



УДК 547.598.458.22+582.736

СИНТЕЗ КОНЪЮГАТОВ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ С α -D-ГЛЮКОЗАМИНОМ И НЕКОТОРЫМИ ГЛИКОЗИЛАМИНАМИ И ИХ ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2004 г. Р. М. Кондратенко*, Л. А. Балтина**, С. Р. Мустафина*, Е. В. Васильева*, Р. Помпей**, Д. Дейдда**, О. А. Плясунова***, А. Г. Покровский***, Г. А. Толстикова*

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

**Отделение медицинских наук Университета г. Кальяри, Италия;

***Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Новосибирская обл., п. Кольцово

Поступила в редакцию 05.12.2002 г. Принята к печати 25.10.2003 г.

Осуществлен синтез конъюгатов глицирризиновой кислоты (ГК) и ее 30-метилового эфира с 2-амино-1,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозой, 2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -D-глюкопиранозиламином, 2,3,4-три-*O*-ацетил- α -L-арабинопиранозиламином, 2-ацетамидо-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозиламином и β -D-галактопиранозиламином с помощью *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида или его смеси с *N*-гидроксисбензотриазолом. Структура конъюгатов подтверждена данными ИК-, УФ-, ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии. Гликоконъюгат, содержащий остатки 2-ацетамидо-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозиламина в углеводной части молекулы, обладает противовирусной активностью (ID₅₀ 4 мкг/мл) в отношении вируса герпеса простого типа 1 (HSV-1) в культуре клеток VERO. Два соединения показали анти-ВИЧ-1-активность (50–70% ингибирования р24) в культуре клеток МТ-4 в концентрациях 0.5–20 мкг/мл.

Ключевые слова: глицирризиновая кислота, конъюгаты, D-глюкозамин, β -гликозиламины, противовирусная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Глицирризиновая кислота (ГК) – основной гликозид корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) – известна своей высокой и разнообразной биологической активностью (противовоспалительной, противоязвенной, иммуномодулирующей, антиоксидантной, антиаллергической и т. д.) [1]. Предметом повышенного внимания исследователей является противовирусная активность ГК. ГК и ее соли ингибируют репродукцию ДНК- и РНК-содержащих вирусов (*Vaccinia*, Newcastle disease, *Vesicular stomatitis*, Herpes simplex) *in vitro* [2].

ГК также полностью ингибирует ВИЧ-1 в культуре клеток МТ-4 в концентрациях 0.5–1.0 мг/мл [3]. Предварительные клинические исследования показали, что при введении ГК больным СПИДом увеличивается содержание Т4-лимфоцитов и снижается содержание вирусного антигена [4]. Ряд химически модифицированных производных ГК обнаружили более выраженный ингибирующий

эффект на репродукцию ВИЧ-1 *in vitro* [3, 5–8]. В Японии моноаммонийная соль ГК в виде внутривенных вливаний (препарат SNMC) применяется для лечения хронических вирусных гепатитов В и С [9]. ГК и ее производные составляют первую группу веществ – ингибиторов репродукции вируса Марбург [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью увеличения гидрофильности молекулы ГК и ее координирующей способности нами впервые проведена модификация углеводной цепи гликозида с введением молекул α -D-глюкозамина и β -D-гликозиламинов. Как известно, D-глюкозамин является основным компонентом различных гликоконъюгатов [11]. Обычно этот остаток *N*-ацетилирован и имеет β -конфигурацию гликозидной связи. Конъюгаты α -D-глюкозамина по положению С2 в литературе не описаны.

Нами впервые синтезированы конъюгаты ГК или ее 30-метилового эфира (III)–(IX), содержащие по два остатка аминсахара в углеводной цепи, связанные с диглюкуронидной цепью ГК амидными связями (схема). В качестве аминоком-

Сокращения: ГК – глицирризиновая кислота; КХ – колонная хроматография; СГ – силикагель.

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

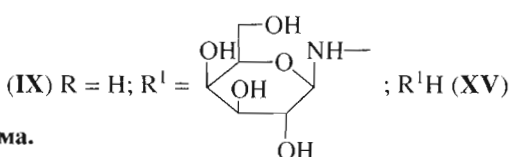
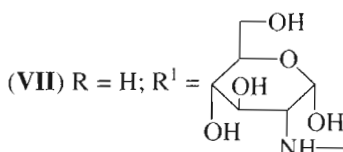
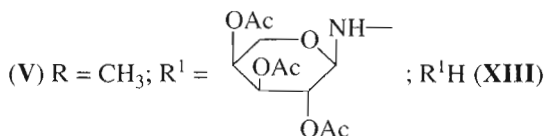
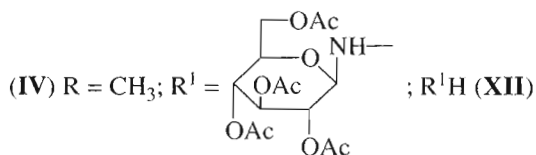
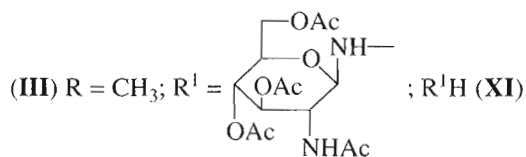
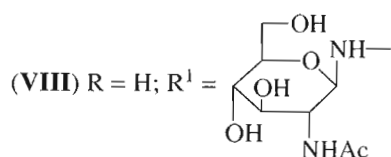
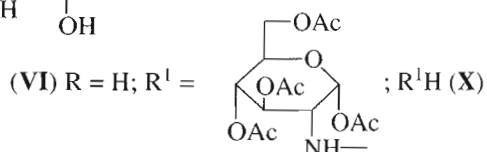
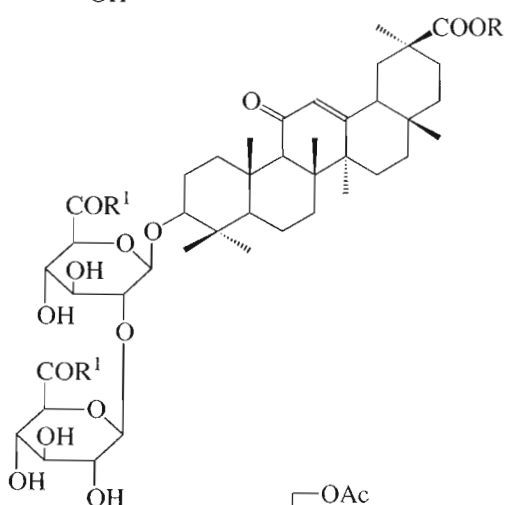
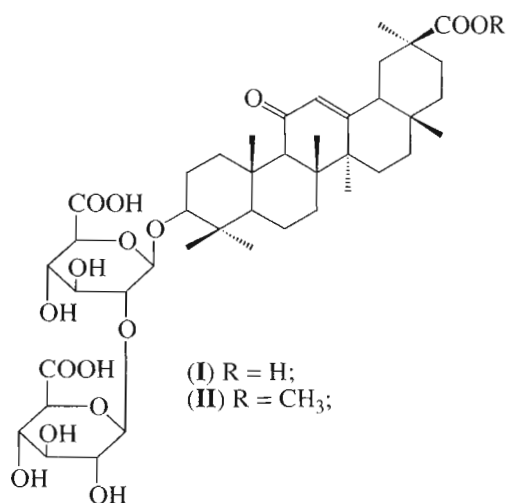


Схема.

