



УДК 547.962 : 541.69

СИНТЕЗ И АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ АНАЛОГОВ  
ГРАМИЦИДИНА А

Шепель Е. Н., Иорданов Ст., Рябова И. Д.,  
Миросиников А. И., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Описан синтез [1-валин]-граммицидина А и его аналогов, отличающихся от природной молекулы длиной пептидной цепи, природой и чередованием *L*- и *D*-аминокислотных остатков. Изучены антимикробные свойства полученных соединений.

В последнее время значительный интерес вызывает группа биологически активных пептидов, индуцирующих ионную проницаемость искусственных и биологических мембран. К наиболее популярным соединениям этого типа относятся циклодепептидный антибиотик валиномицин и линейный пептидный антибиотик грамицидин А. Однако если механизм действия валиномицина, по крайней мере на модельных мембранах, можно считать в принципе установленным [1], то иначе обстоит дело в случае грамицидина А и родственных антибиотиков.

Грамицидин А (1), основной представитель группы антибиотиков, открытых Хотчкис и Дюбо в 1941 г. [2], представляет собой этаноламид *N*-формилпентадекапептида, построенный из набора пяти различных гидрофобных аминокислотных остатков с чередованием *L*- и *D*-конфигураций. Его строение было установлено и подтверждено полным синтезом Саргесом и Виткопом в 1965 г. [3, 4]:  $\text{HCO-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NH(CH}_2)_2\text{OH}$  (1).

Кроме представленной структуры ([1-валин]-граммицидин А) в биосинтетическом препарате грамицидина А присутствует в незначительных количествах [1-изолейцин]-граммицидин А.

Грамицидин В в положении 11 вместо остатка триптофана содержит остаток *L*-фенилаланина, а грамицидин С — остаток *L*-тирозина, подразделяясь в свою очередь на [1-валин]- и [1-изолейцин]-граммицидины В и С. В препарате «граммицидин», выпускаемом фирмой «Sigma», содержится грамицидина А, В и С соответственно 85, 10 и 5%.

Грамицидины не образуют в растворах устойчивых комплексов с ионами щелочных металлов, но тем не менее в исключительно низких концентрациях (начиная с  $10^{-11}$  моль/л) индуцируют ионную проницаемость искусственных и биологических мембран по отношению к протонам, ионам аммония и ионам щелочных металлов [4, 5].

В 1971 г. Урри и сотр. [6, 7] выдвинули интересное предположение о молекулярном механизме действия грамицидина А, учитывающее своеобразие его первичной структуры (в частности, набор аминокислотных

остатков с чередованием *L*- и *D*-конфигураций) и объясняющее ряд особенностей поведения антибиотика при действии на мембраны. Исходя из постулата о максимальном числе водородных связей в образовании на мембране устойчивого комплекса димера с липофильной молекулярной поверхностью длиной 30—50 Å (т. е. равной толщине бислойной мембраны), авторы предложили для антибиотика конформацию так называемой  $\pi_{L,D}$ -спирали, в которой амидные карбонильные группы расположены антипараллельно: C=O-группы *L*-аминокислотных остатков ориентированы вдоль оси спирали и направлены к C-концу молекулы, а карбонильные группы остатков *D*-аминокислот и глицина — к N-концевой формильной группе. В предложенной структуре имеется внутренняя полость, играющая роль канала проводимости при функционировании этого антибиотика на мембране. Таким образом, суть гипотезы Урри сводится к тому, что грамицидин А в виде димера располагается вдоль мембраны, образуя «трубу», через которую могут мигрировать ионы металлов; при этом не образуются комплексов с фиксированным положением катиона, хотя в любом месте спирали последний эффективно взаимодействует с несколькими карбонильными группами, смещающимися по направлению к ее оси.

В 1974 г. Витч и Блаут [8, 9] нашли, что грамицидин А в растворах образует по меньшей мере четыре устойчивых димера. Эти агрегаты были разделены хроматографией в тонком слое силикагеля и охарактеризованы с помощью различных физико-химических методов. На основании этих данных была предложена новая гипотеза, сводящаяся к образованию грамицидином А двойной спирали в растворах или на мембранах, где две молекулы антибиотика располагаются вдоль общей оси и удерживаются системой межмолекулярных водородных связей [8—10]. Предложенная модель также имеет внутреннюю полость, способную служить каналом проводимости для ионов щелочных металлов.

Несмотря на привлекательность изложенных гипотез, проблема пространственного строения антибиотика еще не решена окончательно и требует более четкого подтверждения экспериментальными данными. Учитывая критичность длины пептидной цепи грамицидина А, природы и расположения аминокислотных остатков чередующихся конфигураций, мы синтезировали ряд аналогов грамицидина А, представленных в табл. 1, и исследовали их антимикробную активность, а также некоторые физико-химические свойства\*; для сравнения нами был получен также валин-грамицидин А.

