.98	172.88
1''	104.87	104.27	107.25	102.87	105.00
2''	75.42	75.17	75.98	74.26	75.90
3''	76.10	76.18	74.90	73.71	77.23
4''	73.59	73.11	73.36	71.69	73.52
5''	77.19	76.75	76.98	74.85	77.34
6''	171.65	170.00	170.36	169.64	172.88

тилсилан. Удельное вращение для растворов веществ в метаноле ( $c\ 0.02$ ) (где не указано особо) измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 241 MC в трубке длиной 1 дм. Температуры плавления определяли на приборе Voetius.

ТСХ проводили на пластинках Silufol (Чехия) и Kieselgel F<sub>60</sub> (Merck, Германия) в системах растворителей:  $\text{CHCl}_3$ -EtOH, 10 : 1 (А);  $\text{CHCl}_3$ -EtOH, 5 : 1 (Б);  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ , 45 : 10 : 1 (В). Вещества обнаруживали 20% раствором фосфорновольфрамовой кислоты в этаноле с последующим нагреванием при  $110$ – $120^\circ\text{C}$  в течение 2–3 мин. КХ выполняли на силикагеле L (40/100 мкм) (Чехия), используя в качестве элюента последовательно смеси  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ , 200 : 10 : 1, 100 : 10 : 1 и 50 : 10 : 1 (где не указано особо).

Триэтиламин выдерживали сутки над КОН и перегоняли. Растворители упаривали в вакууме ( $\sim 10$  мм рт. ст.) при  $45$ – $50^\circ\text{C}$ . Для работы исполь-

зовали глицирризиновую кислоту ( $92 \pm 2\%$ ) [11], L-аминокислоты и их *трет*-бутиловые эфиры (Reanal, Венгрия), *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (Aldrich, США). Метиловый эфир S-бензилцистеина получен по методике [12]; выход 77%; т. пл.  $160$ – $162^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_D^{20} -15^\circ$  ( $c\ 0.08$ , MeOH) [лит. [12]:  $150^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_D^{21} -13.9^\circ$  (2.9%,  $\text{H}_2\text{O}$ )].

**Общая методика получения гликопептидов (II) и (III).** К раствору 1 ммоль ГК в  $20\text{ м}^3$  THF при температуре от 0 до  $+5^\circ\text{C}$  прибавляли 4 ммоль HOSu и 2.5 ммоль DCC и перемешивали при этой температуре 2 ч. Осадок *N,N'*-дициклогексилмочевины отфильтровывали и к фильтрату прибавляли при  $0$ ... $+5^\circ\text{C}$  3–3.5 ммоль гидрохлорида эфира аминокислоты и 5 ммоль  $\text{Et}_3\text{N}$ . Смесь выдерживали 1 ч при  $0$ ... $+5^\circ\text{C}$  и 18 ч при  $20$ – $22^\circ\text{C}$  с периодическим перемешиванием, разбавляли холодной водой, подкисляли лимонной кислотой до

**Таблица 2.** Химические сдвиги сигналов С-атомов аминокислотных фрагментов в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР гликопептидов ГК ( $\delta$ , м. д.,  $25^\circ\text{C}$ , 75.5 МГц)

