



УДК 577.112.856:542.95

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННОГО АНАЛОГА ПРИРОДНОГО ЛИПОТРИПЕПТИДА ИЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ СТЕНКИ *E. coli*

© 1999 г. М. П. Усанова, Ю. Л. Себякин[#]

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 117571, Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 17.06.98 г. Принята к печати 24.09.98 г.

Осуществлен синтез потенциальных иммуномодуляторов – алифатических производных аминокислот *N*-пальмитоил-*L*-цистеина, *N*-пальмитоил-*S*-[1,2-бис(гексадецилоксикарбонил)этил]-*L*-цистеина и новых липопептидов: метилового эфира *N*-пальмитоил-*S*-[1,2-бис(гексадецилоксикарбонил)этил]-*L*-цистеинил-*L*-серина и *N*-пальмитоил-*S*-[1,2-бис(гексадецилоксикарбонил)этил]-*L*-цистеинил-*L*-серил-*L*-серина.

Ключевые слова: липопептиды; иммуностимулирующие свойства; адъювант.

Поиск методов борьбы с бактериальными инфекциями побудил исследователей к изучению строения различных бактерий. В результате работ был идентифицирован ряд биологически активных биополимеров [1, 2] и, в частности, бактериальные липопротейны и их фрагменты – липопептиды [3–10]. Липопептиды и их синтетические аналоги обладают различной биологической активностью *in vivo* [5, 11, 12]: иммуномодулирующими свойствами, противоопухолевой активностью [13–15], а также могут использоваться при подавлении репродукции вируса иммунодефицита человека [16]. Благодаря этим свойствам, а также отсутствию токсичности липопептиды привлекают пристальное внимание исследователей в качестве потенциальных компонентов синтетических вакцин и противоопухолевых препаратов.

Липопротейн, выделенный из *Escherichia coli*, и его фрагменты проявляют митогенную активность и стимулируют клетки, индуцирующие увеличение выброса интерлейкина-1 и производство простагландинов E_2 и $F_{2\alpha}$ и интерферона [8–10]. Синтетические липопептиды, аналоги *N*-терминальной части этого липопротейна, являются сильными активаторами макрофагов и В-лимфоцитов [17].

Было показано [18, 19], что синтетический аналог природного липопротейна из *E. coli* – липопентапептид *N*-пальмитоил-*S*-[2,3-бис(пальмитоилокси)-(2-*RS*)-пропил]-*L*-цистеинил-*D*-серил-*D*-серил-*D*-аспарагинил-*D*-аланин проявляет такие же митогенные свойства, как и природный липопротейн. Позднее было установлено [20], что даже при укорачивании пептидной цепи от

пента- до дипептида иммуностимулирующие свойства все еще сохраняются: липотрипептид *N*-пальмитоил-*S*-[2,3-бис(пальмитоилокси)-(2-*RS*)-пропил]-*L*-цистеинил-*D*-серил-*D*-серин обладает иммуностимулирующей активностью, сравнимой с активностью липопентапептида [21].

В последние годы вышеназванные соединения широко используются в качестве эффективных адъювантов при создании синтетических вакцин [22–24]. Эти обстоятельства стимулируют развитие синтетических исследований в области аналогов природных липопептидов. При этом особое значение приобретает упрощение схем синтеза, использование доступных исходных компонентов, простых и хорошо воспроизводимых методик.

Настоящая работа – продолжение ранее начатых исследований [25, 26] в области синтеза модифицированных липопептидов. Целью работы являлся синтез аналогов природного бактериального липопротейна, выделенного из внешней мембраны *E. coli*. В работе описан синтез ряда алифатических производных аминокислот и липопептидов, а именно: *N*-пальмитоил-*L*-цистеина (I), *N*-пальмитоил-*S*-[1,2-бис(гексадецилоксикарбонил)этил]-*L*-цистеина (II), метилового эфира *N*-пальмитоил-*S*-[1,2-бис(гексадецилоксикарбонил)этил]-*L*-цистеинил-*L*-серина (IV) и *N*-пальмитоил-*S*-[1,2-бис(гексадецилоксикарбонил)этил]-*L*-цистеинил-*L*-серил-*L*-серина (V), в которых пропильный фрагмент заменен на этильный, а в пептидной части содержится две или три аминокислоты. Выбор такой структуры связан с тем, что синтез природного аналога даже с коротким пептидным фрагментом многостадийен и трудоемок. Незначительное изменение в структуре позволило существенно упростить синтез, а, следовательно, и возможное

[#] Автор для переписки.