понентов были взяты 2-амино-1,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-2-дезоксид- α -*D*-глюкопираноза в виде гидрохлорида (X), 2-ацетида-2-дезоксид-3,4,6-три-*O*-ацетил- β -*D*-глюкопиранозиламин (XI), 2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -*D*-глюкопиранозиламин (XII), 2,3,4-три-*O*-ацетил- α -*L*-арабинопиранозиламин (XIII), 2-ацетида-2-дезоксид- β -*D*-глюкопиранозиламин (XIV) и β -*D*-галактопиранозиламин (XV). Ацилирование сахаров (X)–(XIII) 30-метиловым эфиром ГК (II) проводили с помощью *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида (DCC) в среде DMF–пиридин. При этом образовывались конъюгаты (III)–(V), выделенные в индивидуальном состоянии колоночной хроматографией (КХ) на силикагеле (СГ)

с выходами 40–50%. Реакция конденсации осложнялась образованием побочной *N*-ацилмочевины ГК – продукта перегруппировки активированного интермедиата – *O*-ацелизомочевины ГК [12]. Этими побочными реакциями, а также потерями при хроматографировании, можно объяснить относительно низкий выход целевых конъюгатов (III)–(V).

Осуществлен селективный синтез продукта (VI) – конъюгата ГК с 2-амино-1,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-2-дезоксид- α -*D*-глюкопиранозой (X) с использованием в качестве карбоксикомпонента незащищенной ГК (I) DCC-методом при мольном

Таблица 1. Цитотоксичность и противовирусная активность конъюгатов ГК (VII)–(IX) в культуре клеток VERO

Соединение	Цитотоксическая активность MNTD ₅₀ , мкг/мл	Противовирусная активность ID ₅₀ , мкг/мл	
		HSV-1	HSV-2
(VII)	250	125	>250
(VIII)	500	4	500
(IX)	32	16	>32

соотношении реагентов ГК–(X)–DCC, равном 1 : 2–2.5 : 2 в мягких условиях.

Целевой продукт (VI) получен в хроматографически (ТСХ) индивидуальном состоянии КХ на СГ с выходом 40%. В качестве примеси при хроматографировании продукта реакции была выделена исходная ГК (более полярная фракция) (30%), идентифицированная по ТСХ с заводским образцом и спектру ¹³С-ЯМР. Остальные продукты реакции выделить в индивидуальном состоянии не удалось.

В спектре ¹H-ЯМР конъюгата (VI) сигналы Ас-групп остатка α-D-глюкозамина обнаруживаются при 1.9–2.0 м. д., аномерные протоны – при 4.95 и 4.99 м. д. в виде уширенных синглетов (α-конфигурация), протоны NH-групп при 7.80–7.92 м. д. В спектре ¹³С-ЯМР конъюгата (VI) атомы С2 остатков α-D-глюкозамина при NHCO-связи имеют значения химических сдвигов соответственно 54.3 и 53.3 м. д., аномерные С1 – 90.4 и 90.3 м. д., как и в спектре исходного производного D-глюкозамина (X).

При дезацетилировании конъюгата (VI) 0.5% раствором КОН в смеси метанола и хлористого метилена получен незащищенный конъюгат (VII), содержащий два остатка α-D-глюкозамина в углеводной части. В его спектре ¹³С-ЯМР – химические сдвиги С1-атомов α-D-глюкозамина имеют значения 91.9 и 91.8 м. д., атомов С2 – 55.5 и 55.1 м. д., как и в спектре α-D-GlcNAc [13, 14].

Отнесение сигналов в спектрах полученных конъюгатов ГК было сделано путем сравнения с литературными данными для производных ГК, содержащих амидные связи [12, 15, 16], гликозидов и N-ацильных производных α-D-глюкозамина и других гликопиранозиламинов [13, 14, 17–25].

Применение в качестве аминоконфигуров пер-О-ацетатов α-D-глюкозамина и β-гликозиламинов требует дополнительной стадии дезацетилирования в синтезе конъюгатов. Поэтому мы решили использовать для конъюгирования с ГК не содержащие О-ацетильных групп β-D-гликопиранозиламины (XIV) и (XV), которые были получены по известным методикам [17–20].

Конденсацию β-D-гликопиранозиламинов (XIV) и (XV) с ГК (I) мы провели также DCC-методом. Выход соответствующих свободных гликоконъюгатов (VIII) и (IX) после разделения смеси продуктов КХ на СГ составил 42–45%. В спектре ¹H-ЯМР гликоконъюгата (VIII) присутствуют два синглетных сигнала NHAc-групп (2.10 и 2.15 м. д.). В спектре ¹³С-ЯМР атомы углерода при N-гликозильных центрах обнаруживаются при 92.5 и 91.8 м. д. (β-D-GlcNβ), а С2 (C–NHAc) при 55.6 и 55.2 м. д. соответственно. В ¹³С-ЯМР-спектре гликоконъюгата (VIII) химический сдвиг С30-карбоксийной группы агликона имеет значение 178.2 м. д., а соответствующий сигнал в спектре гликоконъюгата (IX) находится при 179.1 м. д. (свободная COOH-группа). В качестве примеси при хроматографировании продуктов реакции была выделена исходная ГК (25–30%).

Из пептидной химии известно [26], что присутствие нуклеофилов N-гидроксисукцинимиды (HOSu) или N-гидроксисбензотриазола (HOBT) в реакционной смеси при образовании амидной связи подавляет побочные реакции. С целью увеличения выхода целевых конъюгатов ГК для образования амидной связи между COOH-группами углеводного фрагмента ГК и NH₂-группами сахаров (X), (XIV) и (XV) мы использовали DCC-метод с добавлением HOBT. Активацию COOH-групп ГК проводили при молярном соотношении реагентов ГК–DCC–HOBT, равном 1 : 2–2.5 : 2–2.5, в присутствии избытка сахара в среде DMF. В качестве третичного основания использовали пиридин. Целевые конъюгаты (VI), (VIII), (IX) были выделены КХ на СГ с выходами 60–62%. Таким образом, применение DCC–HOBT-метода для конъюгирования ГК с производными моносахаридов, содержащими аминогруппу, позволило увеличить выход целевых гликоконъюгатов ~ на 20%.

Изучена цитотоксичность и противовирусная активность конъюгатов ГК (VII)–(IX) в отношении вирусов герпеса простого типа 1 (Herpes simplex type 1) (HSV-1) и типа 2 (HSV-2) *in vitro*. Цитотоксичность оценивали в культуре клеток VERO как максимально нетоксичную дозу (MNTD₅₀) (доза соединения, вызывающая не более 50% гибели клеток по сравнению с контролем). Противовирусное действие определяли исходя из степени защиты инфицированных клеток от гибели в результате вирусной инфекции (цитопатического действия вирусов) как ID₅₀ – концентрация соединения, обеспечивающая 50% защиту клеток от гибели или на 50% подавляющая продукцию вируса в клетках. Результаты опытов представлены в табл. 1.

Установлено, что гликоконъюгат (VIII) обладает низкой цитотоксичностью в культуре клеток VERO (500 мкг/мл). Данное соединение показало выраженную противовирусную активность

(ID₅₀ 4 мкг/мл) в отношении вируса простого герпеса типа 1 (HSV-1).

Цитотоксичность конъюгатов (VIII), (IX), растворенных в DMSO, оценивали в культуре перивисаемых Т-лимфоцитов человека (линия МТ-4). Установлено, что 50% цитотоксическая доза (CD₅₀) для исследованных соединений равна соответственно 34 (29.69 мкМ) и 32.5 мкг/мл (28.38 мкМ).

Анти-ВИЧ-активность соединений (VIII), (IX) в нетоксичных концентрациях изучали на традиционной модели первично инфицированной ВИЧ-1 культуры клеток МТ-4 с использованием штамма ВИЧ-1/ЭВК. Противовирусное действие оценивали по ингибированию накопления вирусспецифического белка р24. Кроме того, определяли анти-ВИЧ-активность, исходя из степени защиты инфицированных клеток от гибели в результате вирусной инфекции. В качестве эталонного препарата применяли известный анти-ВИЧ-препарат – азидотимидин (АЗТ) (табл. 2). В результате проведенных экспериментов показано, что оба исследованных соединения в концентрациях 0.5–20 мкг/мл практически не защищают инфицированные клетки от гибели, но в то же время обладают средневыраженной анти-ВИЧ-1-активностью, обеспечивая 50–70% ингибирование р24 (50% ингибирующая доза (ID₅₀) для соединения (VIII) составила 0.35, для (IX) – 0.09 мкМ), причем конъюгат (IX) обладает более высоким терапевтическим индексом (IS 315.33).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хроматографию в тонком слое проводили на пластинках Silufol (Чехия) и Kizelgel F-60 (Merck, Германия). 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 (СГ) (40/100 мкм) (Чехия).

