



УДК 547.962.541.69

СИНТЕЗ И АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ АНАЛОГОВ
ГРАМИЦИДИНА S*Снежкова Л. Г., Шепель Е. Н., Рябова И. Д.,
Миросликов А. И., Иванов В. Т., Обчинников Ю. А.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Осуществлен синтез и исследована антимикробная активность аналогов грамицидина S и [Gly⁶, Gly¹⁰] грамицидина S с измененной конфигурацией асимметрических центров или обращенным направлением ацилирования. На основании полного совпадения как в качественном, так и в количественном отношении активности энантиомерных пар, можно высказать предположение, что наиболее вероятной биологической мишенью таких циклопептидов являются липидные зоны клеточных мембран с их низкой стереоспецифичностью. С другой стороны, широкое варьирование концентраций, подавляющих рост микроорганизмов в ряду грамицидина S, *ретро*-аналога и «полностью L»-грамицидина S указывает на важность конформационных параметров для проявления биологической активности.

Мембрано-активный антибиотик грамицидин S относится к числу наиболее изученных биологически активных пептидов. Сравнительно малые размеры молекулы, простой аминокислотный состав и высокая антимикробная активность создают предпосылки для выяснения закономерностей формирования пространственной структуры в ряду грамицидина S и его многочисленных синтетических производных [1, 2], а также связи между первичной структурой, конформационными состояниями и биологической функцией антибиотика. Исследованиями последних лет [3—5] доказано, что грамицидин S в растворах принимает конформацию складчатого листа, предложенную еще Ходячкин, Оугоном и Швицером на основании косвенных химических данных [6—8] и результатов неполного рентгеноструктурного анализа [9—11]. Найденная структура (см. рисунок) стабилизирована четырьмя внутримолекулярными водородными связями и отличается исключительной жесткостью, поскольку ее конформационные параметры практически не зависят от природы растворителя.

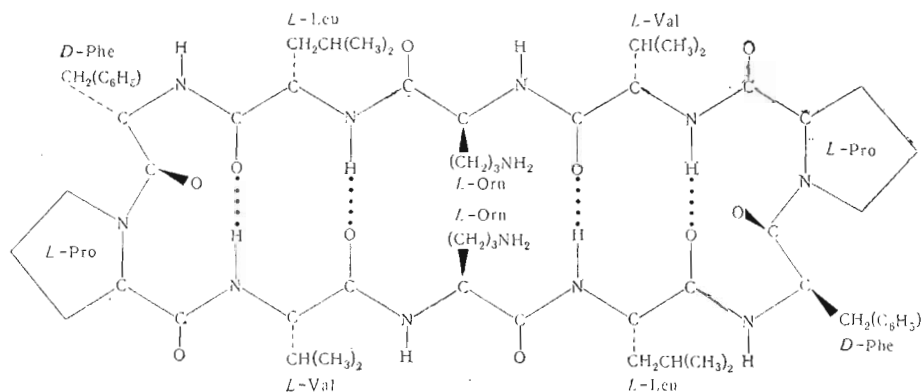
Мы поставили задачу выяснить, насколько найденные конформационные особенности важны для функционирования грамицидина S в мембранных системах. Априори нельзя было исключить возможность того, что для проявления бактерицидного действия необходимо лишь присутствие в молекуле определенного количества гидрофобных и заряженных групп тем более, что многие линейные сополимеры, построенные из аминокислот, входящих в состав грамицидина S, обладают достаточно высокой антибактериальной активностью [12, 13]. Для решения указанной за-

* Приняты сокращения: -ONp — *n*-нитрофенокси-; -ONSu — сукцинимидокси-; ДМФА — N,N'-диметилформамид.

Схема 1

	<i>L</i> -(D)-Val	<i>L</i> -(D)-Orn	<i>L</i> -(D)-Leu	<i>D</i> -(L)-Phe	<i>L</i> -Pro или Gly	<i>L</i> -(D)-Val	<i>L</i> -(D)-Orn	<i>L</i> -(D)-Leu или C ^α -дегидро <i>L</i> -Leu (² H- ¹³ C)	<i>D</i> -(L)-Phe	<i>L</i> -Phe или Gly
(54)-(56)	X	ONSu	X	ONSu	OH (12), (13)	X	X	(14)-(16)	X	OR (11)-(13)
(57), (59)-(61)	X	X	X	X	OH (17), (19)-(21)	X	X	X	X	OR (18)-(21)
(62)-(65)	X	X	X	X	OH (22), (24)-(26)	X	X	X	X	OR (23)-(26)
	X	X	X	X	OH (30), (33)-(35)	X	X	X	X	OR (32)-(36)
	X	X	X	X	OH (36), (38)-(40)	X	X	X	X	OR (37)-(40)
	X	X	X	X	OH (44), (46)-(48)	X	X	X	X	OR (45)-(48)
	X	X	X	X	OH (49), (51)-(53)	X	X	X	X	OR (50)-(53)
	X	X	X	X	OH	X	X	X	X	OR (58)-(61)
	X	X	X	X	ONp	X	X	X	X	OR (66)-(69)
	X	X	X	X		X	X	X	X	OR (70)-(74)
	X	X	X	X		X	X	X	X	ONp (75)-(78)
	X	X	X	X		X	X	X	X	ONp (79)-(82)
										(2), (83)-(85)
										(1), (3), (5), (10)