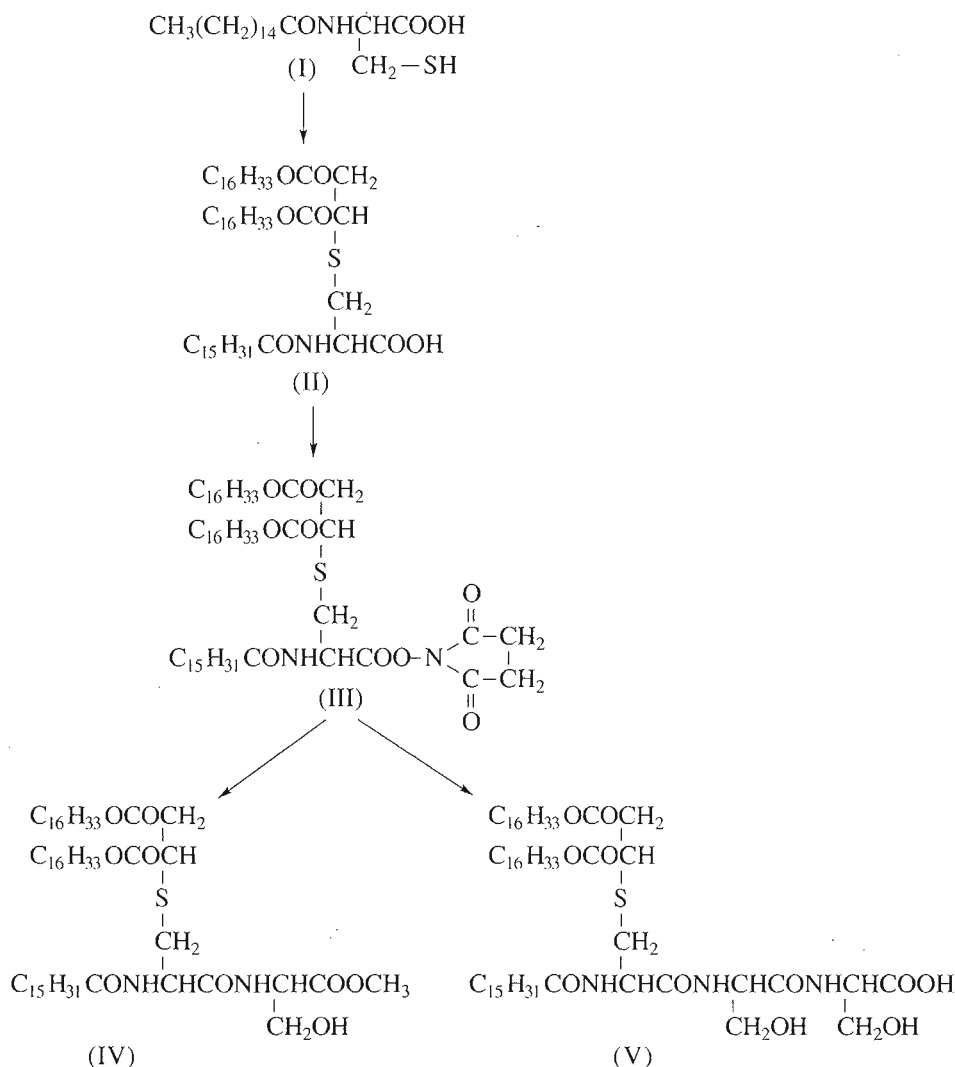


Схема.

производство данных соединений в случае обнаружения иммуностимулирующих свойств.

Синтез проведен по следующей схеме.