ИК-спектры (ν, см⁻¹) снимали на спектрометре Specord M-80 в пасте с вазелиновым маслом. УФ-спектры записаны на спектрофотометре Specord UF-400 в метаноле или этаноле. Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР (δ, м.д.; J, Гц) снимали на спектрометре Bruker AM-300 с рабочей частотой 300 и 75.5 МГц с широкополосным и внерезонансным подавлением по протонам в дейтерохлороформе (где не указано особо), внутренний стандарт – тетраметилсилан. Оптическую активность измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 241МС в трубке длиной 1 дм. Температуры плавления определяли на микростоліке Voetius.

Для работы использовали DCC фирмы “Aldrich”. Диметилформаид и пиридин выдерживали сутки над КОН и перегоняли над ВаО. Очистку других растворителей проводили по методикам [27].

Таблица 2. Количественные характеристики анти-ВИЧ-1-активности конъюгатов ГК (VIII), (IX) в культуре клеток МТ-4

Соединение	CD ₅₀ , мкМ	ID ₅₀ , мкМ	IS
(VIII)	29.69	0.35	84.83
(IX)	28.38	0.09	315.33
Азидотимидин	40	0.014	2857.14

Растворители упаривали в вакууме при 50–60°C. В работе использовали глицирризиновую кислоту (ГК) (92 ± 2%), полученную по методу [28], ее 30-метиловый эфир (II), полученный по методу [29].

Гидрохлорид 2-амино-1,3,4,6-тетра-О-ацетил-2-дезоксидеокси-α-D-глюкопиранозы (X) получен по методике [30] из ацетохлорглюкозамина и перекристаллизован из ледяной СН₃СООН (белые иглы).

Выход 54.8%. Т. разл. 182–183°C; [α]_D²⁰ +138 ± 2° (с 0.04; Н₂О). ИК-спектр: 1770, 1750 (ОАс); 1610, 1600 (NH₃ + Cl); 1540 (NH). Спектр ¹H-ЯМР: 1.96; 2.06; 2.08; 2.10 (12 H, все с, 4Ас); 4.00–4.15 (2 H, м, Н_{6а}, Н_{6б}); 4.26–5.22 (м, Н₃, Н₄, Н₅); 5.68 (2 H, т, NH₂); 6.18 (1 H, д, J 3.5, Н₁). Спектр ¹³C-ЯМР: 171.69; 170.62; 169.20; 168.57 (С=О Ас); 90.73 (С₁); 71.05 (С₅); 69.78 (С₄); 67.64 (С₃); 61.62 (С₆); 51.15 (С₂); 22.99; 20.86; 20.65; 20.52 (4 СН₃ Ас). Лит. [30]:

[α]_D²⁰ +141° (с 1; Н₂О). Ацетохлорглюкозамин получали по методу [31]. Т. пл. 126–127°C; [α]_D²⁰ +115 ± 2° (с 0.05; СНСl₃). Лит. [31]: Т. пл. 133–134°C; [α]_D²⁰ +118° (с 1; СНСl₃).

2-Ацетамидо-2-дезоксидеокси-3,4,6-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозиламин (XI). 1. К раствору 3.7 г (10 ммоль) ацетохлорглюкозамина в 60 мл сухого DMF прибавили 9.0 г NaN₃ и нагревали при 70–75°C 24 ч. Смесь разбавили 200 мл холодной воды, экстрагировали хлороформом (3 × 50 мл) и водой. Объединенные хлороформные извлечения сушили MgSO₄ и упарили в вакууме. Остаток (2.7 г) перекристаллизовали из этанола. Выход 2-ацетамидо-2-дезоксидеокси-3,4,6-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилазида 66.5%. Т. пл. 165–167°C; [α]_D²⁰ –45 ± 2° (с 0.04; СНСl₃). ИК-спектр: 2130 (N₃); 1740 (ОАс); 1660 (С=О). Спектр ¹³C-ЯМР: 87.58 (С₁); 57.48 (С₂); 72.47 (С₃); 68.05 (С₄); 74.18 (С₅); 61.56 (С₆). Лит. [32]: Т. пл. 166–168°C; [α]_D²⁴ –50° (с 0.83; СНСl₃); [33]: Т. пл. 169–170°C; [α]_D²⁰ –43.8° (с 2.0; СНСl₃); [34]: Т. пл. 166–168°C; [α]_D²⁰ –60° (с 2.0; СНСl₃).

2. К раствору 2.0 г (5.4 ммоль) 2-ацетамидо-2-дезоксидеокси-3,4,6-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилазида в 40 мл этилацетата прибавили 3.0 г свежее

приготовленного никеля Ренея и гидрировали при 20–22°C и атмосферном давлении 72 ч. Катализатор отфильтровали, фильтрат упарили при 20–22°C. Остаток перекристаллизовали из метанола. Выход 76.2%. ИК-спектр: 1760, 1740 (Ac); 1670 (C=O); 1570 (NH). Спектр ¹³C-ЯМР: 85.05 (C1); 52.32 (C2); 72.80 (C3); 69.02 (C4); 73.45 (C5); 62.56 (C6). Т. пл. 150–152°C (разл.); $[\alpha]_D^{20} -15 \pm 2^\circ$ (с 0.02; CHCl₃). Лит. [32]: Т. пл. 152–153°C (разл.); $[\alpha]_D^{20} -13^\circ$ (с 1.0; CHCl₃); [34]: Т. пл. 150°C (разл.); $[\alpha]_D^{23} -25.5^\circ$ (с 2.0; CHCl₃).

2,3,4,6-Тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозиламин (XII). 1. Смесь 3.4 г (8 ммоль) 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-α-D-глюкопиранозилбромида и 5.0 г NaN₃ в 20 мл DMF перемешивали при 70–75°C 3 сут., разбавили 100 мл холодной воды и экстрагировали хлороформом (3 × 50 мл). Хлороформный экстракт промыли водой, сушили MgSO₄ и упарили. Остаток перекристаллизовали из смеси хлороформ–эфир. Выход 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилазида 67.8%. Т. пл. 128–130°C. ИК-спектр: 2140 (N₃). Найдено, %: N 11.05. C₁₄H₁₉O₉N₃. Вычислено, %: N 11.20. Спектр ¹³C-ЯМР: 87.98 (C1); 70.90 (C2); 72.75 (C3); 68.10 (C4); 74.16 (C5); 61.75 (C6).

2. К раствору 2.0 г 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилазида в 20 мл этилацетата добавили 3.0 г никеля Ренея и гидрировали при 20–22°C 72 ч. Катализатор отфильтровали, фильтрат упарили, остаток перекристаллизовали из этанола. Выход 1.27 г (68.5%). Т. пл. 138–140°C; $[\alpha]_D^{20} +28^\circ$ (с 0.04; CHCl₃). Спектр ¹³C-ЯМР: 84.96 (C1); 72.25 (C2); 72.77 (C3); 69.10 (C4); 73.38 (C5); 62.48 (C6). Лит. [32]: $[\alpha]_D^{20} +26.7^\circ$ (CHCl₃).

2,3,4-Три-О-ацетил-α-L-арабинопиранозиламин (XIII). 1. К раствору 5.4 г 2,3,4-три-О-ацетил-β-L-арабинопиранозилбромида в 40 мл сухого DMF прибавили 11 г NaN₃ и нагревали при 70–75°C 72 ч. Смесь разбавили водой, экстрагировали хлороформом, промыли водой и сушили MgSO₄. Растворитель упарили в вакууме, остаток перекристаллизовали из метанола. Выход 2,3,4-три-О-ацетил-α-L-арабинопиранозилазида 58.5%. Т. пл. 84–86°C; $[\alpha]_D^{20} -5^\circ$ (с 0.04; CHCl₃). ИК-спектр: 2130 (N₃); 1750 (Ac). Найдено, %: N 13.46. C₁₁H₁₅O₇N₃. Вычислено, %: N 13.95.