Исходя из ранее высказанного предположения, что остатки триптофана в грамицидине А ответственны за стабильность ассоциатов в растворе [1] (и, возможно, на мембранах), и учитывая, что молекула природного антибиотика состоит из нечетного количества аминокислотных остатков, мы предприняли синтез ряда аналогов, в которых были выпущены одна (соединения (2) и (3)), две (соединения (4), (5) и (6)), три (соединения (7), (8) и (9)) и четыре (соединения (10) и (11)) *L,D*-пары аминокислот. В аналоге (20) длина пептидной цепи увеличена на одну такую же пару. При этом варьировалось содержание как ароматических, так и алифатических аминокислот, но сохранялось нечетное число остатков и чередование конфигураций. Соединения (15) и (16) являются пентадекапептидами, в которых без нарушения чередования конфигураций была произведена замена одних аминокислотных остатков на другие. Для увеличения гидрофобности молекулы в соединении (15) остатки *L*-аланина в положениях 3 и 5 заменены остатками *L*-валина, а остатки *D*-валина в положениях 6 и 8 заменены на *D*-лейцин. Если для перечисленных аналогов мы стремились не нарушать основу уникального строения молекулы природ-

\* Результаты физико-химических исследований будут представлены в следующем сообщении.

Таблица 1

## Строение и данные по синтезу грамицидина А и его аналогов

Соединение		N-концевой пептид		C-концевой пептид		Растворитель	Время реак- ции, ч	Метод **	Выход, %	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> (метанол)						
		шир	кол-во, моль	шир	кол-во, моль											
1	L	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
(1)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH											DMFA	48	A	49	-0,6
(2)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(53)											48	»	56	+59,3
(3)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(53)											48	»	43	+51,7
(4)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(51)											36	B	46	+56,9
(5)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(53)											48	A	51	+36,4
(6)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(53)											48	»	55	+30,5
(7)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(51)											36	B	66	+87,0
(8)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(53)											48	A	52	+10,7
(9)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(53)											48	A	49	+11,2
(10)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(51)											36	B	59	+40,8
(11)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(53)											48	A	75	-10,4
(12)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(129)											48	»	56	+0,41
(13)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(180)											48	»	58	+0,42
(14)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(51)											36	B	79	+0,31
(15)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(51)											48	»	71	+0,41
(16)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(53)											48	A	54	+0,49
(17)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(53)											48	»	55	+0,31
(18)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(53)											48	»	57	+0,34
(19)	HCO-Leu-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(128)											48	»	58	+0,27
(20)	HCO-Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	(53)											48	»	49	+0,27

\* Подчеркнуты модифицированные или добавленные аминокислотные остатки.

\*\* А — с использованием N, N'-дициклогексилкарбодимиды; В — метод активированных N-оксисукцинимидных эфиров.

Выходы и удельное вращение промежуточных соединений, описанных ранее [3]