Соединение, фрагмент	C1	C2	C3	C4	$\text{C}_6\text{H}_5$
(II)					—
$\begin{array}{c} \text{NH-} \\   \\ {}^4\text{CH}_3\text{---}{}^3\text{CH}_2\text{---}{}^2\text{COO}^1\text{CH}_3 \\   \\ \text{SCH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	52.98	172.72	54.57	26.03	139.24 131.55 130.12
	53.18	173.31	53.18	26.75	129.55
(III)					138.94
$\begin{array}{c} \text{NH-} \\   \\ {}^3\text{CH}_2\text{---}{}^2\text{CH}^1\text{COOC}(\text{CH}_3)_3 \\   \\ \text{SCH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	169.85	53.04	35.82		138.86 129.56
	169.79	52.92	35.27		128.98
(V)					131.01
$\begin{array}{c} \text{NH-} \\   \\ {}^3\text{CH}_2\text{---}{}^2\text{CH}^1\text{COOH} \\   \\ \text{SCH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	172.50	52.58	26.71		130.04 129.59
	172.50	52.75	26.98		129.01 128.41 128.29
(VII)					129.96
$\begin{array}{c} \text{NH-} \\   \\ {}^3\text{CH}_2\text{---}{}^2\text{CH}^1\text{COOH} \\   \\ \text{SCH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	172.99	51.27	35.54		128.91 128.48
	172.39	50.78	35.33		128.13
	172.09	50.52	35.33		127.93 127.26
(IX)					129.68
$\begin{array}{c} \text{NH-} \\   \\ \text{CH}_2\text{---}{}^4\text{CH}^3\text{CONH}^2\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\   \qquad \qquad   \\ \text{SCH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \qquad \text{COOH} \end{array}$	175.49	65.27	172.88	58.88	129.06
	175.30	63.14	172.80	58.82	128.95 128.28

pH ~ 4, осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Продукты выделяли в гомогенном состоянии (контроль ТСХ) с помощью КХ.

**3-О-{2-О-[N-( $\beta$ -D-Глюкопиранозилуроноил)-S-бензилцистеина метиловый эфир]-N-( $\beta$ -D-глюкопиранозилуроноил)-S-бензилцистеина метиловый эфир}-(3 $\beta$ ,20 $\beta$ )-11-оксо-3 $\alpha$ -норолеан-12-ен-3 $\alpha$ -овая кислота (II).** Выход 55%;  $R_f$  0.5 (Б);  $[\alpha]_D^{20} +30^\circ$ ; ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 3600–3200 (ОН, NH), 1740 (COOCH<sub>3</sub>), 1660 (11-CO), 1540 (CONH); УФ-спектр [ $\lambda_{\text{max}}$ , нм ( $\lg \epsilon$ )]: 235 (4.0), 246 (4.03). Найдено, %: N 2.3. C<sub>64</sub>H<sub>83</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub>. Вычислено, %: N 2.4. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР приведен в табл. 1 и 2.

**Соединение (III).** Выход 60%;  $R_f$  0.35 (В);  $[\alpha]_D^{20} +35^\circ$ ; ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 3600–3200 (ОН, NH), 1740 (COOBu<sup>t</sup>), 1670 (11-CO), 1540 (CONH), 1500 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); УФ-спектр [ $\lambda_{\text{max}}$ , нм ( $\lg \epsilon$ )]: 245 (4.40); спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMF- $d_7$ ): 0.78, 0.84, 1.06, 1.08, 1.16, 1.26 (21 H, 6 c, 7 CH<sub>3</sub>), 1.38, 1.4 (27 H, 2 c, 9 CH<sub>3</sub>, Bu<sup>t</sup>); 5.50 (H12), 7.20–7.40 (м, аром.). Найдено, %: N 2.3. C<sub>70</sub>H<sub>100</sub>S<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub>. Вычислено, %: N 2.1. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР приведен в табл. 1 и 2.

**Соединение (IV).** К раствору 0.41 г (0.5 ммоль) ГК в 15 мл DMF при 0...+5 $^\circ\text{C}$  прибавляли 0.3 мл Et<sub>3</sub>N и 0.4 г (1.5 ммоль) реагента Вудворда К. Смесь перемешивали 1.5 ч при 0...+5 $^\circ\text{C}$ , 1.5 ч при

20–22°C, прибавляли еще 0.4 мл Et<sub>3</sub>N и порциями 0.45 г (1.5 ммоль) гидрохлорида бензилового эфира *S*-бензилцистеина. Смесь выдерживали 1 ч при 0...+5°C и затем 24 ч при 20–22°C, разбавляли холодной водой и подкисляли лимонной кислотой до pH ~ 4. Осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Остаток хроматографировали на колонке и получали 52% соединения (IV); R<sub>f</sub> 0.5 (B); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +25°; ИК-спектр, ν, см<sup>-1</sup>: 3600–3200 (ОН, NH), 1740 (COOBzl), 1660 (11-CO), 1550 (CONH), 1500 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); УФ-спектр [λ<sub>max</sub>, нм (lg ε)]: 248 (3.95). Найдено, %: N 2.1, S 4.5. C<sub>76</sub>H<sub>91</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено, %: N 2.0, S 4.6.