2. К раствору 1.0 г 2,3,4-три-О-ацетил-α-L-арабинопиранозилазида в 20 мл этанола прибавили 3.0 г никеля Ренея и гидрировали при 20–22°C 72 ч. Катализатор отфильтровали, фильтрат упарили. Получили 0.74 г (81%) сырого арабинопиранозиламина (XIII), который использовали в синтезе без дальнейшей очистки. ИК-спектр: 3400–3200 (NH₂); 1760 (Ac); 1680 (C=O); 1560 (NH).

2-Ацетида-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозиламин (XIV) получали по методикам [17, 20] в виде

аморфного вещества. Выход 56%. $[\alpha]_D^{20} -4.5^\circ$ (с 0.5; H₂O). Лит. [17]: $[\alpha]_D^{20} -4.7^\circ$ (с 1.7; H₂O).

β-D-Галактопиранозиламин (XV) был получен по методикам [17, 18, 20] с содержанием ~80% и использовался в синтезе без дополнительной очистки.

Общая методика получения конъюгатов 30-метилового эфира глицирризиновой кислоты (III)–(V). К раствору 0.45 г (0.5 ммоль) 30-метилового эфира ГК (II) в смеси 10 мл DMF и 2 мл пиридина при 0–5°C прибавили 1.4 ммоль сахара (XI)–(XIII) и 0.24 г (1 ммоль) DCC. Смесь перемешивали при этой температуре 1 ч, выдержали при 20–22°C 20 ч и отфильтровали осадок N,N'-дициклогексилмочевини. Фильтрат разбавили холодной водой, подкислили лимонной кислотой до pH ~ 3, осадок отфильтровали, высушили и хроматографировали на колонке с СГ, элюируя смесью CHCl₃–MeOH–H₂O с соотношением 300 : 10 : 1, 200 : 10 : 1 или 100 : 10 : 1. Фракции с целевыми продуктами объединяли и упаривали.

Гликоконъюгат 30-метилового эфира глицирризиновой кислоты с 2-ацетида-2-дезоксид-3,4,6-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозиламином (III). Выход 40%. R_f 0.22 (CHCl₃–EtOH, 10 : 1). ИК-спектр: 1760 (OAc); 1670 (C11=O); 1560 (CONH). УФ-спектр (MeOH): λ_{max} 248 нм (lgε 4.04). Найдено, %: N 3.53. C₇₁H₁₀₄O₃₀N₄. Вычислено, %: N 3.22. Спектр ¹H-ЯМР (CD₃OD): 0.70–1.30 (21 H, 7 CH₃), 1.80–2.00 (36 H, 12 Ac), 3.65 (3 H, с, OCH₃), 5.60 (1 H, с, H12), 7.20 (4 NH). Спектр ¹³C-ЯМР (CD₃OD): 39.31 (C1); 92.55 (C3); 55.10 (C5); 61.4 (C9); 200.3 (C11); 128.71 (C12); 171.32 (C13); 48.07 (C18); 44.14 (C20); 175.20 (C30); 51.82 (C31); 104.00 (C1"); 103.00 (C1'); 84.50 (C2"); 73.20 (C3"); 72.64 (C4"); 73.31 (C5"); 71.17 (C2"); 72.65 (C4"); 170.83 (C6"); 170.20 (C6"); 91.76; 91.00 (C1 GlcN); 52.75; 52.38 (C2 GlcN); 61.88; 61.73 (C6 GlcN); Ac: 170.05; 169.76; 169.22; 168.58 (C=O); 20.95; 20.68; 20.63; 20.20 (CH₃).

Гликоконъюгат 30-метилового эфира глицирризиновой кислоты с 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозиламином (IV). Выход 50%. Т. пл. 102–104°C (водный EtOH). R_f 0.53 (CHCl₃–EtOH, 10 : 1). ИК-спектр: 3600–3200 (OH, NH), 1760 (OAc); 1670 (C11=O); 1550 (CONH). Найдено, %: N 2.32. C₇₀H₁₀₂O₂₅N₂. Вычислено, %: N 2.03. Спектр ¹H-ЯМР: 0.80; 0.86; 1.00; 1.12; 1.12; 1.24; 1.36 (21 H, все с, 7CH₃); 1.95–2.10 (8 OAc); 2.85 (1 H, с, H18); 3.60 (3 H, с, OCH₃); 5.70 (1 H, с, H12). Спектр ¹³C-ЯМР: 39.15 (C1); 90.09 (C3); 54.98 (C5); 61.85 (C9); 200.37 (C11); 128.74 (C12); 169.64 (C13); 48.13 (C18); 42.88 (C20); 174.50 (C30); 52.55 (C31); 104.00 (C1"); 171.68; 171.25 (C6'; C6"); 90.47; 89.97 (C1 Glc); 62.10; 62.55 (C6 Glc); Ac: 168.83; 169.29; 169.72; 168.97; 170.25; 170.85; 170.92 (C=O); 20.61; 20.66; 20.73 (CH₃).

(ID₅₀ 4 мкг/мл) в отношении вируса простого герпеса типа 1 (HSV-1).

Цитотоксичность конъюгатов (VIII), (IX), растворенных в DMSO, оценивали в культуре перевиваемых Т-лимфоцитов человека (линия МТ-4). Установлено, что 50% цитотоксическая доза (CD₅₀) для исследованных соединений равна соответственно 34 (29.69 мкМ) и 32.5 мкг/мл (28.38 мкМ).

Анти-ВИЧ-активность соединений (VIII), (IX) в нетоксичных концентрациях изучали на традиционной модели первично инфицированной ВИЧ-1 культуры клеток МТ-4 с использованием штамма ВИЧ-1/ЭВК. Противовирусное действие оценивали по ингибированию накопления вирусспецифического белка р24. Кроме того, определяли анти-ВИЧ-активность, исходя из степени защиты инфицированных клеток от гибели в результате вирусной инфекции. В качестве эталонного препарата применяли известный анти-ВИЧ-препарат – азидотимидин (АЗТ) (табл. 2). В результате проведенных экспериментов показано, что оба исследованных соединения в концентрациях 0.5–20 мкг/мл практически не защищают инфицированные клетки от гибели, но в то же время обладают средневыраженной анти-ВИЧ-1-активностью, обеспечивая 50–70% ингибирование р24 (50% ингибирующая доза (ID₅₀) для соединения (VIII) составила 0.35, для (IX) – 0.09 мкМ), причем конъюгат (IX) обладает более высоким терапевтическим индексом (IS 315.33).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хроматографию в тонком слое проводили на пластинках Silufol (Чехия) и Kizelgel F-60 (Merck, Германия). 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 (СГ) (40/100 мкм) (Чехия).

ИК-спектры (ν, см⁻¹) снимали на спектрометре Specord M-80 в пасте с вазелиновым маслом. УФ-спектры записаны на спектрофотометре Specord UF-400 в метаноле или этаноле. Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР (δ, м.д.; J, Гц) снимали на спектрометре Bruker AM-300 с рабочей частотой 300 и 75.5 МГц с широкополосным и внезонансным подавлением по протонам в дейтерохлороформе (где не указано особо), внутренний стандарт – тетраметилсилан. Оптическую активность измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 241МС в трубке длиной 1 дм. Температуры плавления определяли на микроплатинке Voetius.

Для работы использовали DCC фирмы “Aldrich”. Диметилформамид и пиридин выдерживали сутки над КОН и перегоняли над ВаО. Очистку других растворителей проводили по методикам [27].

Таблица 2. Количественные характеристики анти-ВИЧ-1-активности конъюгатов ГК (VIII), (IX) в культуре клеток МТ-4

Соединение	CD ₅₀ , мкМ	ID ₅₀ , мкМ	IS
(VIII)	29.69	0.35	84.83
(IX)	28.38	0.09	315.33
Азидотимидин	40	0.014	2857.14

Растворители упаривали в вакууме при 50–60°C. В работе использовали глицирризиновую кислоту (ГК) (92 ± 2%), полученную по методу [28], ее 30-метиловый эфир (II), полученный по методу [29].