В основу синтеза ключевого синтона (II) были положены две реакции: создания амидной связи по методу активированных эфиров [27] и присоединения сульфгидрильной группы *N*-пальмитоил-*L*-цистеина по двойной связи дигексадецилового эфира малеиновой кислоты [28]. Наличие изомеров положения, образующихся в ходе последней реакции, по данным ТСХ не наблюдалось. Использование соединения (II) позволяет в дальнейшем наращивать аминокислотную последовательность, получая липопептиды с различной длиной пептидной цепи и различными защитными группами. Благодаря относительной простоте синтеза, подобные соединения доступны при исследовании взаимосвязи структуры с активностью.

Для синтеза липопептида (IV) по методу активированных эфиров использовали метиловый

эфир *L*-серина. Как следует из литературных данных [29], наличие метилоксигруппы вместо карбоксильной незначительно влияет на биологическую активность соединений подобного типа. Кроме того, присутствие защитной группировки в карбоксильной группе серина способствует более четкой интерпретации ПМР-спектра и несколько облегчает синтез.

Строение соединений (II)–(IV) подтверждено данными ИК- и ПМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии.

В основу схемы получения липотрипептида (V) был положен тот же принцип: присоединение пептидного фрагмента *L*-серил-*L*-серина [30] к активированной карбоксильной группе соединения (III). Структура полученного соединения была подтверждена данными ИК- и ПМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Таким образом, предложенная схема позволила осуществить синтез ряда алифатических про-

изводных аминокислот, потенциальных иммуномодуляторов.

Ранее было проведено исследование липопептида (IV) в составе монослоев. Было показано [25], что, во-первых, он образует стабильные конденсированные монослои, а во-вторых, вид кривой давление/занимаемая площадь аналогичен таковой для описанного в литературе липодипептида [29]. Кроме того липодипептид (IV) хорошо встраивается в искусственные мембраны, образуя смешанные липосомы с фосфатидилхолином. Эти факты указывают на то, что модифицированный липодипептид (IV) проявляет свойства, аналогичные свойствам природного липопептида, по крайней мере в части встраивания в бислоюную мембрану.

Изучению иммуномодулирующей активности синтезированных соединений будет посвящена отдельная публикация.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали пальмитиновую кислоту, малеиновый ангидрид, гексадеканол, *N*-гидроксисукцинимид, дициклогексилкарбодиимид и цистеинхлоргидрат, *L*-серин и хлоргидрат метилового эфира *L*-серина (Merck, ФРГ), а также гексадециловый эфир малеиновой кислоты, *N*-оксисукцинимидный эфир пальмитиновой кислоты и *L*-серил-*L*-серин, синтезированные нами по известным методикам (соответственно [28, 27, 30]).

Спектры ПМР снимали в дейтерохлороформе на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker WM-200 (Германия) с рабочей частотой 200 МГц; приведены химические сдвиги в шкале δ . Внутренний стандарт – гексаметилдисилоксан. ИК-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu IR-435 (Япония), масс-спектры – на времяпролетном масс-спектрометре МСБХ (Сумы, Украина) с ионизацией осколками деления калифорния-252. Температуры плавления определяли на приборе Voetius и не корректировали. ТСХ проводили на пластинках Silufol UV-245 (Чехо-Словакия) в системах растворителей: хлороформ (А), хлороформ–метанол–уксусная кислота, 8.5 : 0.5 : 0.2 (Б); обнаружение – нагреванием при 350°C, вещества, содержащие двойные связи, обнаруживали KMnO_4 , соединения со свободными аминогруппами – нингидрином, алифатические производные – парами иода. *N*-Сукцинимидные эфиры обнаруживали последовательным опрыскиванием двумя растворами [раствор 1: 8.5 мл 14% NaOH + 20 мл 14% $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$; через 2 мин – раствор 2: 5% FeCl_3 в 1.2 н. HCl]. Вещества, содержащие амидные связи, обнаруживали обработкой парами хлора с последующим опрыскиванием раствором 160 мг толидина и 1 г KI в 500 мл 6% CH_3COOH . Ко-

лоночную хроматографию проводили на силикагеле L40/100 мкм (Чехо-Словакия).