**Соединение (V). А.** Соединение (III) (0.68 г, 0.5 ммоль) обрабатывали 2 мл CF<sub>3</sub>COOH в 20 мл хлористого метилена при 20–22°C, упаривали досуха и подвергали КХ, элюируя последовательно смесями CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O 100 : 10 : 1 и 50 : 10 : 1. Получали 0.32 г (53%) соединения (V); R<sub>f</sub> 0.45 (B); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 52°; ИК-спектр, ν, см<sup>-1</sup>: 3600–3200 (ОН, NH), 1710 (COOH), 1670 (11-CO), 1550 (CONH), 1510 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); УФ-спектр [λ<sub>max</sub>, нм (lg ε)]: 250 (4.50); спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (ацетон-*d*<sub>6</sub>): 0.78, 0.84, 1.06, 1.14, 1.36 (21 H, 5 с, 7 CH<sub>3</sub>), 5.54 (1 H, с, H12), 7.2–7.4 (м, H аром.). Найдено, %: N 2.1, S 5.3. C<sub>62</sub>H<sub>84</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено, %: N 2.3, S 5.2.

**Б.** Гликопептид (IV) (0.3 г) деблокировали гидролизом над 10% Pd/C в 70% CH<sub>3</sub>COOH в течение 48 ч, катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха и смесь подвергали КХ как описано выше в опыте А для соединения (V); выход соединения (IV) 56%; R<sub>f</sub> 0.45 (B), 0.5 (B); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +50° (с 0.04; MeOH).

**Соединение (VI).** К раствору 1.64 г (2 ммоль) ГК в 20 мл диоксана при 0°C прибавляли 1.2 г (10.4 ммоль) HOSu, 1.2 г (5.7 ммоль) DCC и смесь перемешивали 30 мин при 0 – +5 и 6 ч при 20–22°C. Осадок дициклогексилмочевинны отфильтровывали, и к фильтрату прибавляли 2.12 г (7 ммоль) *трет*-бутилового эфира *S*-бензилцистеина и 1.3 мл Et<sub>3</sub>N в 50 мл диоксана. Смесь выдерживали с периодическим перемешиванием при 20–22°C в течение 24 ч, разбавляли холодной водой, подкисляли лимонной кислотой до pH ~ 4, осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Получали 2.36 г сырого продукта, который хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя последовательно смесями CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O 300 : 10 : 1, 200 : 10 : 1 и 100 : 10 : 1. Выход индивидуального по ТСХ гликопептида (VI) 66%; R<sub>f</sub> 0.35 (B); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +35°; ИК-спектр, ν, см<sup>-1</sup>: 3600–3200 (ОН, NH), 1740 (COOR), 1670 (11-CO), 1540 (CONH), 1500 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); УФ-спектр [λ<sub>max</sub>, нм (lg ε)]: 245 (4.40); спектр <sup>13</sup>C-ЯМР приведен в

**Таблица 3.** Влияние гликопептидов (V) и (IX) на выработку АОК в селезенке у мышей (контроль – физиологический раствор)

Соединение	Доза, мг/кг	Число АОК во всей селезенке	Число АОК × 10 <sup>6</sup> спленоцитов
(V)	2.0	23 342 ± 3329	1327 ± 172*
(IX)	2.0	13 858 ± 3163	1858 ± 322**
MDP	10 мкг/кг	8713 ± 1412	787 ± 167*
Контроль	–	5339 ± 784	355 ± 29

\* p < 0.05 (достоверно относительно контроля);  
\*\* p < 0.01 (достоверно относительно контроля).