Гидрохлорид 2-амино-1,3,4,6-тетра-О-ацетил-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозы (X) получен по методике [30] из ацетохлорглюкозамина и перекристаллизован из ледяной СН₃СООН (белые иглы).

Выход 54.8%. Т. разл. 182–183°C; [α]_D²⁰ +138 ± 2° (с 0.04; Н₂О). ИК-спектр: 1770, 1750 (ОАс); 1610, 1600 (NH₃ + Cl); 1540 (NH). Спектр ¹H-ЯМР: 1.96; 2.06; 2.08; 2.10 (12 H, все с, 4Ас); 4.00–4.15 (2 H, м, Н_{6а}, Н_{6б}); 4.26–5.22 (м, Н₃, Н₄, Н₅); 5.68 (2 H, т, NH₂); 6.18 (1 H, д, J 3.5, Н₁). Спектр ¹³C-ЯМР: 171.69; 170.62; 169.20; 168.57 (С=О Ас); 90.73 (С₁); 71.05 (С₅); 69.78 (С₄); 67.64 (С₃); 61.62 (С₆); 51.15 (С₂); 22.99; 20.86; 20.65; 20.52 (4 СН₃ Ас). Лит. [30]:

[α]_D²⁰ +141° (с 1; Н₂О). Ацетохлорглюкозамин получали по методу [31]. Т. пл. 126–127°C; [α]_D²⁰ +115 ± 2° (с 0.05; СНСl₃). Лит. [31]; Т. пл. 133–134°C; [α]_D²⁰ +118° (с 1; СНСl₃).

2-Ацетамидо-2-дезоксид-3,4,6-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозиламин (XI). 1. К раствору 3.7 г (10 ммоль) ацетохлорглюкозамина в 60 мл сухого DMF прибавили 9.0 г NaN₃ и нагревали при 70–75°C 24 ч. Смесь разбавили 200 мл холодной воды, экстрагировали хлороформом (3 × 50 мл) и водой. Объединенные хлороформные извлечения сушили MgSO₄ и упарили в вакууме. Остаток (2.7 г) перекристаллизовали из этанола. Выход 2-ацетамидо-2-дезоксид-3,4,6-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилазида 66.5%. Т. пл. 165–167°C; [α]_D²⁰ –45 ± 2° (с 0.04; СНСl₃). ИК-спектр: 2130 (N₃); 1740 (ОАс); 1660 (С=О). Спектр ¹³C-ЯМР: 87.58 (С₁); 57.48 (С₂); 72.47 (С₃); 68.05 (С₄); 74.18 (С₅); 61.56 (С₆). Лит. [32]: Т. пл. 166–168°C; [α]_D²⁴ –50° (с 0.83; СНСl₃); [33]: Т. пл. 169–170°C; [α]_D²⁰ –43.8° (с 2.0; СНСl₃); [34]: Т. пл. 166–168°C; [α]_D²⁰ –60° (с 2.0; СНСl₃).

2. К раствору 2.0 г (5.4 ммоль) 2-ацетамидо-2-дезоксид-3,4,6-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилазида в 40 мл этилацетата прибавили 3.0 г свеже-

приготовленного никеля Ренея и гидрировали при 20–22°C и атмосферном давлении 72 ч. Катализатор отфильтровали, фильтрат упарили при 20–22°C. Остаток перекристаллизовали из метанола. Выход 76.2%. ИК-спектр: 1760, 1740 (Ac); 1670 (C=O); 1570 (NH). Спектр ¹³C-ЯМР: 85.05 (C1); 52.32 (C2); 72.80 (C3); 69.02 (C4); 73.45 (C5); 62.56 (C6). Т. пл. 150–152°C (разл.); $[\alpha]_D^{20} -15 \pm 2^\circ$ (с 0.02; CHCl₃). Лит. [32]: Т. пл. 152–153°C (разл.); $[\alpha]_D^{20} -13^\circ$ (с 1.0; CHCl₃); [34]: Т. пл. 150°C (разл.); $[\alpha]_D^{23} -25.5^\circ$ (с 2.0; CHCl₃).

2,3,4,6-Тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозиламин (XII). 1. Смесь 3.4 г (8 ммоль) 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-α-D-глюкопиранозилбромида и 5.0 г NaN₃ в 20 мл DMF перемешивали при 70–75°C 3 сут., разбавили 100 мл холодной воды и экстрагировали хлороформом (3 × 50 мл). Хлороформный экстракт промыли водой, сушили MgSO₄ и упарили. Остаток перекристаллизовали из смеси хлороформ–эфир. Выход 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилазида 67.8%. Т. пл. 128–130°C. ИК-спектр: 2140 (N₃). Найдено, %: N 11.05. C₁₄H₁₉O₉N₃. Вычислено, %: N 11.20. Спектр ¹³C-ЯМР: 87.98 (C1); 70.90 (C2); 72.75 (C3); 68.10 (C4); 74.16 (C5); 61.75 (C6).

2. К раствору 2.0 г 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилазида в 20 мл этилацетата добавили 3.0 г никеля Ренея и гидрировали при 20–22°C 72 ч. Катализатор отфильтровали, фильтрат упарили, остаток перекристаллизовали из этанола. Выход 1.27 г (68.5%). Т. пл. 138–140°C; $[\alpha]_D^{20} +28^\circ$ (с 0.04; CHCl₃). Спектр ¹³C-ЯМР: 84.96 (C1); 72.25 (C2); 72.77 (C3); 69.10 (C4); 73.38 (C5); 62.48 (C6). Лит. [32]: $[\alpha]_D^{20} +26.7^\circ$ (CHCl₃).

2,3,4-Три-О-ацетил-α-L-арабинопиранозиламин (XIII). 1. К раствору 5.4 г 2,3,4-три-О-ацетил-β-L-арабинопиранозилбромида в 40 мл сухого DMF прибавили 11 г NaN₃ и нагревали при 70–75°C 72 ч. Смесь разбавили водой, экстрагировали хлороформом, промыли водой и сушили MgSO₄. Растворитель упарили в вакууме, остаток перекристаллизовали из метанола. Выход 2,3,4-три-О-ацетил-α-L-арабинопиранозилазида 58.5%. Т. пл. 84–86°C; $[\alpha]_D^{20} -5^\circ$ (с 0.04; CHCl₃). ИК-спектр: 2130 (N₃); 1750 (Ac). Найдено, %: N 13.46. C₁₁H₁₅O₇N₃. Вычислено, %: N 13.95.

2. К раствору 1.0 г 2,3,4-три-О-ацетил-α-L-арабинопиранозилазида в 20 мл этанола прибавили 3.0 г никеля Ренея и гидрировали при 20–22°C 72 ч. Катализатор отфильтровали, фильтрат упарили. Получили 0.74 г (81%) сырого арабинопиранозиламина (XIII), который использовали в синтезе без дальнейшей очистки. ИК-спектр: 3400–3200 (NH₂); 1760 (Ac); 1680 (C=O); 1560 (NH).

2-Ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозиламин (XIV) получали по методикам [17, 20] в виде

аморфного вещества. Выход 56%. $[\alpha]_D^{20} -4.5^\circ$ (с 0.5; H₂O). Лит. [17]: $[\alpha]_D^{20} -4.7^\circ$ (с 1.7; H₂O).

β-D-Галактопиранозиламин (XV) был получен по методикам [17, 18, 20] с содержанием ~80% и использовался в синтезе без дополнительной очистки.