***N*-Пальмитоил-*L*-цистеин (I).** К раствору 2 г (5.7 ммоль) *N*-оксисукцинимидного эфира пальмитиновой кислоты в 100 мл ацетона добавляли раствор 0.89 г (5.7 ммоль) *L*-цистеинхлоргидрата в 10 мл насыщ. водного NaHCO_3 . Смесь выдерживали 2 ч при 75°C; контроль – ТСХ (А, Б). Органический растворитель упаривали, остаток разбавляли 500 мл воды, подкисляли 0.1 н. HCl до pH 7, сушили в вакууме над P_2O_5 . Получали 1.5 г (73%) хроматографически индивидуального соединения (I), R_f 0.62 (Б), т. пл. 82–83°C. ИК-спектр (в пленке, ν , cm^{-1}): 3300 (ОН), 2850 (CH_3), 1710 ($\text{C}=\text{O}$), 1641 (амид I), 1580 (амид II), 1520, 1460 (СН), 1374, 1200, 1120, 710. ПМР-спектр: 0.85т (3Н, CH_3), 1.25м (13 Н, CH_2 -цепь); 2.3т (2Н, $-\text{CH}_2-\text{CO}$); 3.05т (2Н, CH_2-S); 4.85т (1Н, $\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}$); 6.7д (1Н, NH). Масс-спектр, m/z : 346 (M^+).

***N*-Пальмитоил-*S*-[1,2-бис(гексадецилоксикарбонил)этил]-*L*-цистеин (II).** К раствору 0.5 г (1.39 ммоль) *N*-пальмитоилцистеина (I) и 1 г (1.8 ммоль) дигексадецилового эфира малеиновой кислоты в 1.4 мл сухого хлороформа прибавляли раствор 0.1 мл (2.78 ммоль) триэтиламина в 7 мл этанола, смесь выдерживали 20 ч при 75°C; контроль – ТСХ (Б). Растворитель упаривали в вакууме, реакционную массу разбавляли водой до 200 мл, подкисляли 0.1 н. HCl до pH 5. Продукт реакции экстрагировали хлороформом, экстракт промывали водой до pH 7, сушили. Растворитель упаривали в вакууме. Получали 0.6 г (46%) хроматографически индивидуального соединения (II), R_f 0.67 (Б), т. пл. 63–64°C.

ИК-спектр (вазелиновое масло, ν , cm^{-1}): 3344 (NH), 3175.5 (ОН), 2850 (СН), 1724 ($\text{C}=\text{O}$), 1640 (амид I), 1580 (амид II), 1467 (CH_3), 1374 (CH_2), 712 (CH_2). ПМР-спектр: 0.85т (9Н, $-\text{CH}_3$), 1.25м (78 Н, CH_2 -цепь); 1.65м (6Н, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OC}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$); 1.8–2.5м (2Н, $-\text{CH}_2-\text{CONH}$); 2.5–3.75м (5Н, $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{S}-\text{CH}_2$); 4.15м (4Н, CH_2-OC); 4.8т (1Н, $\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}$); 6.95м (1Н, NH). Масс-спектр, m/z : 925 (M^+).

***N*-Оксисукцинимидный эфир *N*-пальмитоил-*S*-[1,2-бис(гексадецилоксикарбонил)этил]-*L*-цистеина (III).** К раствору 2.5 г (2.9 ммоль) синтона (II) в 30 мл сухого этилацетата добавляли раствор 0.31 г (2.7 ммоль) *N*-гидроксисукцинимид в 10 мл сухого этилацетата и раствор 0.81 г (3.8 ммоль) DCC в 5 мл сухого этилацетата и выдерживали 24 ч при температуре 19–20°C; контроль – ТСХ (Б). Осадок отфильтровали, фильтрат упаривали, остаток промывали сухим этилацетатом, высушивали в вакууме и перекристаллизовывали из этанола. Получали 2.35 г (84%) соединения (III), R_f 0.69 (Б), т. пл. 43–44°C, которое использовали на следующей стадии.