- (11) *L*; R=But
(12) -; R=H
(13) *L*; R=H
(14) *D*; X=Z
(15) *D*; X=Boc
(16) *L*; X=Boc
(17) *DL*; X=Z
(18) *DL*; R=But; X=Z
(19) *D*-; R=H; X=Boc
(20) *L*-; R=H; X=Boc
(21) *LL*; R=H; X=Boc
(22) *DL*; X=H·CH₃COOH
(23) *DL*; R=But; X=H
(24) *D*-; R=H; X=H·CF₃COOH
(25) *L*-; R=H; X=H·CF₃COOH
(26) *LL*; R=H; X=H·CF₃COOH
(27) *L*; X=Z
(28) ²H; X=Z; Y=H
(29) *L*; X=Boc; Y=NSu
(30) *D*; X=Boc; Y=NSu
(31) *LDL*; X=Z
(32) ²HDL; R=But; X=Z
(33) *LD*-; R=H; X=Boc
(34) *DL*-; R=H; X=Boc
(35) *LLL*; R=H; X=Boc
(36) *LDL*; X=H·CH₃COOH
(37) ²HDL; R=But; X=H
(38) *LD*-; R=H; X=H·CF₃COOH
(39) *DL*-; R=H; X=H·CF₃COOH
(40) *LLL*; R=H; X=H·CF₃COOH
(41) *L*; X=Z; Y=Ac
(42) *L*; X=Boc; Y=Z
(43) *D*; X=Boc; Y=Z
(44) *LLDL*; X=Z; Y=Ac
(45) *L²HDL*; R=But; Y=Ac
(46) *LLD*-; R=H; X=Boc; Y=Z
(47) *DDL*-; R=H; X=Boc; Y=Z
(48) *LLL*; R=H; X=Boc; Y=Z
(49) *LLDL*; X=H·CH₃COOH; Y=Ac
(50) *L²HDL*; R=But; X=H; Y=Ac
(51) *LLD*-; R=H; X=H·CF₃COOH; Y=Z
(52) *DDL*-; R=H; X=H·CF₃COOH; Y=Z
(53) *LLL*; R=H; X=H·CF₃COOH; Y=Z
(54) *L*; X=Z
(55) *L*; X=Boc
(56) *D*; X=Boc
(57) *LLDL*; X=Z; Y=Ac
(58) *LL²HDL*; R=But; X=Z; Y=Ac
(59) *LLLD*-; R=H; X=Boc; Y=Ac
(60) *DDDL*-; R=H; X=Boc; Y=Z
(61) *LLL*; R=H; X=Boc; Y=Z
(62) *LLDL*; X=Z; Y=Ac
(63) *LLLD*-; X=Boc; Y=Z
(64) *DDDL*-; X=Boc; Y=Z
(65) *LLLL*; X=Boc; Y=Z
(66) *L²HDL*; R=But; X=H; Y=Ac
(67) *LLLD*-; R=H; X=H·CF₃COOH; Y=Z
(68) *DDDL*-; R=H; C=H·CF₃COOH; Y=Z
(69) *LLLL*; R=H; X=H·CF₃COOH; Y=Z
(70) *LLDLLL²HDL*; R=But; X=Z; Y=Ac
(71) *LLJDDL²HDL*; R=H; X=Z; Y=Ac
(72) *LLLD-LLLD*-; R=H; X=Boc; Y=Z
(73) *DDDL-DDDL*-; R=H; X=Boc; Y=Z
(74) *LLLLLLLLLL*; R=H; X=Boc; Y=Z
(75) *LLDLLL²HDL*; X=Z; Y=Ac
(76) *LLLD-LLLD*-; X=Boc; Y=Z
(77) *DDDL-DDDL*-; X=Boc; Y=Z
(78) *LLLLLLLLLL*; X=Boc; Y=Z
(79) *LLDLLL²HDL*; X=H·HBr; Y=Ac
(80) *LLLD-LLLD*-; X=H·CF₃COOH; Y=Z
(81) *DDDL-DDDL*-; X=H·CF₃COOH; Y=Z
(82) *LLLLLLLLLL*; X=H·CF₃COOH; Y=Z
(2); *LLDLLL²HDL*; Y=Ac
(83) *LLLD-LLLD*-; Y=Z
(84) *DDDL-DDDL*-; Y=Z
(85) *LLLLLLLLLL*; Y=Z
(1) *LLDLLL²HDL*
(3) *LLLD-LLLD*-
(5) *DDDL-DDDL*-
(40) *LLLLLLLLLL*



Система внутримолекулярных водородных связей в структуре «складчатого листа» грамицидина S

дачи были предприняты синтез и исследование свойств новых аналогов грамицидина S. Аналоги выбирались таким образом, чтобы в них присутствовали все или большинство гидрофобных и полярных групп антибиотика, но была изменена его пространственная структура. В настоящей работе описаны синтез и изучение антимикробной активности соединений (3) — (10).

- (1) цикло(-L-Val-L-Orn-L-Leu-D-Phe-L-Pro-L-Val-L-Orn-L-Leu-D-Phe-L-Pro-) грамицидин S
- (2) цикло(-L-Val-(Ac)-L-Orn-L-Leu-D-Phe-L-Pro-L-Val-(Ac)-L-Orn-²HL-Leu-D-Phe-L-Pro-) N,N'-диацетил-[C^α-дейтеро-Leu⁴]грамицидин S
- (3) цикло(-L-Val-L-Orn-L-Leu-D-Phe-Gly-L-Val-L-Orn-L-Leu-D-Phe-Gly-) [Gly⁵, Gly¹⁰]грамицидин S
- (4) цикло(-D-Val-D-Orn-D-Leu-L-Phe-D-Pro-D-Val-D-Orn-D-Leu-L-Phe-D-Pro-) энантио-грамицидин S
- (5) цикло(-D-Val-D-Orn-D-Leu-L-Phe-Gly-D-Val-D-Orn-D-Leu-L-Phe-Gly-) энантио[Gly⁵, Gly¹⁰]грамицидин S
- (6) цикло(-D-Phe-L-Leu-L-Orn-L-Val-L-Pro-D-Phe-L-Leu-L-Orn-L-Val-L-Pro-) ретро-грамицидин S
- (7) цикло(-D-Phe-L-Leu-L-Orn-L-Val-Gly-D-Phe-L-Leu-L-Orn-L-Val-Gly-) ретро[Gly⁵, Gly¹⁰]грамицидин S
- (8) цикло(-L-Phe-D-Leu-D-Orn-D-Val-D-Pro-L-Phe-D-Leu-D-Orn-D-Val-D-Pro-) ретро-энантио-грамицидин S
- (9) цикло(-L-Phe-D-Leu-D-Orn-D-Val-Gly-L-Phe-D-Leu-D-Orn-D-Val-Gly-) ретро-энантио[Gly⁵, Gly¹⁰] грамицидин S
- (10) цикло(-L-Val-L-Orn-L-Leu-L-Phe-L-Pro-L-Val-L-Orn-L-Leu-L-Phe-L-Pro-) «полностью L»-грамицидин S