Общая методика получения конъюгатов 30-метилового эфира глицирризиновой кислоты (III)–(V). К раствору 0.45 г (0.5 ммоль) 30-метилового эфира ГК (II) в смеси 10 мл DMF и 2 мл пиридина при 0–5°C прибавили 1.4 ммоль сахара (XI)–(XIII) и 0.24 г (1 ммоль) DCC. Смесь перемешивали при этой температуре 1 ч, выдержали при 20–22°C 20 ч и отфильтровали осадок N,N'-дициклогексилмочевины. Фильтрат разбавили холодной водой, подкислили лимонной кислотой до pH ~ 3, осадок отфильтровали, высушили и хроматографировали на колонке с СГ, элюируя смесью CHCl₃–MeOH–H₂O с соотношением 300 : 10 : 1, 200 : 10 : 1 или 100 : 10 : 1. Фракции с целевыми продуктами объединяли и упаривали.

Гликоконъюгат 30-метилового эфира глицирризиновой кислоты с 2-ацетамидо-2-дезоксид-3,4,6-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозиламином (III). Выход 40%. R_f 0.22 (CHCl₃–EtOH, 10 : 1). ИК-спектр: 1760 (OAc); 1670 (C11=O); 1560 (CONH). УФ-спектр (MeOH): λ_{max} 248 нм (lg ε 4.04). Найдено, %: N 3.53. C₇₁H₁₀₄O₃₀N₄. Вычислено, %: N 3.22. Спектр ¹H-ЯМР (CD₃OD): 0.70–1.30 (21 H, 7 CH₃), 1.80–2.00 (36 H, 12 Ac), 3.65 (3 H, с, OCH₃), 5.60 (1 H, с, H12), 7.20 (4 NH). Спектр ¹³C-ЯМР (CD₃OD): 39.31 (C1); 92.55 (C3); 55.10 (C5); 61.4 (C9); 200.3 (C11); 128.71 (C12); 171.32 (C13); 48.07 (C18); 44.14 (C20); 175.20 (C30); 51.82 (C31); 104.00 (C1''); 103.00 (C1'); 84.50 (C2'); 73.20 (C3'); 72.64 (C4'); 73.31 (C5'); 71.17 (C2''); 72.65 (C4''); 170.83 (C6'); 170.20 (C6''); 91.76; 91.00 (C1 GlcN); 52.75; 52.38 (C2 GlcN); 61.88; 61.73 (C6 GlcN); Ac: 170.05; 169.76; 169.22; 168.58 (C=O); 20.95; 20.68; 20.63; 20.20 (CH₃).

Гликоконъюгат 30-метилового эфира глицирризиновой кислоты с 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозиламином (IV). Выход 50%. Т. пл. 102–104°C (водный EtOH). R_f 0.53 (CHCl₃–EtOH, 10 : 1). ИК-спектр: 3600–3200 (OH, NH), 1760 (OAc); 1670 (C11=O); 1550 (CONH). Найдено, %: N 2.32. C₇₀H₁₀₂O₂₅N₂. Вычислено, %: N 2.03. Спектр ¹H-ЯМР: 0.80; 0.86; 1.00; 1.12; 1.12; 1.24; 1.36 (21 H, все с, 7CH₃); 1.95–2.10 (8 OAc); 2.85 (1 H, с, H18); 3.60 (3 H, с, OCH₃); 5.70 (1 H, с, H12). Спектр ¹³C-ЯМР: 39.15 (C1); 90.09 (C3); 54.98 (C5); 61.85 (C9); 200.37 (C11); 128.74 (C12); 169.64 (C13); 48.13 (C18); 42.88 (C20); 174.50 (C30); 52.55 (C31); 104.00 (C1''); 171.68; 171.25 (C6'; C6''); 90.47; 89.97 (C1 Glc); 62.10; 62.55 (C6 Glc); Ac: 168.83; 169.29; 169.72; 168.97; 170.25; 170.85; 170.92 (C=O); 20.61; 20.66; 20.73 (CH₃).

Гликоконъюгат 30-метилового эфира глицирризиновой кислоты с 2,3,4-три-*O*-ацетил- α -*L*-арабинопиранозиламином (V). Выход 46%. ИК-спектр: 3600–3200 (ОН, NH), 1740 (ОАс); 1670 (C11=O); 1540 (CONH). Спектр ^1H -ЯМР: 0.76; 0.84; 0.96; 1.05; 1.20; 1.34; 1.36 (21 H, все с, 7 CH₃); 1.96–2.10 (18 H, 6 Ac); 2.80 (1 H, с, H18); 3.70 (1 H, с, OCH₃); 5.00–5.40 (м, H3'; H3"; H1'; H1"; H1 AraN); 5.68 (1 H, с, H12). Спектр ^{13}C -ЯМР: 39.12 (C1); 90.21 (C3); 61.85 (C9); 200.32 (C11); 128.71 (C12); 169.68 (C13); 177.86 (C30); 101.82 (C1"; C1'); 170.65; 170.42 (C6'; C6"); 93.36; 92.84 (C1 Ara).

Общая методика получения конъюгатов глицирризиновой кислоты (VI), (VIII), (IX). 1. К раствору 0.82 г (1 ммоль) ГК в смеси 20 мл DMF и 10 мл пиридина при 0–5°C прибавили 2.1–2.5 ммоль сахара (X), (XIV), (XV) и 0.46 г (2 ммоль) DCC, перемешивали при этой температуре 1 ч, выдержали при 20–22°C 20 ч. Осадок *N,N*-дициклогексилмочевины отфильтровали, фильтрат разбавили холодной водой, подкислили лимонной кислотой до pH ~ 3. Осадок отфильтровали, промыли водой и сушили. Продукт дважды хроматографировали на СГ колонке, элюируя смесью CHCl₃–MeOH–H₂O, 200 : 10 : 1, 100 : 10 : 1, 50 : 10 : 1.

2. К раствору 0.41 г (0.5 ммоль) ГК в 10 мл DMF и 5 мл пиридина прибавили 1.20–1.25 ммоль сахара (X), (XIV), (XV), 1.00–1.20 ммоль DCC и 0.14–0.17 г (1–1.25 ммоль) *N*-гидроксибензотриазола и перемешивали смесь при 20–22°C 12 ч. Осадок *N,N*-дициклогексилмочевины отфильтровали, фильтрат упарили, остаток хроматографировали на колонке с СГ, элюируя смесью CHCl₃–MeOH–H₂O, 200 : 10 : 1, 100 : 10 : 1, 50 : 10 : 1.

Конъюгат глицирризиновой кислоты с 2-амино-1,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-2-дезоксид- α -*D*-глюкопиранозой (VI). Выход 40.5% (по способу 1); 60.5% (по способу 2) (белый порошок). R_f 0.5 (CHCl₃–MeOH–H₂O, 45 : 10 : 1); $[\alpha]_D^{20} +45 \pm 2^\circ$ (с 0.04; MeOH). ИК-спектр: 3600–3200 (ОН, NH), 1750 (ОАс); 1670 (C11=O); 1550 (CONH). УФ-спектр (MeOH): λ_{\max} 246 нм (lg ϵ 4.25). Спектр ^1H -ЯМР: 1.00; 1.08; 1.10; 1.12; 1.15; 1.24; 1.38 (21 H, все с, 7 CH₃); 1.90–2.00 (24 H, 8 Ac); 2.38 (1 H, с, H9); 3.25–3.60 (4 H, м, H4, H5 GlcN); 3.64–3.74 (4 H, м, H3, H6 GlcN); 3.90–4.08 (2 H, м, H5', H6 GlcN); 4.16–4.26 (2 H, м, H5', H6 GlcN); 4.95; 4.99 (2 H, оба уш. с, H1 GlcN); 5.14 (1 H, с, H3'); 5.28 (1 H, т, J_1 9.2; J_2 9.6, H3'); 5.54 (1 H, с, H12); 7.80; 7.12 (2 H, оба с, NH). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl₃ + CD₃OD): 38.45 (C1); 88.67 (C3); 56.19 (C5); 44.57 (C8); 35.82 (C10); 208.55 (C11); 126.79 (C12); 170.34 (C13); 178.22 (C30); 103.05 (C1"); 102.55 (C1'); 71.73 (C4'); 70.76 (C4"); 75.08 (C5"); 75.05 (C5'); 168.93 (C6'); 169.24 (C6"); 90.41; 90.13 (C1 GlcN); 68.31; 67.97 (C4 GlcN); 61.39; 60.91 (C6 GlcN); 54.26; 53.27 (C2 GlcN); Ac: 170.63; 170.34; 170.00; 169.50 (C=O).