Метилловый эфир *N*-пальмитоил-*S*-[1,2-бис(гексадецилоксикарбонил)этил]-*L*-цистеинил-*L*-серина (IV). К раствору 0.4 г (0.39 ммоль) соединения (III) в 1 мл хлороформа добавляли раствор 0.06 г (0.39 ммоль) хлоргидрата метилового эфира серина в 4 мл этанола и 0.1 мл триэтиламина, раствор выдерживали в течение 6 ч при 75°C; контроль – ТСХ (Б). Соединение (IV) выделяли хроматографией на колонке с силикагелем (1.2 × 18 см) в хлороформе, получали 0.26 г (60%) хроматографически индивидуального соединения (IV), R_f 0.7 (Б), т. пл. 44–46°C. ИК-спектр (вазелиновое масло, ν , см⁻¹): 3344 (NH), 3175.5 (OH), 2850 (CH), 1724 (C=O), 1640 (амид I), 1580 (амид II), 1467 (CH₃), 1374 (CH₂), 712.8 (CH₂). ПМР-спектр: 0.85т (9H, -CH₃), 1.25м (78 H, CH₂-цепь); 1.65м (6H, -CH₂-CH₂-OC, -CH₂-CH₂-CO); 1.8–2.5м (2H, -CH₂-CONH); 2.5–3.75м (5H, CH₂-CH-S-CH₂); 3.8с (3H, -COOCH₃); 3.9–4.0м (2H, -CH₂OH); 4.15м (4H, CH₂-OC); 4.8т (1H, NH-CH-CO); 5.9–6.0м (1H, -NH-CH-COOCH₃); 6.95м (1H, NH). Масс-спектр, m/z : 1026 (M^+).

***N*-Пальмитоил-*S*-[1,2-бис(гексадецилоксикарбонил)этил]-*L*-цистеинил-*L*-серил-*L*-серин (V).** К раствору 0.3 г (0.59 ммоль) соединения (III) в 1 мл хлороформа добавляли раствор 0.097 г (0.59 ммоль) *L*-серил-*L*-серина в 5 мл этанола и 0.02 мл триэтиламина, раствор выдерживали 6 ч при 75°C; контроль – ТСХ (Б). Растворитель упаривали в вакууме, реакционную массу разбавляли водой до 50 мл, подкисляли 0.1 н. HCl до pH 5. Продукт реакции экстрагировали хлороформом, промывали водой до pH 7, пропускали через фильтр, смоченный хлороформом. Растворитель упаривали в вакууме. Получали 0.38 г (63%) хроматографически индивидуального соединения (V), R_f 0.6 (Б), т. пл. 195–197°C.

ИК-спектр (в пленке, ν , см⁻¹): 3344 (NH), 3175.5 (OH), 2850 (CH), 1724 (C=O), 1640 (амид I), 1580 (амид II), 1467 (CH₃), 1374 (CH₂), 712.8 (CH₂). ПМР-спектр: 0.85т (9H, -CH₃), 1.25м (78 H, CH₂-цепь); 1.65м (6H, CH₂-CH₂-OC, CH₂-CH₂-CO); 1.8–2.5м (2H, -CH₂-CONH); 2.5–3.75м (5H, CH₂-CH-S-CH₂); 4.1–4.15м (4H, -CH₂OH); 4.15м (4H, CH₂-OC); 4.8т (1H, NH-CH-CO); 5.7–5.8м (2H, -NH-CH-CO); 6.95м (1H, NH). Масс-спектр, m/z : 1099 (M^+).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ellouz F., Adam A., Ciorbaru R., Lederer E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974. V. 59. P. 1317–1321.
2. Lefrancier P., Choay J., Derrien M., Lederman I. // Int. J. Peptide Protein Res. 1977. V. 9. P. 249–253.
3. Migliore-Samour D., Bouchaudon J., Floch F., Zerial A., Ninet L., Werner G.H., Jolles P. // Life Sci. 1980. V. 26. P. 883–886.
4. Migliore-Samour D., Bouchaudon J., Floch F., Zerial A., Ninet L., Werner G.H., Jolles P. // C. R. Acad. Sci. 1979. V. 289D. P. 473–477.