**Таблица 4.** Влияние гликопептида (V) на уровень агглютининов и гемолизинов у мышей (контроль – физиологический раствор)

Соединение	Агглютинины (log <sub>2</sub> )	
	через 7 дней (10 мг/кг)	через 14 дней (2 мг/кг)
(V)	1.0 ± 0.2*	1.75 ± 0.10*
Контроль	0.4 ± 0.2	0.8 ± 0.2
Гемолизины (log <sub>2</sub> )		
(V)	1.0 ± 0.1*	1.3 ± 0.1*
Контроль	0.4 ± 0.3	0.75 ± 0.3

\* p < 0.05 (достоверно относительно контроля).

**Таблица 5.** Влияние гликопептидов (V) и (IX) на реакцию ГЗТ к 2,4-динитрофторбензолу у мышей (контроль – физиологический раствор)

Соединение	Доза, мг/кг	Средняя степень увеличения отека уха, %
(V)	0.5	35.0 ± 7.0
(V)	2.0	33.0 ± 6.4*
(IX)	2.0	46.0 ± 7.4
MDP	10 мкг/кг	51.0 ± 8.3*
Контроль	–	18.0 ± 3.0

\* p < 0.01 (достоверно относительно контроля).

табл. 1 и 2; спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMF-*d*<sub>7</sub>): 0.78, 0.84, 1.06, 1.08, 1.16, 1.26 (21 H, 6 с, 7 CH<sub>3</sub>), 1.38, 1.44 (27 H, 2 с, 9 CH<sub>3</sub>, Bu'), 5.50 (H12), 7.0–7.40 (м, H аром.). Найдено, %: N 2.5. C<sub>84</sub>H<sub>119</sub>S<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>19</sub>. Вычислено, %: N 2.7.

**Соединение (VII).** Гликопептид (VI) (0.68 г, 0.5 ммоль) обрабатывали раствором 2 мл CF<sub>3</sub>COOH в 20 мл хлористого метилена при 20–22°C, упаривали досуха и хроматографировали на колонке, элюируя смесями CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O 100 : 10 : 1 и 50 : 10 : 1 (по объему). Выход индиви-

дуального по ТСХ гликодипептида (VII) 56%;  $[\alpha]_D^{20} +34^\circ$ ; ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600–3200 (ОН, NH), 1710 (COOH), 1670 (11-CO), 1550 (CONH), 1510 ( $\text{C}_6\text{H}_5$ ); УФ-спектр [ $\lambda_{\text{max}}$ , нм ( $\lg \epsilon$ ): 250 (4.50); спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР приведен в табл. 1 и 2.

**Соединение (IX). А. Синтез трет-бутилового эфира трет-бутилоксикарбонил-S-бензилцистеинилвалина.** К раствору 3.1 г (10 ммоль) Вос-Cys(Bzl)-ОН в 50 мл хлористого метилена при 0...+5°C прибавляли 2.1 г (10 ммоль) гидрохлорида Val-ОВu', 2.2 г (10 ммоль) DCC и 1.4 мл (14 ммоль) Et<sub>3</sub>N. Смесь перемешивали 4 ч при 20–22°C, прибавляли несколько капель ледяной CH<sub>3</sub>COOH, осадок N,N'-дициклогексилмочевины отфильтровывали, органическую фазу промывали водой, 5% раствором соляной кислоты, водой, 5% раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой и сушили MgSO<sub>4</sub>. Растворитель упаривали и получали 4.4 г (95%) частично кристаллизующегося сиропа, который перекристаллизовывали из водного этанола. Выход дипептида 89% (4.2 г) (содержит два пятна по ТСХ). После дополнительной перекристаллизации из водного этанола получали 51% (2.4 г) (первый осадок) защищенного дипептида Вос-Cys(Bzl)-Val-ОВu';  $R_f$  0.62 (А); т. пл. 102–103°C;  $[\alpha]_D^{20} +10^\circ$  (с 0.01, EtOH); ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3350, 3330, 3260 (NH), 1710, 1650, 1630 (CO), 1570, 1530 (CONH). Найдено, %: С 62.32, Н 8.95, N 7.15, S 5.67. C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S. Вычислено, %: С 61.77, Н 8.2, N 6.00, S 6.87.