В соединениях (3) и (10) затронуты расположенные в углах «листа» остатки L-Pro и D-Phe грамицидина S (1), соединения (6) и (7) получены обращением направления ацилирования у (1) и (3), а соединения (4) и (5) являются зеркальными отображениями (1) и (3). Ретро-энантио-грамицидин S(8) и ретро-энантио [Gly⁵, Gly¹⁰] грамицидин S (9) являются аналогами соединений (6) и (7) с заменой конфигурации аминокислотных остатков на противоположную. Кроме того, в статье описан синтез N, N'-диацетил-[C^α-дейтеро-Leu⁴]грамицидина S (2), использованного для отнесения сигналов в спектрах ЯМР. Синтез аналогов (2), (3), (5) — (10) осуществляли по схемам 1 и 2.

Пентапептиды (59) — (61), (111) — (114) были получены ступенчатым наращиванием цепи по N-концу методом N-оксисукцинимидных эфиров в смеси диоксан — вода (1 : 1); C-концевую группу блокировали солеобразованием. Этот метод имеет некоторые преимущества перед методами,

Схема 2

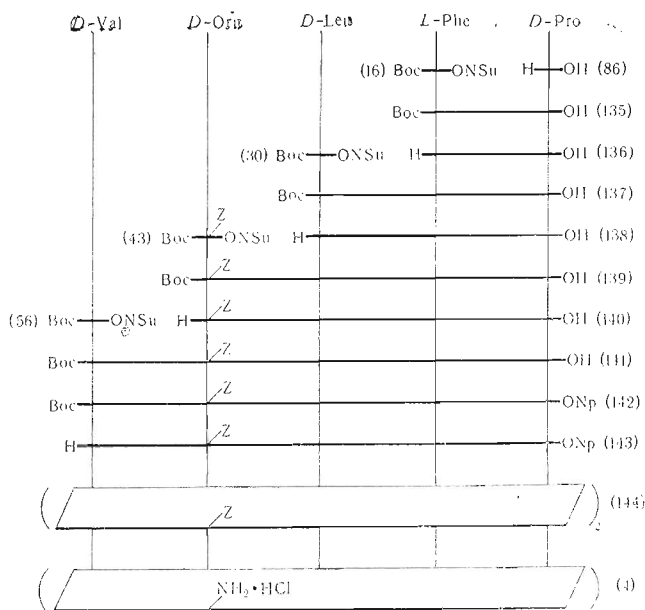
<i>D(L)</i> -Phe	<i>L(D)</i> -Leu	<i>L(D)</i> -Orn	<i>L(D)</i> -Val	<i>L(D)</i> -Pro(Gly)	<i>D(L)</i> -Phe	<i>L(D)</i> -Leu	<i>L(D)</i> -Orn	<i>L(D)</i> -Val	<i>L(D)</i> -Pro(Gly)
Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	H-OH			(55), (56) Boc-ONSu	ONSu	H-OH (42), (13), (86); OH (87)-(90)
Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	H-OH			Z	Boc	OH (91)-(94)
Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	H-OH			Z	H	OH (95)-(98)
Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	H-OH	(39), (40) Boc-ONSu	H	Z	H	OH (99)-(102)
Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	H-OH	Boc	Boc	Z	H	OH (103)-(106)
Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	H-OH	(15), (16) Boc-ONSu	H	Z	H	OH (107)-(110)
Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	H-OH	Boc	Boc	Z	H	OH (111)-(114)
Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	H-OH	H	H	Z	H	OH (115)-(118)
Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	H-OH	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Z	H	OH (119)-(122)
Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	H-OH	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Z	H	ONp (123)-(126)
Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	H-OH	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Z	H	ONp (127)-(130)
Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	H-OH	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Z	H	(131)-(134)
Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Boc-ONSu	H-OH	Boc-ONSu	Boc-ONSu	Z	H	(6)-(9)

- (86) *D*
- (87) *LL*
- (88) *L-*
- (89) *DD*
- (90) *D-*
- (95) *LLL*
- (96) *LL-*
- (97) *DDD*
- (98) *DD-*
- (103) *LLL*
- (104) *LL-*
- (105) *DDD*
- (106) *DD-*
- (111) *LLLL*
- (112) *LLL-*
- (113) *DDDD*
- (114) *DDDD-*
- (119) *LLLLLLLLL*
- (120) *LLL-DLLL-*
- (121) *LDDDDLLDDDD*
- (122) *LDVDD-LDDDD-*
- (131) *LLLLLLLLLL*
- (132) *LLL-DLLL-*
- (133) *LDDDDLLDDDD*
- (134) *LDDDD-LDDDD•*

описанными в работах [14—16], так как исключает стадию омыления, часто приводящую к осложнениям при получении необходимых производных. Для защиты α -аминофункции в соединениях (3) — (10) использовали *трет*-бутил-оксикарбонильную группу, а для блокирования δ -аминогрупп остатков орнитина — бензилоксикарбонильную группу. Затем пентапептиды (59)—(61) и (111) — (114) превращали в соответствующие *n*-нитрофениловые эфиры и в производные со свободными N- и C-концевыми группами, конденсация которых привела к декапептидам (72) — (74) и (119)—(122). Циклизацию также осуществляли методом *n*-нитрофениловых эфиров в пиридин-диоксановом растворе в условиях высокого разбавления ($6 \cdot 10^{-3}$ моль/л) при 55—60°, что приводило к N ^{δ} -защищенным циклопептидам (83) — (85) и (131) — (134).