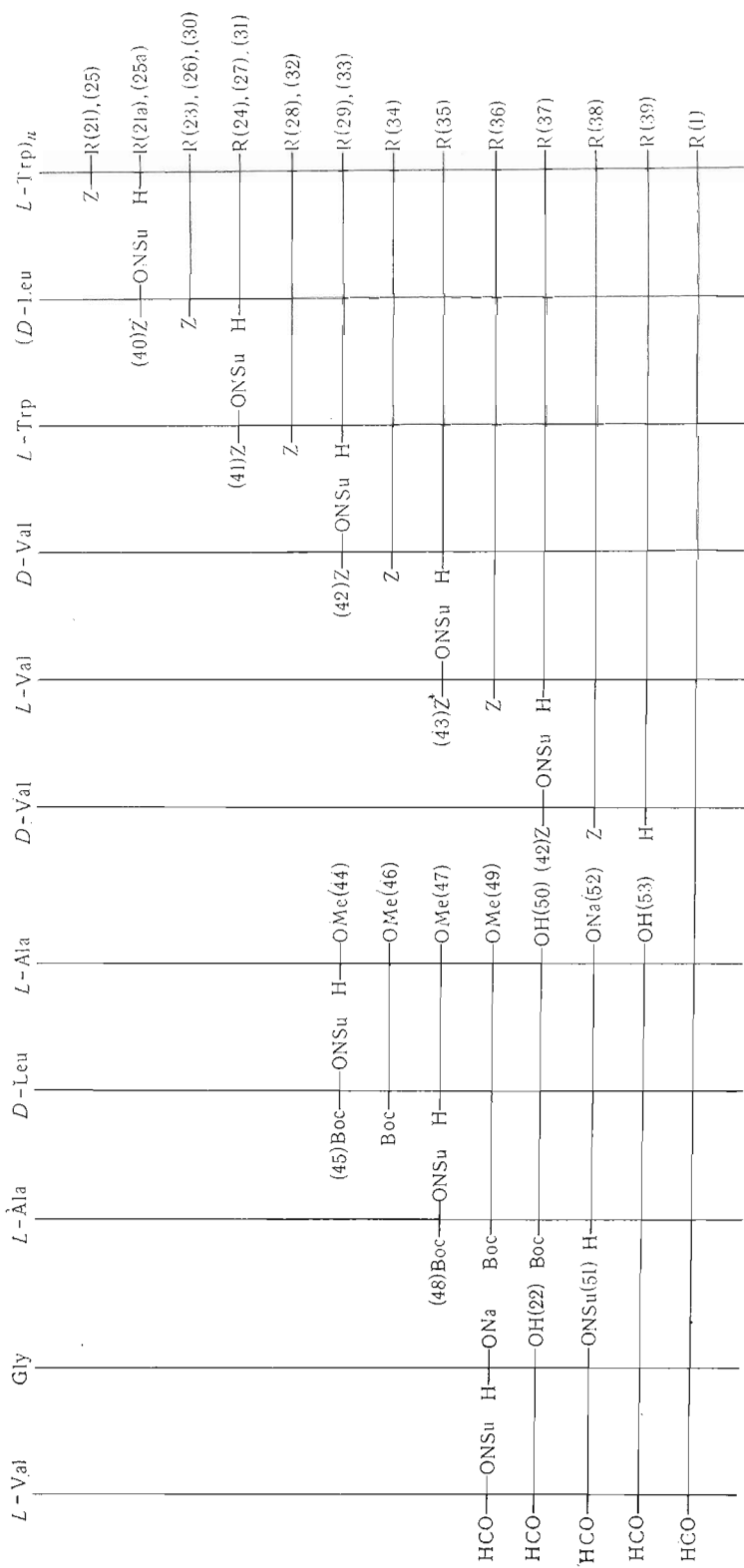
Соединение	Настоящая работа		Данные работы [3]	
	выход, %	$[\alpha]_D$ (метанол)	выход, %	$[\alpha]_D$
(21) Z-L-Trp-NH(CI <sup>+</sup> ) <sub>2</sub> OH	84	-6,1	62	-4,6
(22) HCO-L-Val-Gly-OH	85	-51,3	30	-49,1
(23) Z-D-Leu-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	85	-9,5	84	—
(24) H-D-Leu-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	100	—	96,5	—
(25) Z-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	82	+24,6	81	+24,6
(26) Z-(D-Leu-L-Trp) <sub>2</sub> -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	93	-10,1	90	-3,0
(27) H-(D-Leu-L-Trp) <sub>2</sub> -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	100	—	100	—
(28) Z-L-Trp-(D-Leu-L-Trp) <sub>2</sub> -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	93	+52,2	92	—
(29) H-L-Trp-(D-Leu-L-Trp) <sub>2</sub> -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	100	—	88	—
(30) Z-(D-Leu-L-Trp) <sub>3</sub> -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	92	+9,1	93	—
(31) H-(D-Leu-L-Trp) <sub>3</sub> -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	100	—	77	—
(32) Z-(L-Trp-D-Leu) <sub>3</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	89	+79,0	82	—
(33) H-(L-Trp-D-Leu) <sub>3</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	100	—	100	—
(34) Z-D-Val-(L-Trp-D-Leu) <sub>3</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	83	+41,9	81	—
(35) H-D-Val-(L-Trp-D-Leu) <sub>3</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	89	—	74	—
(36) Z-L-Val-D-Val-(L-Trp-D-Leu) <sub>3</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	86	-62,3	89	—
(37) H-L-Val-D-Val-(L-Trp-D-Leu) <sub>3</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	93	—	88	—
(38) Z-D-Val-L-Val-D-Val-(L-Trp-D-Leu) <sub>3</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	79	+62,9	83	—
(39) H-D-Val-L-Val-D-Val-(L-Trp-D-Leu) <sub>3</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	78	—	60	—

ного антибиотика (нечетное количество и чередующаяся конфигурация аминокислотных остатков), то в аналогах следующей группы мы исключили один или три аминокислотных остатка и получили соединения с четным числом остатков — 14-членные пептиды (12) и (13) и 12-членный (14). Соединения (17) и (18) имеют в своем составе 15 и 16 аминокислотных остатков, причем в этом случае нарушено чередование конфигураций аминокислот. Аналог (19) также построен из 16 аминокислотных остатков, но у него сохранен принцип чередования конфигураций.