**Б. Трифторацетат Cys(Bzl)-Val-ОВu'** получали обработкой 1.1 г (2.3 ммоль) Вос-защищенного дипептида 10 мл CF<sub>3</sub>COOH в 10 мл хлористого метилена при 20–22°C в течение 20 мин с последующим упариванием в вакууме. Полученный сироп растирали с сухим эфиром, эфир отделяли и полученный трифторацетат вводили в реакцию с ГК без дальнейшей очистки.

**В. Синтез гликопептида (IX).** К раствору 0.6 г (0.73 ммоль) ГК в 20 мл DMF при 0...+5°C прибавляли 0.5 мл (3.6 ммоль) Et<sub>3</sub>N и 0.7 г (2.6 ммоль) реагента Вудворда К. Смесь перемешивали 1.5 ч при 0...+5°C и 1.5 ч при 20–22°C. Добавляли еще 0.4 мл Et<sub>3</sub>N и по каплям раствор трифторацетата Cys(Bzl)-Val-ОВu' в 5 мл DMF. Смесь выдерживали при 20–22°C 48 ч, разбавляли ледяной водой, подкисляли лимонной кислотой до pH ~ 4 и отфильтровывали осадок гликопептида (VIII) (выход 1.1 г). Гликопептид (VIII) растворяли при перемешивании в 20 мл CF<sub>3</sub>COOH, выдерживали 1 ч при 20–22°C и упаривали в вакууме без нагревания. К полученному сиропу прибавляли толуол (10 мл) и снова упаривали в вакууме досуха. Получали 0.7 г (57%) гликопептида (IX), который хроматографировали на колонке смесью CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O 100 : 10 : 1. Выход 0.5 г (41%);

$R_f$  0.36 (В);  $[\alpha]_D^{20} +45^\circ$  (с 0.04, 50% этанол); ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3600–3200 (ОН, NH), 1720–1700 (COOH), 1660 (11-CO), 1580, 1540 (CONH); УФ-спектр [MeOH,  $\lambda_{\text{max}}$ , нм ( $\lg \epsilon$ ): 248 (4.18); спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР приведен в табл. 1 и 2. Найдено, %: N 4.51, S 5.16. C<sub>74</sub>H<sub>106</sub>N<sub>4</sub>O<sub>20</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено, %: N 4.62, S 5.28.

**О влиянии гликопептидов (V) и (IX) на иммунитет** судили по изменению гуморального иммунного ответа и клеточно-опосредованной реакции на белых беспородных мышках массой 18–20 г, используя модель ГЗТ. Влияние гликопептидов (V) и (IX) на первичный иммунный ответ изучали по методу Эрне и Нордина в модификации Каннингама [13, 14]. Животных иммунизировали внутрибрюшинным введением 5% взвеси эритроцитов барана. Через сутки после иммунизации вводили исследуемые вещества внутрибрюшинно однократно в дозе 2 мг/кг. О действии гликопептидов на гуморальное звено иммунитета судили по количеству антителообразующих клеток во всей селезенке, которое подсчитывали визуально по числу зон гемолиза, затем производили пересчет на 10<sup>6</sup> спленоцитов. В качестве препарата сравнения использовали N-ацетилмурамоилдипептид в дозе 10 мкг/мышь [9]. О влиянии гликопептида (V) на первичный иммунный ответ судили также по изменению уровня агглютининов и гемолизинов в крови мышей по методу [15]. Исследованное соединение вводили животным внутрь с первого дня сенсibilизации эритроцитами барана в дозах 10 мг/кг (7-дневное введение) и 2 мг/кг (14-дневное введение). Контрольным животным внутрь вводили физиологический раствор. На 7-й и 14-й день сенсibilизации мышам каждой группы ( $n = 7$ ) субплантарно в правую лапку вводили разрешающую дозу эритроцитов барана в концентрации 10<sup>8</sup>; другая лапка оставалась интактной. Через сутки у животных путем декапитации собирали кровь, в сыворотке которой определяли агглютинины и гемолизины. Реакцию оценивали по величине log<sub>2</sub> титров антител – геагглютининов и гемолизинов. Результаты опытов представлены в табл. 4.