Циклический декапептид (144) получали реакцией удвоения *n*-нитрофенилового эфира пентапептида (142) (схема 3).

Схема 3



Циклодекапептиды (83) — (85), (131) — (134) и (144) выделяли из реакционной смеси хроматографией на силикагеле в системе хлороформ — диоксан (градиентная элюция) с выходом ~15%. Бензилоксикарбонильную защитную группу полученных циклодекапептидов удаляли гидрированием в метаноле над палладиевым катализатором. Полученные соединения (3) — (10) очищали затем на «Dowex 50 × 2» (H⁺-форма) в смеси метанол — вода (4 : 1). Принцип синтеза и очистки дейтероаналога (2) не отличался от получения аналогов (3), (5) — (10), за исключением того, что для защиты N-конца использовали бензилоксикарбонильную группу, C-конца — *трет*-бутильную защиту, для блокирования δ -аминогрупп остатков орнитина — ацетильную защиту; соединение (32) получали методом смешанных ангидридов (схема 1). Физико-химические константы, выходы промежуточных и конечных продуктов приведены в табл. 1—3.

Антимикробная активность соединений (1), (3)—(10) приведена в табл. 4. Обращает на себя внимание полное совпадение как в качественном, так и в количественном отношении активности энантиомерных пар: (1) и (4), (3) и (5), (6) и (8) и (7) и (9). Аналогичное явление было обнаружено ранее у ионофоров энниатиновой [17] и валиномициновой [18] групп. Эквивалентность энантиомерных пар с точки зрения антимикробного действия ука-

Физико-химические свойства циклопептидов

Соединение *	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20-25}$ (С 0,5, этанол)	R_f^{**}	Выход, %
(1) $\text{—(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro)}_2\text{—}$	278—279	—285	0,64	90
(3) $\text{—(Val-Orn-Leu-D-Phe-Gly)}_2\text{—}$	228—230	—193	0,55	95
(4) $\text{—(D-Val-D-Orn-D-Leu-Phe-D-Pro)}_2\text{—}$	278—280	+286	0,64	95
(5) $\text{—(D-Val-D-Orn-D-Leu-Phe-Gly)}_2\text{—}$	227—230	+192,5	0,55	90
(6) $\text{—(D-Phe-Leu-Orn-Val-Pro)}_2\text{—}$	270—272	—35,8	0,5	94
(7) $\text{—(D-Phe-Leu-Orn-Val-Gly)}_2\text{—}$	218—220	—39,5	0,66	90
(8) $\text{—(Phe-D-Leu-D-Orn-D-Val-D-Pro)}_2\text{—}$	271—273	+36,9	0,5	90
(9) $\text{—(Phe-D-Leu-D-Orn-D-Val-Gly)}_2\text{—}$	217—219	+39,0	0,66	90
(10) $\text{—(Val-Orn-Leu-Phe-Pro)}_2\text{—}$	246—248	—75,0	0,6	95

* Все соединения в виде хлоргидратов.

** н-Бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода (9 : 1 : 1 : 1).

зывает на то, что наиболее вероятной биологической мишенью таких циклопептидов являются липидные зоны клеточных мембран с их низкой стереоизбирательностью. С другой стороны, широкое, в пределах двух порядков, варьирование минимальных концентраций, подавляющих рост микроорганизмов в ряду соединений (1), (6), (10) или (3), (7) не оставляет сомнений в важности конформационных параметров для проявления активности. Результаты исследования связи между пространственной структурой и функцией соединений (1) и (3) — (10) будут рассмотрены в наших последующих сообщениях.

Экспериментальная часть

Все температуры плавления не исправлены. Индивидуальность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на нейтральной окиси алюминия (активность II) и на силикагеле марки «Eastman». Для всех соединений данные элементного анализа отвечали вычисленному содержанию С, Н, N. Удельное вращение определяли при 20—25° в метаноле или этаноле (С 0,5—1).

Антимикробную активность соединений изучали методом пробирочных серийных разведений на среде следующего состава (на 1 л воды) глюкоза — 10 г, NaCl — 5 г, пептон — 5 г, бульон Хоттингера — 30 мл (750 мг% аминного азота), рН 7,0—7,2; бактериальная нагрузка — 1000 клеток/мл. Исключение составили опыты с *Mycobacterium phlei*, где антимикробную активность определяли по методике [19]. Перед введением в среду соединения растворяли в этаноле, содержание растворителя не превышало 2%. Для *Bacillus subtilis* и *Esherichia coli* B использовали синтетические среды, описанные соответственно в [20] и [21].

Бензилоксикарбонил-С^α-дейтеро-L-лейцин (28) получали с общим выходом 17% путем дейтерирования DL-лейцина по методике Джонса и Уэлена [22], разделения полученного рацемата с помощью ферментативного гидролиза ацетильного производного в присутствии ацилазы [23] и карбобензоксилирования по Бергману и Зервасу [24].