К настоящему времени синтез валин-грамидина А осуществлен по двум схемам: с использованием классических методов пептидной химии (Виткоп [3]) и на полимерном носителе по методу Р. Меррифилда (Гросс и сотр. [11]). Для получения как самого грамицидина А, так и его аналогов мы взяли за основу схему, предложенную Виткопом, внося ряд изменений с учетом последних достижений пептидной химии при получении промежуточных соединений. В табл. 2 приведены характеристики промежуточных соединений в сравнении с данными группы Виткопа при синтезе валин-грамидина [4].

Синтез грамицидина А был осуществлен конденсацией N-концевого N-формилпентапептида (53) и C-концевого этаноламида декапептида (39) (схема 1), дициклогексилкарбодимидным методом в присутствии трех эквивалентов N-оксисукцинимиды при низкой температуре (метод А). В отличие от схемы, предложенной Виткопом, синтез декапептида (39) осуществлялся последовательным наращиванием полипептидной цепи с помощью N-оксисукцинимидных эфиров N-бензилоксикарбониламинокислот, а не методом смешанных ангидридов с использованием этилового эфира хлорурогольной кислоты. Это изменение упростило синтез и привело в большинстве случаев к индивидуальным соединениям с хорошим выхо-

Схема 1



R = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH. (21), (21a), (23), (24) n = 1; (25) - (29) n = 2; (30) - (39), (1) n = 3

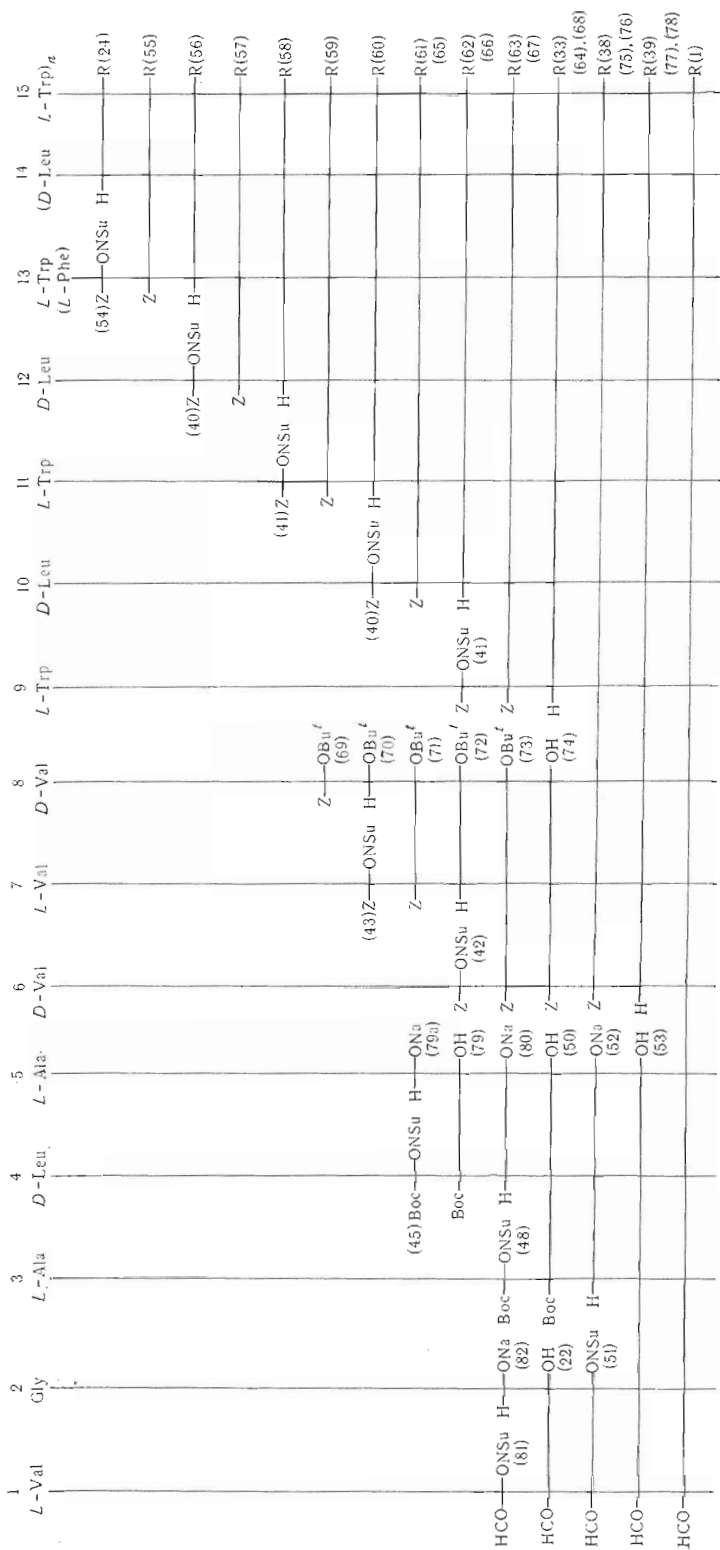
Выходы и константы новых промежуточных соединений