Найдено, %: N 2.00. C₇₀H₁₀₀O₃₂N₂. Вычислено, %: N 1.89. В качестве примеси при хроматографировании продукта реакции была выделена исходная ГК (более полярная фракция) (30%), идентифицированная по ТСХ с заведомым образцом (R_f 0.3) и спектру ^{13}C -ЯМР [35].

Конъюгат глицирризиновой кислоты с 2-амино-2-дезоксид- α -*D*-глюкопиранозой (VII). Смесь 0.5 г конъюгата (VI), 5 мл хлористого метилена и 5 мл 1% КОН в метаноле перемешивали 1 ч при 20–22°C, упарили растворители, остаток растворили в 20 мл метанола и обработали катионитом КУ-2-8 (H⁺) до pH ~ 5, катионит отфильтровали, промыли 10 мл метанола, фильтрат упарили. Остаток переосадили из сухого метанола эфиром. Выход 84%. $[\alpha]_D^{20} +50 \pm 2^\circ$ (с 0.02; EtOH). ИК-спектр: 3600–3200 (ОН, NH), 1710 (COOH); 1660 (C11=O); 1540 (CONH). УФ-спектр (EtOH): λ_{\max} 251 нм (lg ϵ 3.96). Спектр ^{13}C -ЯМР (DMF-*d*₇): 39.93 (C1); 89.29 (C3); 54.98 (C5); 43.74 (C8); 199.86 (C11); 128.20 (C12); 49.02 (C18); 44.03 (C20); 178.70 (C30); 104.97 (C1"); 104.28 (C1'); 82.00 (C2'); 74.25; 73.07 (C3"; C3'); 72.40; 72.98 (C4', C4"); 77.20; 76.79 (C5", C5'); 170.57 (C6', C6"); 91.89; 91.78 (C1 GlcN); 55.47; 55.13 (C2 GlcN); 75.91; 75.48 (C3 GlcN); 72.23; 72.06 (C4 GlcN); 62.42; 62.13 (C6 GlcN). Найдено, %: N 2.32. C₅₄H₁₀₄O₂₄N₂. Вычислено, %: N 2.40.

Гликоконъюгат глицирризиновой кислоты с 2-ацетиамидо-2-дезоксид- β -*D*-глюкопиранозиламином (VIII). Выход 42% (по способу 1); 60% (по способу 2). R_f 0.36 (CH₂Cl₂–EtOH, 3 : 1); $[\alpha]_D^{20} +80 \pm 2^\circ$ (с 0.06; MeOH). ИК-спектр: 3600–3200 (ОН, NH); 1660 (C11=O); 1550 (CONH). УФ-спектр (MeOH): λ_{\max} 249 нм (lg ϵ 4.20). Спектр ^1H -ЯМР (DMF-*d*₇): 0.70–1.40 (21 H, 7 CH₃); 2.10; 2.15 (6 H, оба с, 2 Ac); 2.56 (1 H, с, H18); 5.50 (1 H, с, H12). Спектр ^{13}C -ЯМР (DMF-*d*₇, δ , м. д.): 39.45 (C1); 89.70 (C3); 56.19 (C5); 200.03 (C11); 128.20 (C12); 172.69 (C13); 45.79 (C20); 178.51 (30); 105.00 (C1"); 104.34 (C1'); 74.80 (C3'); 75.04 (C3"); 72.88 (C4'); 71.50 (C4"); 77.82 (C5"); 77.11 (C5'); 170.66 (C6'; C6"); 92.50; 91.90 (C1 GlcN); 55.56; 55.21 (C2 GlcN); 72.60; 72.10; 69.36; 69.00 (C3–C4 GlcN); 76.00; 75.50 (C5 GlcN); 62.60; 62.40 (C6 GlcN). Найдено, %: N 4.42. C₅₈H₈₆O₂₄N₄. Вычислено, %: N 4.58.

В качестве примеси (28%) при хроматографировании продукта реакции выделена исходная ГК, идентифицированная по ТСХ и спектру ^{13}C -ЯМР.

Гликоконъюгат глицирризиновой кислоты с β -*D*-галактопиранозиламином (IX). Выход 45% (по способу 1); 62% (по способу 2). R_f 0.30 (CHCl₃–EtOH, 3 : 1); $[\alpha]_D^{20} +55 \pm 2^\circ$ (с 0.04; MeOH). ИК-спектр: 3600–3200 (ОН, NH); 1710 (COOH); 1660 (C11=O); 1550 (CONH). УФ-спектр (MeOH): λ_{\max} 249 нм

(lgε 4.20). Найдено, %: N 2.10. C₅₄H₈₄O₂₄N₂. Вычислено, %: N 2.44. Спектр ¹³C-ЯМР (пиридин-d₅, δ, м. д.): 39.56 (C1); 89.50 (C3); 55.50 (C5); 62.02 (C9); 199.64 (C11); 128.49 (C12); 170.00 (C13); 48.62 (C18); 45.45 (C20); 179.12 (30); 104.68 (C6''); 104.59 (C6'); 84.30 (C2'); 75.76 (C3'); 76.79 (C3''); 72.03 (C4'); 71.01 (C4''); 77.55 (C5'; C5''); 168.31 (C6'; C6''); 98.50; 97.90 (C1 Gal); 75.50; 74.50; 74.20; 73.50; 72.70; 71.80; 70.50 (C2–C5 Gal); 62.50; 62.70 (C6 Gal).

Хроматографированием на колонке с СГ выделена также исходная ГК (25%), идентифицированная по ТСХ с меткой.

Цитотоксичность и противовирусную активность конъюгатов ГК (VII)–(IX) оценивали в культуре клеток VERO (линия клеток почек зеленых обезьян ICN). Опыты проводились в дублированных камерах, содержащих около 5×10^4 клеток каждая. Цитотоксичность определяли через 48 ч инкубации в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Максимальная нетоксичная доза (MNTD₅₀) определялась как доза соединения, которая вызывала 50% гибель клеток по сравнению с контролем.

Противовирусную активность определяли в отношении вирусов простого герпеса типа 1 (Herpes simplex virus type 1, HSV-1) и типа 2 (HSV-2). Противовирусный эффект оценивали в монослое клеток, которые инфицировались дважды в количестве одна вирусная частица на 10³ клеток в присутствии исследуемого вещества в концентрациях от 100 до 0.1 мкг/мл. Противовирусное действие определяли исходя из степени защиты инфицированных клеток от гибели в результате вирусной инфекции (цитопатического действия вирусов) в монослое клеток, которое подсчитывалось с помощью микроскопа в сравнении с контролем (необработанные клетки) как ингибирующая доза (ID₅₀) – концентрация соединения, обеспечивающая 50% защиту клеток или на 50% подавляющая репродукцию вируса в клетках после 48 ч инкубирования при 37°C в 5% CO₂ по методике [36]. Результаты опытов представлены в табл. 1.

Анти-ВИЧ-1-активность и цитотоксичность соединений (VIII), (IX) изучали в перевиваемой клеточной линии лимфоцитов человека MT-4 как описано в работах [5, 6]. Для оценки цитотоксичности соединения растворяли в DMSO и в соответствующих разведениях вносили в лунки 96-луночных планшетов (по три на каждое разведение) при расходе клеток MT-4. Посевная концентрация клеток составляла 0.5×10^6 клеток/мл. Клетки культивировали в 96-луночных планшетах для культур клеток фирмы "Costar" (США) на ростовой питательной среде (среда RPMI-1640 с добавлением 10% сыворотки плода коровы, 0.06% L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина) при 37°C и 5% CO₂ в течение 4 сут. По окончании инкубации подсчитывали долю жизнеспособных клеток в камере Горяева после окрашивания трипановым

синим. Строили дозозависимую кривую и определяли концентрацию соединений, вызывающую гибель 50% клеток CD₅₀.