Физико-химические константы линейных пептидов

В скобках системы: А — бензол — метанол (4 : 1); Б — бензол — метанол (2 : 1);
В — этилацетат — этанол (4 : 1)

Соединение	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20-25}$ (С 1,0, метанол)	R_f (система)	Выход, %
(17) Z-D-Phe-Pro-OH	53 ^{4*}	-42,4	0,6 (Б)	80
(18) Z-D-Phe-Pro-OBu ^t	Масло	-45,6	0,5 (А)	80
(19) Вос-D-Phe-Gly-OH	153—155 ^{1*}	+4,5	0,6 (А)	85
(136) Вос-Phe-D-Pro-OH	163—165 ^{2*}	-53,0	0,7 (А)	85
(20) Вос-Phe-Gly-OH	155—157 ^{1*}	-5,0	0,6 (А)	75
(87) Вос-Val-Pro-OH	127—128 ^{3*}	-66,0	0,61 (А)	90
(88) Вос-Val-Gly-OH	53—54 ^{3*}	-22,7	0,66 (А)	90
(89) Вос-D-Val-D-Pro-OH	128—130 ^{3*}	+66,0	0,61 (А)	85
(90) Вос-D-Val-Gly-OH	52—54 ^{3*}	+23,0	0,66 (А)	85
(21) Вос-Phe-Pro-OH	55—57 ^{3*}	-26,0	0,53 (А)	90
(31) Z-Leu-D-Phe-Pro-OH	72—73 ^{4*}	-55,2	0,5 (А)	80
(32) Z- ² HLeu-D-Phe-Pro-OBu ^t	63—65 ^{4*}	-51,6	0,52 (А)	80
(33) Вос-Leu-D-Phe-Gly-OH	73—75 ^{4*}	+7,0	0,64 (Б)	80
(138) Вос-D-Leu-Phe-D-Pro-OH	91—93 ^{4*}	+42,6	0,72 (Б)	95
(34) Вос-D-Leu-Phe-Gly-OH	75—77 ^{4*}	-8,0	0,64 (Б)	85
(95) Вос-Z ^δ -Orn-Val-Pro-OH	70—72 ^{4*}	-53,6	0,63 (Б)	90
(96) Вос-Z ^δ -Orn-Val-Gly-OH	128—130 ^{4*}	-34,0	0,67 (Б)	65
(97) Вос-Z ^δ -D-Orn-D-Val-D-Pro-OH	73—74 ^{4*}	+54,2	0,63 (Б)	78
(98) Вос-Z ^δ -D-Orn-D-Val-Gly-OH	129—131 ^{4*}	+38,0	0,67 (Б)	75
(35) Вос-Leu-Phe-Pro-OH	83—86 ^{4*}	-54,3	0,61 (Б)	75
(44) Z-Ac ^δ -Orn-Leu-D-Phe-Pro-OH	82—83 ^{4*}	-49,5	0,5 (Б)	75
(45) Z-Ac ^δ -Orn-2HLeu-D-Phe-Pro-OBu ^t	75—76 ^{4*}	-48,7	0,7 (Б)	75
(46) Вос-Z ^δ -Orn-Leu-D-Phe-Gly-OH	81—83 ^{2*}	-4,3	0,64 (Б)	70
(140) Вос-Z ^δ -D-Orn-D-Leu-Phe-D-Pro-OH	70—72 ^{2*}	+35,3	0,7 (Б)	90
(47) Вос-Z ^δ -D-Orn-D-Leu-Phe-Gly-OH	82—83 ^{2*}	+4,5	0,64 (Б)	80
(103) Вос-Leu-Z ^δ -Orn-Val-Pro-OH	Аморфный	-45,3	0,7 (Б)	75
(104) Вос-Leu-Z ^δ -Orn-Val-Gly-OH	»	-39,7	0,62 (Б)	85
(105) Вос-D-Leu-Z ^δ -D-Orn-D-Val-D-Pro-OH	»	+50,8	0,7 (Б)	80
(106) Вос-D-Leu-Z ^δ -D-Orn-D-Val-Gly-OH	»	+43,8	0,62 (Б)	70
(48) Вос-Z ^δ -Orn-Leu-Phe-Pro-OH	79—82 ^{2*}	-37,8	0,6 (Б)	80
(57) Z-Val-Ac ^δ -Orn-Leu-D-Phe-Pro-OH	156—157 ^{4*}	-53,6	0,6 (Б)	80
(58) Z-Val-Ac ^δ -Orn-Leu-D-Phe-Pro-OBu ^t	135—136 ^{4*}	-56,9	0,5 (Б)	85
(59) Вос-Val-Z ^δ -Orn-Leu-D-Phe-Gly-OH	Аморфный	-14,5	0,6 (Б)	85
(142) Вос-D-Val-Z ^δ -D-Orn-D-Leu-Phe-D-Pro-OH	83—85 ^{2*}	+41,7	0,65 (Б)	75
(60) Вос-D-Val-Z ^δ -D-Orn-D-Leu-Phe-Gly-OH	Аморфный	+14,5	0,6 (Б)	80
(114) Вос-D-Phe-Leu-Z ^δ -Orn-Val-Pro-OH	»	-67,2	0,65 (Б)	85
(112) Вос-D-Phe-Leu-Z ^δ -Orn-Val-Gly-OH	»	-38,0	0,57 (Б)	65
(113) Вос-Phe-D-Leu-Z ^δ -D-Orn-D-Val-D-Pro-OH	»	+69,7	0,65 (Б)	95

1* Хлороформ.

2* Этанол.

3* Смесь эфир — гексан (1 : 1).

4* Этилацетат.