Соединение	Выход, %	$R_f$ (система)	$[\alpha]_D^{20}$ (с)
(46) Boc-D-Leu-L-Ala-OMe	95	0,65 (д, 3:1)	+3,1 (0,13)
(49) Boc-L-Ala-D-Leu-L-Ala-OMe	85	0,61 (д, 3:1)	+5,3 (0,12)
(51) HCO-L-Val-Gly-ONSu	87	0,59 (в, 2:1)	-31,0 (4)
(53) HCO-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-OH	79	0,38 (г, 4:1)	-2,5 (0,1)
(55) Z-L-Phe-D-Leu-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	85	0,61 (а, 9:1)	+21,9 (0,15)
(57) Z-D-Leu-L-Phe-D-Leu-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	86	0,6 (а, 9:1)	-4,7 (0,17)
(59) Z-L-Trp-D-Leu-L-Phe-D-Leu-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	87	0,57 (а, 9:1)	+17,6 (0,21)
(61) Z-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Phe-D-Leu-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	91	0,54 (а, 9:1)	+28,9 (0,14)
(63) Z-(L-Trp-D-Leu) <sub>2</sub> -L-Phe-D-Leu-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	88	0,5 (а, 9:1)	+44,9 (0,15)
(65) Z-(D-Leu-L-Trp) <sub>4</sub> -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	84	0,46 (а, 9:1)	+31,0 (0,14)
(67) Z-L-Trp(D-Leu-L-Trp) <sub>4</sub> -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	60	0,22; 0,54; 0,76 (а, 9:1)	+36,5 (0,23)
(69) Z-D-Val-OBu <sup>t</sup>	89	0,53 (бензол)	+3,6 (0,15)
(71) Z-L-Val-D-Val-OBu <sup>t</sup>	91	0,38 (бензол)	+4,9 (0,15)
(73) Z-D-Val-L-Val-D-Val-OBu <sup>t</sup>	90	0,21 (бензол)	+5,17 (0,1)
(75) Z-D-Val-L-Val-D-Val-(L-Trp-D-Leu) <sub>2</sub> -L-Phe-D-Leu-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	68	0,48 (а, 7:1)	+19,3 (0,1)
(76) Z-D-Val-L-Val-D-Val-(L-Trp-D-Leu) <sub>4</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	69	0,51 (а, 7:1)	-43,9 (0,1)
(79) Boc-D-Leu-L-Ala-OH	95	0,65 (д, 3:1)	+3,1 (0,13)
(81) Boc-L-Ala-D-Leu-L-Ala-OH	85	0,61 (д, 3:1)	+15,9 (0,12)
(83) Z-D-Val-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	84	0,81 (а, 9:1)	-4,0 (4)
(85) Z-L-Val-D-Val-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	81	0,77 (а, 9:1)	-12,2 (4)
(87) Z-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	87	0,72 (а, 9:1)	-18,8 (4)
(88) Z-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	74	0,59 (а, 9:1)	+5,5 (4)
(90) Z-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	79	0,55 (а, 9:1)	+15,2 (4)
(92) Z-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	62	0,52 (а, 9:1)	+10,4 (4)

Таблица 3 (продолжение)