**Действие гликопептидов (V) и (IX) на клеточный иммунитет** изучали на модели ГЗТ к 2,4-динитрофторбензолу [3]. Сенсibilизацию мышей осуществляли введением 1 капли 1% раствора 2,4-динитрофторбензола на бок. Через 10 сут животные получали разрешающую дозу – по 1 капле 0.1% раствора 2,4-динитрофторбензола на каждую сторону правого уха. Через 24 ч определяли степень изменения массы пораженного уха по сравнению с контрольным (в процентах). Результаты опытов представлены в табл. 5.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № НШ-1488.2003.3 "Целе-

направленный синтез на основе доступных растительных веществ, получение аналогов биологически активных природных метаболитов”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балтина Л.А., Сахаутдинова Г.М., Зарудий Ф.С., Лазарева Д.Н., Толстиков Г.А. // Хим.-фарм. журн. 1990. Т. 24. С. 119–121.
2. Балтина Л.А., Рыжова С.А., Васильева Е.В., Толстиков Г.А., Сахаутдинова Г.М., Зарудий Ф.С. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 1365–1373.
3. Балтина Л.А., Рыжова С.А., Васильева Е.В., Толстиков Г.А., Сахаутдинова Г.М., Лазарева Д.Н., Кондратенко Р.М. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 926–930.
4. Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Кондратенко Р.М., Насыров Х.М., Басченко Н.Ж., Лазарева Д.Н. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 392–398.
5. Халилов Л.М., Балтина Л.А., Спирихин Л.В., Васильева Е.В., Кондратенко Р.М., Панасенко А.А., Толстиков Г.А. // Химия природн. соед. 1989. № 4. С. 500–504.
6. Балтина Л.А., Рыжова С.А., Васильева Е.В., Капина А.П., Толстиков Г.А. // Журн. общ. химии. 1993. Т. 63. С. 2140–2147.
7. Bretmaier E., Weelter W. <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy. Weinheim: Verlag Chemie, 1974.
8. Балтина Л.А., Васильева Е.В., Давыдова В.А., Исмагилова А.Ф., Зарудий Ф.С., Толстиков Г.А. // Хим.-фарм. журн. 1996. Т. 30. С. 14–16.
9. Балтина Л.А., Толстиков Г.А. Мурамилпептиды. Екатеринбург: РАН, 1998. С. 348.
10. Джексенбаев О.Ш. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1981. № 8. С. 13–18.
11. Кондратенко Р.М., Балтина Л.А., Мустафина С.Р., Флехтер О.Б., Муринов Ю.И., Давыдова В.А., Зарудий Ф.А., Исмагилова А.Ф., Толстиков Г.А. // Хим.-фарм. журн. 2001. Т. 35. С. 38–41.
12. Гринштейн Д., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1965. С. 821.
13. Jerne N.K., Nordin A.A. // Science. 1963. V. 140. P. 405.
14. Sunkinham A.I. // Nature. 1965. V. 207. P. 1106–1107.
15. Сперанский В.В. Роль хорионического гонадотропина, аутоантител к нему и его аналогов в системе иммунитета в норме и патологии. Дис. ... д-ра мед. наук. Казань, 1990. С. 346.

## Synthesis and Immunostimulating Activity of Cysteine-Containing Derivatives of Glycyrrhizic Acid

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

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

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

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

New cysteine-containing derivatives of glycyrrhizic acid were synthesized by its coupling with Cys(Bzl) esters or the Cys(Bzl)-Val-OBu<sup>t</sup> dipeptide by the active ester method (DCC/HOSu) or by Woodward's reagent K. The derivatives with Cys(Bzl) and Cys(Bzl)-Val residues attached to the carbohydrate part of the molecule stimulated the primary immune response and the reaction of delayed-type hypersensitivity in mice at a dose of 2 mg/kg. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* cysteine, glycopeptides, glycyrrhizic acid, immunostimulating activity, synthesis