Таблица 2 (продолжение)

Соединение	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20-25}$ (С 1,0, метанол)	R_f (система)	Выход, %
(114) Boc-Phe-D-Leu-Z ^δ -D-Orn-D-Val-Gly-OH	Аморфный	+40,0	0,5 (Б)	95
(61) Boc-Val-Z ^δ -Orn-Leu-Phe-Pro-OH	»	-50,2	0,55 (Б)	80
(70) Z-Val-Ac ^δ -Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Ac ^δ -Orn ² HLeu-D-Phe-Pro-OBu ^t	»	-66,8	0,5 (Б)	80
(72) Boc-(Val-Z ^δ -Orn-Leu-D-Phe-Gly) ₂ -OH	»	-9,4	0,5 (Б)	80
(73) Boc-(D-Val-Z ^δ -D-Oro-D-Leu-Phe-Gly) ₂ -OH	»	+8,6	0,5 (Б)	95
(119) Boc-(D-Phe-Leu-Z ^δ -Orn-Val-Pro) ₂ -OH	»	-64,2	0,6 (Б)	75
(120) Boc-(D-Phe-Leu-Z ^δ -Orn-Val-Gly) ₂ -OH	»	-5,0	0,5 (Б)	90
(121) Boc-(Phe-D-Leu-Z ^δ -D-Orn-D-Val-D-Pro) ₂ -OH	»	+58,3	0,6 (Б)	80
(122) Boc-(Phe-D-Leu-Z ^δ -D-Orn-D-Val-D-Pro) ₂ -OH	»	+6,0	0,5 (Б)	60
(74) Boc-(Val-Z ^δ -Orn-Leu-Phe-Pro) ₂ -OH	»	-67,3	0,5 (Б)	85

Таблица 3

Физико-химические константы циклодекапептидов

В скобках системы: Г — бензол — диоксан (1,5 : 1); Д — этилацетат — этанол (2 : 1),
Е — бензол — диоксан (1 : 1)

Соединение	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20-25}$ (С 0,5, метанол)	R_f (система)	Выход, %
2 $\left \begin{array}{c} \text{---(Val-Ac-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Ac-} \\ \text{Orn-}^2\text{HLeu-D-Phe-Pro)} \text{---} \end{array} \right $	305—306	-302 *	0,5 (Д)	15
83 $\left \text{---(Val-Z-Orn-Leu-D-Phe-Gly)}_2 \text{---} \right $	163—166	-153,2	0,4 (Г)	15
144 $\left \text{---(D-Val-Z-D-Orn-D-Leu-Phe-D-Pro)}_2 \text{---} \right $	272—274	+243	0,55 (Г)	18
84 $\left \text{---(D-Val-Z-D-Orn-D-Leu-Phe-Gly)}_2 \text{---} \right $	164—167	+152,3	0,4 (Г)	15
131 $\left \text{---(D-Phe-Leu-Z-Orn-Val-Pro)}_2 \text{---} \right $	258—260	-40,0	0,64 (Г)	15
132 $\left \text{---(D-Phe-Leu-Z-Orn-Val-Gly)}_2 \text{---} \right $	173—175	-38,5	0,6 (Е)	13
133 $\left \text{---(Phe-D-Leu-Z-D-Orn-D-Val-D-Pro)}_2 \text{---} \right $	258—261	+42,0	0,64 (Г)	15
134 $\left \text{---(Phe-D-Leu-Z-D-Orn-D-Val-Gly)}_2 \text{---} \right $	172—175	+40,5	0,6 (Е)	10
85 $\left \text{---(Val-Z-Orn-Leu-Phe-Pro)}_2 \text{---} \right $	254—256	-65,3	0,53 (Г)	15

* С 1,5, 70%-ный водный этанол.

N-оксисукцинимидный эфир N^α-бензилоксикарбонил-N^δ-ацетил-L-орнитина (41) получали карбобензоксилированием N^δ-ацетил-L-орнитина [25] и превращением образовавшейся кислоты в N-оксисукцинимидный эфир по методу Андерсона и соавт. [26]. Общий выход 80%.

Трет-бутиловый эфир бензилоксикарбонил-D-фенилаланил-L-пролина (18). К 15 г (0,05 моль) N-оксисукцинимидного эфира (14) в 150 мл диоксана прибавляли 8,6 г (0,05 моль) трет-бутилового эфира L-пролина (11). Через 40 ч при 25° раствор упаривали, остаток растворяли в этилацетате и промывали 0,1 н. HCl, NaHCO₃, высушивали над MgSO₄ и упаривали.

Антимикробное действие грамицидина S и его аналогов

Соединение	Минимальная концентрация, подавляющая рост, мкг/мл				
	<i>Staph. aureus</i> 239P	<i>Sarcina lutea</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>E. coli</i> B	<i>Mycob. phlei</i>
(1) Грамицидин S	0,5—1	0,5—1	0,5—1	2	2—4
(4) Энантио-грамицидин S	0,5—1	0,5—1	0,5—1	2	2—4
(3) [Gly ⁵ , Gly ¹⁰] грамицидин S	18	12—18	9—18	9—18	12—18
(5) Энантио [Gly ⁵ , Gly ¹¹] грамицидин S	18	12—18	9—18	9—18	12—18
(6) Ретро-грамицидин S	60—75	60—75	9—18	18	18—25
(8) Ретро-энантио-грамицидин S	60—75	60—75	18	18	18—25
(7) Ретро [Gly ⁵ , Gly ¹⁰] грамицидин S	>100	>100	12—18	9—18	37—60
(9) Ретро-энантио [Gly ⁵ , Gly ¹⁰] грамицидин S	>100	>100	12—18	9—18	37—60
(10) «Полностью L»-грамицидин S	60—75	60—75	9—18	18	18—25

Остаток хроматографировали на силикагеле в системе бензол — этилацетат, получили 18 г (79%) бесцветного масла.

Трет-бутиловый эфир бензилоксикарбонил-С^α-дейтеро-L-лейцил-D-фенилаланил-L-пролина (32). 22,6 г (0,05 моль) защищенного пептида (18) растворяли в 150 мл метанола и гидрировали над палладиевым катализатором (из 0,3 г PdO). Катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали. 13,3 г (0,05 моль) карбобензоксис-С^α-дейтеро-L-лейцина (28) растворяли в 140 мл тетрагидрофурана и добавляли при —15° 7 мл (0,05 моль) триэтиламина и 6,8 мл (0,05 моль) изобутилхлорформиата. Через 10 мин добавляли при —10° полученный выше аминокэфир (23). Смесь перемешивали при 25° 6 ч, упаривали, растворяли в этилацетате, промывали 1 н. HCl, NaHCO₃, водой, высушивали над MgSO₄ и упаривали. Выход 81%.