Соединение	Выход, %	R <sub>f</sub> (система)	[α] <sub>D</sub> (с)
(93) Z-D-Val-(L-Trp-D-Leu) <sub>2</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	58	0,56 (а, 9:1)	+21,0 (1)
(95) Z-L-Val-D-Val-(L-Trp-D-Leu) <sub>2</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	61	0,47 (а, 9:1)	+40,2 (1)
(97) Z-D-Val-L-Val-D-Val-(L-Trp-D-Leu) <sub>2</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	51	0,43 (а, 9:1)	+34,1 (1)
(98) Z-D-Val-Gly-OBu <sup>t</sup>	96	0,71 (л, 3:1)	+25,5 (0,15)
(100) Z-L-Val-D-Val-Gly-OBu <sup>t</sup>	92	0,67 (л, 3:1)	+17,4 (0,3)
(102) Z-D-Val-L-Val-D-Val-Gly-OBu <sup>t</sup>	88	0,59 (л, 3:1)	+13,4 (0,13)
(104) Z-D-Val-L-Val-D-Val-Gly-(L-Trp-D-Leu) <sub>2</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	69	0,49 (а, 7:1)	+34,11 (0,1)
(106) Z-L-Trp <sub>2</sub> -(D-Leu-L-Trp) <sub>2</sub> -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	87	0,57 (а, 9:1)	+12,0 (0,1)
(108) Z-D-Val-L-Val-D-Val-Gly-L-Trp <sub>2</sub> -(D-Leu-L-Trp) <sub>2</sub> -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	67	0,48 (а, 7:1)	+4,9 (0,15)
(110) Z-D-Leu-(L-Trp-D-Leu) <sub>2</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	84	0,46 (а, 9:1)	+31,0 (0,18)
(112) Z-L-Val-(D-Leu-L-Trp) <sub>4</sub> -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	85	0,22; 0,54; 0,76 (а, 9:1); 0,55 (б, 2:1)	+22,8 (0,2)
(114) Z-D-Val-L-Val-(D-Leu-L-Trp) <sub>4</sub> -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	66	0,53 (а, 7:1)	+13,9 (0,4)
(116) Z-(L-Val-D-Leu) <sub>2</sub> -(L-Trp-D-Leu) <sub>2</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	56	0,23; 0,48; 0,68; (а, 7:1); 0,67 (б, 1:1)	+26,3 (0,1)
(118) Z-D-Leu-(L-Val-D-Leu) <sub>2</sub> -(L-Trp-D-Leu) <sub>2</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	84	0,51 (а, 7:1)	+11,3 (0,1)
(120) Z-(L-Val-D-Leu) <sub>2</sub> -(L-Trp-D-Leu) <sub>2</sub> -L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	57	0,25; 0,51; 0,72 (а, 7:1); 0,66 (б, 1:1)	-3,7 (0,15)
(122) Boc-L-Ala-L-Ala-OH	81	0,68 (г, 5:1)	+12,9 (0,12)
(124) Boc-L-Val-Gly-OH	91	0,69 (г, 5:1)	-19,2 (0,1)
(126) HCO-D-Leu-L-Val-Gly-OH	79	0,61 (г, 5:1)	-12,3 (0,15)
(127) HCO-D-Leu-L-Val-Gly-ONSu	81	0,56 (в, 2:1)	-24,7 (0,3)
(128) HCO-D-Leu-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-OH	52	0,47 (г, 4:1)	-6,1 (0,15)
(129) HCO-L-Val-Gly-L-Ala-L-Ala-OH	78	0,49 (г, 4:1)	-60,1 (0,15)
(130) HCO-L-Val-Gly-D-Leu-L-Ala-OH	75	0,51 (г, 4:1)	+3,52 (0,1)

Схема 2



R = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH. (55)-(64), (75), (77) Phe, n = 1; (24), (33), (38), (39), (1) n = 1; (65)-(68), (76), (78) n = 2



Антимикробная активность грамицидина А и его аналогов

Соединение	Минимальная концентрация, ингибирующая рост (мкг/мл)							
	<i>St. aureus</i> 209P	<i>Sar. lutea</i>	<i>Mic. liseo-deticus</i>	<i>Str. faecalis</i>	<i>Bac. subtilis</i>	<i>Myob. phlei</i>	<i>E. coli</i> B	<i>Bac. anthracis</i>
[Val <sup>1</sup> ]-грамицидин А (1)	0,05—0,1	0,0007—0,0015	0,0007—0,0015	0,0007—0,0015	1—2	2	10	10
Грамицидин А (Sigma)	0,05—0,1	0,0007—0,0015	0,0007—0,0015	0,0007—0,0015	1—2	2	10	10
(2)	1—2	0,3—0,5	0,1—0,2	0,2—0,4	2—4	2	10	10
(3)	0,07—0,1	0,03	0,003	0,03—0,07	1	0,2—0,4	10	10
(4)	10	2	10	10	10	10	10	10
(15)	>20	>20	0,8	0,4—0,8	>20	>20	>20	>20
(18)	>20	2—4	2—4	4—8	>20	>20	>20	>20
(20)	>20	2	2	1—2	>20	>20	>20	>20

дом. Однако образование амидной связи на стадии получения нона- (36) и декапептида (38) проходило с трудом и, кроме того, снятие бензилоксикарбонильной группы гидрогенолизом соединений (34) и (36) над палладиевым катализатором в метаноле протекало с низкой скоростью. Поэтому декапептид (39) был получен также конденсацией гептапептида (33) и трипептида (74) (схема 2) с помощью дициклогексилкарбодимида в присутствии N-оксисукцинимиды. N-Формилпентапептид (53) был синтезирован конденсацией N-сукцинимидного эфира N-формил-L-валилглицина (51) с трипептидом (52) (схема 1), последний в свою очередь получили по схеме 1, через метиловый эфир трипептида (49), в то время как по схеме 2 пептид (52) получен с защитой C-концевой группы солеобразованием. В отличие от схемы, предложенной Виткопом, в которой N-концевая формильная группа вводилась на последней стадии синтеза, мы использовали N-формильную группу в качестве защитной для исходного L-валина.