Для оценки анти-ВИЧ-активности исследуемых соединений клетки MT-4 (концентрация 2×10^6 клеток/мл) инфицировали штаммом ВИЧ-1/ЭВК с множественностью заражения 0.2–0.5 инфекционных единиц на клетку. После адсорбции вируса в течение 1 ч при 37°C инфицированные и контрольные клетки (без вируса) разводили ростовой культуральной средой до посевной концентрации 5×10^5 клеток/мл и вносили в лунки 96-луночных культуральных планшетов. Затем в соответствующие лунки вносили растворы исследуемого соединения (по три лунки на каждое разведение) и далее культивировали как описано выше. В качестве эталонного препарата использовали азидотимидин – известный анти-ВИЧ-агент [37]. Конечная концентрация исследуемых препаратов в клеточной суспензии составляла от 0.1 до 20 мкг/мл. Ингибирующий эффект соединений оценивали на 4-е сутки культивирования измерением количества вирусного антигена р24 иммуноферментным методом [38]. По дозозависимым кривым определяли концентрацию соединений, на 50% ингибирующую накопление р24-ID₅₀, и рассчитывали индекс селективности (IS) как отношение цитотоксической дозы к эффективной. Результаты опытов приведены в табл. 2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Шульц Э.Э., Покровский А.Г. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 691–709.
2. Pompei R., Flore O., Marcialis M., Pani A., Loddo B. // Nature. 1979. V. 281. P. 689–690.
3. Ito M., Nakashima H., Baba M., Pauwels R., De Clercq E., Shibata Sh., Yamamoto N. // Antiviral Res. 1987. V. 7. P. 127–137.
4. Hattori T., Ikumatsu S., Koivo A., Matsushita S., Maeda Y., Hada M., Fujimaki M., Takatsuki K. // Antiviral Res. 1989. V. 11. P. 255–262.
5. Плясунова О.А., Егоричева И.Н., Федюк Н.В., Покровский А.Г., Балтина Л.А., Муринов Ю.И., Толстиков Г.А. // Вопросы вирусологии. 1992. Т. 37. С. 235–238.
6. Покровский А.Г., Плясунова О.А., Ильичева Т.Н., Борисова О.А., Федюк Н.В., Петренко Н.И., Петухова В.З., Шульц Э.Э., Толстиков Г.А. // Химия в интересах устойчивого развития. 2001. № 9. С. 485–491.
7. Ito M. // Gikken Igaku. 1989. V. 7. P. 858–860.
8. Tochikara T.S., Nakashima H., Yamamoto N. // G. Acquired Immune Def. Syndrome. 1989. № 2. P. 441–447.
9. Fujisawa K., Watanabe Y., Kimura K. // Asian Med. J. 1980. V. 23. P. 745–756.
10. Покровский А.Г., Беланов Е.Ф., Волков Г.Н., Плясунова О.А., Толстиков Г.А. // Докл. АН. 1995. Т. 344. С. 709–711.

11. Davis B.G. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1999. P. 3215–3237.
12. 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.
13. Bundle D.R., Jennings H.J., Smith I.C.P. // Can. J. Chem. 1973. V. 51. P. 3812–3819.
14. Шаиков А.С., Чижов О.С. // Биоорган. химия. 1976. Т. 2. С. 437–497.
15. Рыжова С.А., Балтина Л.А., Толстиков Г.А. // Журн. общей химии. 1996. Т. 66. С. 160–162.
16. Балтина Л.А., Рыжова С.А., Васильева Е.В., Капина А.П., Толстиков Г.А. // Журн. общей химии. 1993. Т. 63. С. 2140–2147.
17. Лихошерстов Л.М., Новикова О.С., Деревицкая В.А., Кочетков Н.К. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1986. № 7. С. 1663–1669.
18. Лихошерстов Л.М., Новикова О.С., Шибасев В.Н., Кочетков Н.К. // Изв. АН. Сер. хим. 1996. № 7. С. 1848–1851.
19. Лихошерстов Л.М., Новикова О.С., Шибасев В.Н. // Изв. АН. Сер. хим. 1998. № 6. С. 1244–1247.
20. Cohen-Anisfeld Sh.T., Lansbury P.T. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 10531–10537.
21. Lichtenthaler F.W., Kaji E. // Liebigs Ann. Chem. 1985. P. 1659–1668.
22. Земляков А.Е., Курьянов В.О., Чирва В.Я. // Химия природн. соед. 1996. № 3. С. 367–371.
23. Земляков А.Е., Курьянов В.О., Чупахина Т.А., Чирва В.Я., Ищенко В.В., Гарзд М.М., Хиля В.П. // Химия природн. соед. 2002. № 2. С. 125–128.
24. Tariq M.A., Hayashi K., Tokuyasu K., Nagata T. // Carbohydrate Res. 1995. V. 275. P. 67–72.
25. Takeda T., Sugiura Y., Ogihara Y., Shibata S. // Can. J. Chem. 1980. V. 58. P. 2600–2603.
26. Пептиды. Основные методы образования пептидных связей. Ред. В.Т. Иванов. М.: Мир, 1983.
27. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976.
28. Балтина Л.А., Кондратенко Р.М., Мустафина С.Р., Флехтер О.Б., Муринов Ю.И., Давыдова В.А., Зарудий Ф.С., Исмагилова А.Ф., Толстиков Г.А. // Хим.-фарм. журн. 2001. Т. 35. С. 38–41.
29. 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.
30. Marks G.S., Neuberger A. // J. Chem. Soc. 1961. № 11. P. 4872–4879.
31. Методы исследования углеводов. Пер. с англ. Ред. А.Я. Хорлин. М.: Мир, 1975.
32. Marks G.S., Marshall R.D., Neuberger A. // Biochem. J. 1963. V. 87. P. 274–281.
33. Cowley D.E., Heugh L., Peach M.C. // Carbohydr. Res. 1971. V. 19. P. 231–341.
34. Bolton C.H., Hough L., Kham M.Y. // Biochem. J. 1966. V. 101. P. 184–190.
35. 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.
36. Lampis G., Deidda D., Maullu C., Madeddu M., Pompei R. // J. Antibiotics. 1995. V. 48. P. 967–972.
37. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2-х т. Т. 2. Изд. 14-е. М.: ООО Новая волна, 2000.
38. Федюк Н.В., Коновалов Е.Е., Локтев В.Б., Урываев Л.В., Куляндин С.А., Покровский А.Г. // Вопросы вирусол. 1992. № 3. С. 135–138.

The Synthesis and Antiviral Activity of Glycyrrhizic Acid Conjugates with α -D-Glucosamine and Some Glycosylamines

R. M. Kondratenko*, L. A. Baltina[#], S. R. Mustafina*, E. V. Vasil'eva*, R. Pompei^{***}, D. Deidda^{**}, O. A. Plyasunova^{***}, A. G. Pokrovskii^{***}, and G. A. Tolstikov*

[#] E-mail: baltina@anrb.ru

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

**Department of Medical Sciences, University of Cagliari, Italy

***Vector State Scientific Center of Virusology and Biotechnology, pos. Koltsovo, Novosibirsk oblast, 633159 Russia

Glycyrrhizic acid and its 30-methyl ester were conjugated with 2-amino-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy- α -D-glucopyranose, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl amine, 2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-arabinopyranosyl amine, 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl amine, and β -D-galactopyranosyl amine using *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide and its mixtures with *N*-hydroxybenzotriazole. Structures of the conjugates were confirmed by IR, UV, ¹H, and ¹³C NMR spectroscopy. The glycoconjugate with the residues of 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl amine in the carbohydrate part of its molecule exhibited antiviral activity (ID₅₀ 4 μ g/ml) toward the herpes simplex type 1 virus (HSV-1) in the VERO cell culture. Two compounds demonstrated anti-HIV-1 activity (50–70% inhibition of p24) in a culture of MT-4 cells at concentrations of 0.5–20 μ g/ml. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: antiviral activity, glycyrrhizic acid conjugates, D-glucosamine, β -glycosylamines