Трет-бутиловые эфиры (45) и (58). Аминокэфир (37) или (50), полученный гидрированием 0,025 моль трипептида (32) или тетрапептида (45) в условиях предыдущего опыта, добавляли к раствору 0,025 моль N-оксисукцинимидного эфира (41) или (54) в 200 мл диоксана. Через 40 ч при 20° раствор упаривали, остаток растворяли в хлороформе, промывали 1 н. HCl, NaHCO₃, высушивали, упаривали. Выход 70—75%.

Дипептиды (17), (19) — (21), (87) — (90), (136). 0,03 моль N-оксисукцинимидного эфира (14) — (16), (55), (56) растворяли в 50 мл диоксана и прибавляли при перемешивании к раствору 0,03 моль аминокислоты (12), (13), (86) и 5 г (0,06 моль) NaHCO₃ в 50 мл воды. Смесь перемешивали при 25° 48 ч, диоксан упаривали в вакууме при 40—45°, остаток охлаждали до 0°, подкисляли конц. HCl до pH 3, экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой, высушивали, упаривали. Выход 85—90%.

Бензилоксикарбонил- и трет-бутилоксикарбонил-кислоты (31), (33) — (35), (44), (46) — (48), (57), (59) — (61), (95) — (98), (103) — (106), (111) — (114), (138), (140), (142). 0,02 моль бензилоксикарбонильного производного (17), (31) или (44) переводили в соответствующий ацетат свободного пептида (22), (36), (49) путем гидрирования в условиях, описанных для соединения (18) в метаноле, содержащем 0,04 моль уксусной кислоты. Трет-бутилоксикарбонильную группу отщепляли от 0,02 моль пептида (19) — (21), (33) — (35), (46) — (48), (87) — (90), (95) — (98), (103) — (106), (135), (137), (139) путем растворения в 40 мл трифторуксусной кислоты, выдерживания в течение 60 мин при 20° и упаривания досуха. Образовавшийся ацетат (22), (36) или (49) или трифторацетат (24) — (26), (38) — (40), (51) — (53), (91) — (94), (99) — (102), (107) — (110), (136), (138), (140) растворяли в 75 мл 1,3 н. NaHCO₃ и добавляли к 0,02 моль N-оксисукцинимидного

эфира (27), (41), (54) или (15), (16), (29), (30), (42), (43), (55), (56) в 75 мл диоксиана. Смесь перемешивали 72 ч при 20—25° и обрабатывали так же, как в предыдущем опыте. Выход 60—75%. Пептиды (46) — (48), (95) — (98), (103) — (106), (139), содержащие на N^ε-аминогруппе орнитина бензилкарбонил, переводили в соответствующие трифторацетата в присутствии 1 мл анизола.

Декапептиды (70), (72) — (74), (119) — (122). 0,005 моль кислоты (57), (59) — (61), (111) — (114) растворяли в 30 мл пиридина, добавляли при 25° 4,85 г (0,015 моль) (ди-*n*-нитрофенил)-сульфата и через 24 ч пиридин отгоняли в вакууме. Остаток пересаждали из этилацетата смесью эфир — петролейный эфир. Полученный *n*-нитрофениловый эфир (62) — (65), (111) — (114) растворяли в 25 мл ДМФА и соединяли с раствором 0,004 моль аминоксифра (66), полученного из пептида (58) гидрированием в условиях, описанных для соединения (18), в 25 мл ДМФА или с раствором 0,004 моль трифторацетата (67) — (69) или (115) — (118), полученного из пептида (59) — (61) или (111) — (114) в условиях предыдущего опыта, в 25 мл ДМФА и 1,4 мл триэтиламина. Через 72 ч (20°) раствор упаривали до 1/3 объема, остаток выливали в раствор лимонной кислоты (рН 3), осадок отфильтровывали, высушивали и пересаждали из этилацетата смесью эфир — петролейный эфир. Выход 70—80%. Пептиды (59) — (61), (111) — (114) переводили в соответствующие трифторацетаты в присутствии 1,5 мл анизола.

Циклопептиды (2), (83) — (85), (131) — (134). 0,0015 моль *трет*-бутилового эфира (70) с количественным выходом переводили в кислоту (71) путем растворения в 10 мл трифторуксусной кислоты, выдерживания в течение 40 мин при 25°, упаривания досуха. Затем 0,0015 моль кислоты (71) — (74), (119) — (122) переводили в *n*-нитрофениловый эфир (75) — (78), (123) — (126), как описано в предыдущем опыте. Бензилкарбонильную группу отщепляли, растворяя соответствующий пептид (75) в 20 мл 30%-ной $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$, упаривая раствор через 40 мин досуха, растирая образовавшийся бром-гидрат (79) под эфиром, отфильтровывая и высушивая. *Трет*-бутил-оксикарбонильную группу соединений (76) — (78), (123) — (126) отщепляли действием 20 мл трифторуксусной кислоты, содержащей 1,5 мл анизола при 0° в течение часа, упариванием досуха, растиранием под эфиром и высушиванием. Полученную соль *n*-нитрофенилового эфира (79) — (82), (127) — (130) растворяли в смеси 15 мл ДМФА и 0,2 мл уксусной кислоты и в течение 5 ч прикапывали к 500 мл пиридина при 60°. Через 6 ч (55—60°) раствор упаривали почти досуха, остаток разбавляли водой или смесью эфир — петролейный эфир. Осадок отфильтровывали, высушивали, растворяли в небольшом количестве хлороформа, наносили на колонку с силикагелем (35 × 3 см) и хроматографировали в системе хлороформ — диоксан — этанол (градиентная элюция). Выход 10—15%.