Соединения (2), (3), (5), (6), (8), (9), (11) — (13), (16) — (20) получались конденсацией пептидов дициклогексилкарбодимидным методом с добавлением N-оксисукцинимиды; соединения (4), (7), (10), (14), (15) получали, используя N-оксисукцинимидный эфир дипептида (табл. 1).

В табл. 3 приведены промежуточные соединения, полученные при синтезе аналогов (2) — (20) грамицидина А.

Изучение антимикробной активности аналогов грамицидина А (табл. 4) показало, что только два 13-членных аналога (соединения (2) и (3)) обладают выраженным антимикробным действием, хотя и более слабым, чем у природного антибиотика (препарат фирмы «Sigma», США) или синтетического валин-грамицидина А. Все остальные модификации молекулы грамицидина А резко снижают его антимикробную активность. Физико-химические исследования полученных аналогов будут опубликованы в наших дальнейших сообщениях.

### Экспериментальная часть

Индивидуальность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на силикагеле марки «Eastman» (США) в системе растворителей: этилацетат — бензол (а), бензол — уксусная кислота (б), хлороформ — метанол (в), бензол — метанол (г), бензол — этилацетат (д). Константы промежуточных соединений, известных из литературных источников, представлены в табл. 2; константы новых соединений, полученных в ходе синтеза грамицидина А и его аналогов, — в табл. 3; константы и данные