5. Werner G.H., Floch F., Bouchaudon J., Zerial A., Migliore-Samour D., Jolles P. // Current Concepts in Human Immunology and Cancer Immunomodulation. 1982. V. 117. P. 645–652.
6. Parant M.A., Audibert F.M., Chedid L.A., Level M.R., Lefrancier P.L., Choay J.P., Lederer E. // Infect. Immunol. 1980. V. 27. P. 826–831.
7. Hemmi K., Takeno H., Okada S., Nakaguchi O., Kitaura I., Hashimoto M. // J. Am. Chem. Soc. 1981. V. 103. P. 7026–7030.
8. Melehers F., Braun V., Calanos C. // J. Exp. Med. 1975. V. 142. P. 473–482.
9. Bessler W.G., Braun V. // Z. Immunitätsforsch. 1975. B. 150. S. 193–197.
10. Bessler W.G., Resch K., Hancock E., Hantke K. // Z. Immunitätsforsch. 1977. B. 153. S. 11–22.
11. Izumi S., Nakahora K., Gotoh T., Hashimoto S., Kino T., Okuhara M., Aoki H., Imanaka H. // J. Antibiot. 1983. V. 36. P. 566–574.
12. Deres K., Schild H., Wiesmuller K.H., Jung G., Rammensee H.G. // Eur. J. Immunol. 1991. V. 21. P. 2649–2654.
13. Bachang G. // Tetrahedron. 1989. V. 45. P. 6331–6359.
14. Zhongyun D., Qi X., Fidler I.J. // J. Exp. Med. 1993. V. 177. P. 1071–1077.
15. Utsugi T., Nii A., Fan D., Pak C.C., Denkins Y., van Hoogevest P., Fidler I.J. // Cancer. Immunol. Immunother. 1991. V. 33. P. 285–292.
16. Loleit M., Ihlenfeldt H.G., Brunjes J., Jung G., Muller B., Hoffmann P., Bessler W.G., Pierres M., Haas G. // Immunobiol. 1996. V. 195. P. 61–73.
17. Bessler W.G., Johnson R.B., Wiesmuller K.H., Jung G. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1982. B. 363. P. 767–770.
18. Johnson R.B., Kohl S., Wiesmuller K.H. // Immunobiol. 1983. V. 165. P. 27–35.
19. Bessler W.G., Cox M., Lex A., Suchr B., Wiesmuller K.H., Jung G. // J. Immunol. 1983. V. 165. P. 1327–1335.
20. Wiesmuller K.H., Bessler W.G., Jung G. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1983. B. 364. P. 593–606.
21. Prass W., Ringsdorf H., Bessler W., Wiesmuller K.H., Jung G. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 900. P. 116–128.
22. Lex A., Wiesmuller K.H., Jung G., Bessler W.G. // J. Immunol. 1986. V. 137. P. 1421–1426.
23. Beck-Sikinger A.G., Rotering H., Wiesmuller K.H., Jung G. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1994. V. 375. P. 173–182.
24. Deres K., Schild H., Wiesmuller K.H., Jung G., Rammensee H.G. // Nature. 1989. V. 342. P. 561–564.
25. Себякин Ю.Л., Вельковская Л.А. // Докл. АН. 1994. Т. 338. С. 122–124.
26. Себякин Ю.Л., Федякова Н.Л., Рунова Т.Л. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 1101–1106.
27. Lapidot Y., Rappoport S., Wolman Y. // J. Lipid. Res. 1967. V. 8. P. 142–145.
28. Neuman R., Ringsdorf H. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 487–494.
29. Cybulla J., Bruckner H., Jung G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980. V. 92. P. 1389–1396.
30. Folsch G. // Acta Chem. Scand. 1955. V. 9. P. 1039–1052.

Synthesis of a Modified Analogue of the Natural Lipotriptide from the Cell Wall of *Escherichia coli*

M. P. Usanova and Yu. L. Sebyakin[#]

Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

The following prospective immunomodulators, aliphatic derivatives of amino acids and peptides, were synthesized: *N*-palmitoyl-*L*-cysteine, *N*-palmitoyl-*S*-[1,2-bis(hexadecyloxy carbonyl)ethyl]-*L*-cysteine, *N*-palmitoyl-*S*-[1,2-bis(hexadecyloxy carbonyl)ethyl]-*L*-cysteinyl-*L*-serine, and *N*-palmitoyl-*S*-[1,2-bis(hexadecyloxy carbonyl)ethyl]-*L*-cysteinyl-*L*-seryl-*L*-serine.

Key words: lipopeptides, immunostimulating activity, adjuvant

[#] *To whom correspondence should be addressed.*