Циклопептид (144). *n*-Нитрофениловый эфир (142) получали аналогично соединению (63), исходя из 4,1 г (5 ммоль) кислоты (141) и 4,8 г (15 ммоль) ди-*n*-нитрофенилсульфата. Полученный *n*-нитрофениловый эфир (142) переводили в трифторацетат (143) путем растворения в смеси 40 мл безводной трифторуксусной кислоты и 3 мл анизола при 0° и через 2 ч упаривали при 30°. К остатку добавляли 300 мл абс. эфира, образовавшийся осадок отфильтровывали, сушили над КОН в вакууме.

Полученный продукт (143) растворяли в смеси 30 мл абс. ДМФА и 0,5 мл ледяной уксусной кислоты и в течение 6 ч прикапывали к 850 мл пиридина (при 60°). Через 48 ч (60°) раствор упаривали до 1/3 объема и постепенно выливали в смесь эфир — петролейный эфир (1 : 1). Полученный циклопептид (144) растворяли в 1,5—2 мл хлороформа, наносили на колонку с силикагелем (35 × 4 см) и хроматографировали в системе хлороформ — диоксан (градиентная элюция). Элюат, содержащий циклопептид (144) (контроль ТСХ на силикагеле), упаривали.

Циклопептиды (3) — (10). 0,1 ммоль циклопептида (83) — (85), (131)— (134), (144) растворяли в 10 мл 0,02 н. HCl в метаноле и гидрировали над палладиевым катализатором (из 100 мг окиси палладия) в течение 24 ч. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха, остаток растворяли в 20 мл смеси метанол — вода (4 : 1) и пропускали через смолу «Dowex 50 × 2» в H⁺-форме. Элюат упаривали, остаток кристаллизовали из 90%-ного этилового спирта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шемякин М. М., Хохлов А. С., Колосов М. Н., Бергельсон Л. Д., Антонов В. К. (1961) Химия антибиотиков, т. II, стр. 1061. Изд. АН СССР, М.
2. Matsuura S., Waki M., Kato T., Izumiya N. (1973) Bull. Chem. Soc. Jap., 46, 977—981.
3. Gibbons W. A., Sogn J. A., Stern A., Graig L. C., Johnson L. F. (1970) Nature, 227, 840—842.
4. Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Bystrov V. F., Miroshnikov A. I., Shepel E. N., Abdullaev N. D., Efremov E. S., Senyavina L. B. (1970) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 39, 217—225.
5. De Santis P., Liquori A. M. (1971) Biopolymers, 10, 699—710.
6. Schwyzer R. (1959) Record of Chem. Progr., 20, 146—167.
7. Schwyzer R., Sieber P. (1958) Chimia, 12, 265.
8. Schwyzer R. (1958) in CIBA Foundation Symposium on Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity, p. 171.
9. Schmidt G. M., Hodgkin D. C., Oughton B. M. (1957) Biochem. J., 65, 744—750.
10. Hodgkin D. C., Oughton B. M. (1957) Biochem. J., 65, 752—756.
11. Syngé R. L. (1957) Biochem. J., 65, 750—752.
12. Katchalski A., Berger A., Bichowsky-Slomnicki L., Kurtz I. (1955) Nature, 176, 118—119.
13. Bichowsky-Slomnicki L., Berger A., Kurtz I., Katchalski E. (1956) Arch. Biochem. and Biophys., 65, 400—405.
14. Schwyzer R., Sieber P. (1957) Helv. chim. acta, 40, 624—639.
15. Schwyzer R., Gorup B. (1958) Helv. chim. acta, 41, 2199—2205.
16. Waki M., Izumiya N. (1968) Bull. Chem. Soc. Jap. 41, 1909—1916.
17. Шемякин М. М., Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Евстратов А. В., Михалева И. И., Рябова И. Д. (1972) Ж. общ. химии, 42, 2320, 2334.
18. Иванов В. Т., Лайне И. А., Рябова И. Д., Овчинников Ю. А. (1970) Химия природн. соедин., 6, 744—754.
19. Макеева О. О. (1959) Методы экспериментальной химиотерапии, стр. 148, Медгиз, М.
20. Anagnostopoulos C., Spizizen J. (1961) J. Bacteriol., 81, 741—746.
21. Erlanger B. F., Goode L. (1960) Science, 131, 669—670.
22. Johns R. B., Whelan D. I. (1966) Austral. J. Chem., 19, 2143—2147.
23. Greenstein J. P., Winitz M. (1961) Chemistry of the Amino Acids, vol. 3, p. 2092, N. Y.—London — John. Wiley, Sons, Inc.
24. Bergmann M., Zervas L. (1932) Ber., 65, 1192—1201.
25. Greenstein J. P. (1956) Arch. Biochem. and Biophys., 64, 342—345.
26. Anderson G. W., Zimmerman I. E., Callahan F. M. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 1839—1842.

Поступила в редакцию
4.XI.1974

THE SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NEW GRAMICIDIN S ANALOGS

SNEZHKOVA L. G., SHEPEL E. N., RYABOVA I. D.,
MIROSHNIKOV A. I., IVANOV V. T., OVCHINNIKOV Yu. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The gramicidin S (Gr S) and [Gly⁶, Gly¹⁰] Gr S analogs which differ in configuration of amino acid residues or in the direction of acylation have been prepared and tested for antimicrobial activity. Based on the equal activity displayed by the enantiomeric compounds, an assumption was made that the cyclopeptides might affect the lipid areas of cell membrane characterized by low stereospecificity. On the other hand, considerable variation exists in the microbial growth inhibitory concentrations for GrS, its retro-analog and «all-L»-GrS, which points to the significance of conformational factors for the manifestation of biological activity.