Схема 3

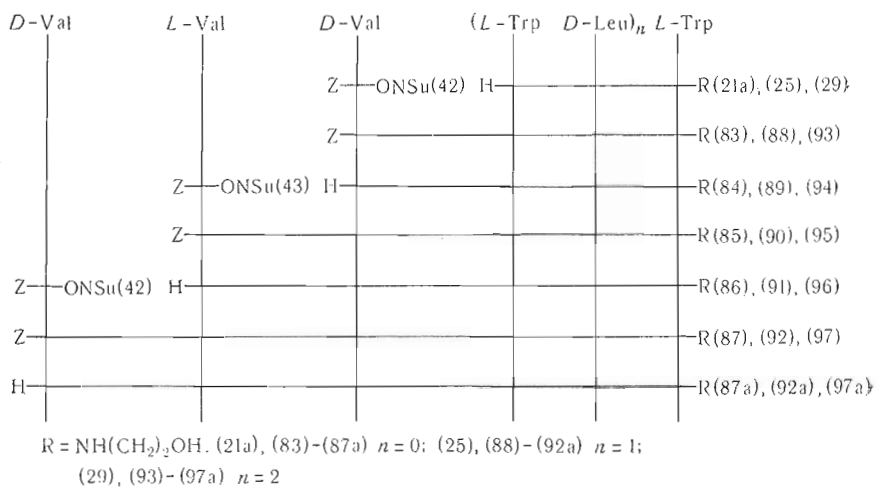


Схема 4

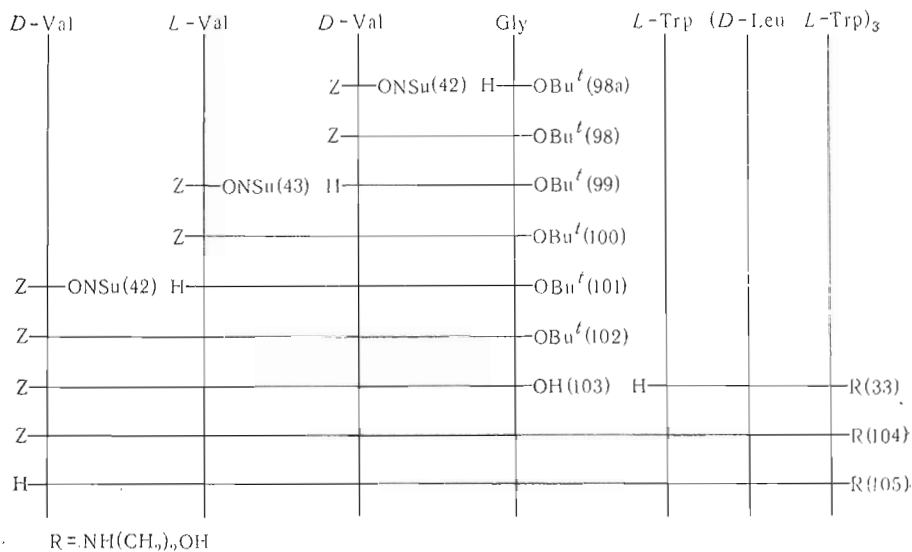


Схема 5

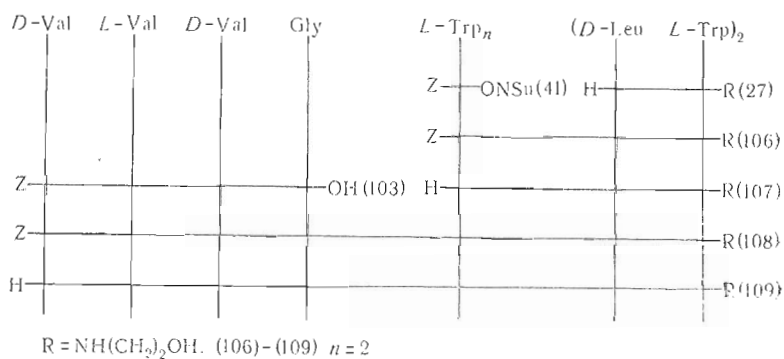


Схема 6

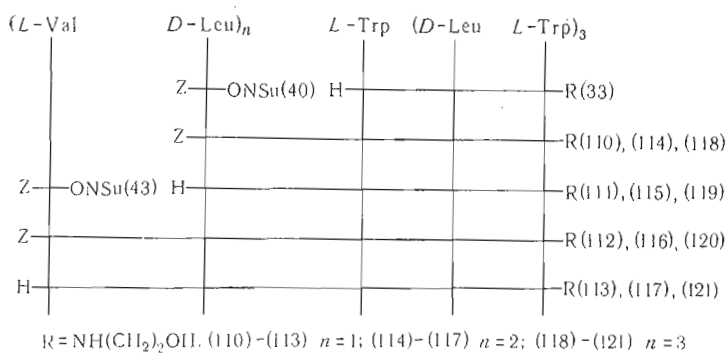
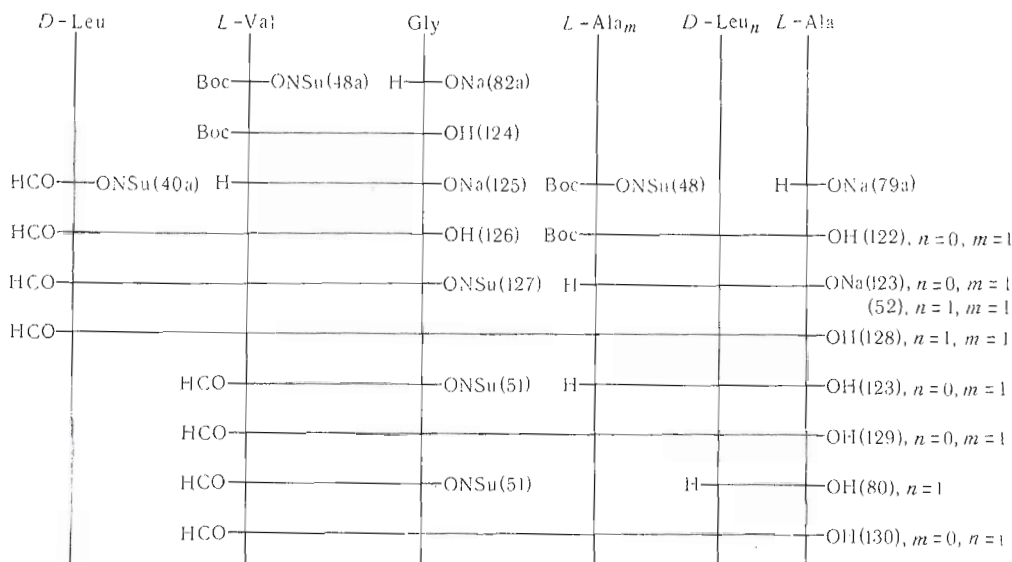


Схема 7



по синтезу конечных продуктов — грамицидина А и его аналогов — в табл. 1. Состав всех конечных и промежуточных соединений проверяли аминокислотным анализом. Антимикробную активность пептидов изучали методом серийных разведений на среде следующего состава: на 1 л водопроводной воды глюкозы — 10 г, NaCl — 5 г, пептона — 5 г, бульона Хоттингера — 30 мл (750 мг% аминного азота), pH 7,0—7,2, бактериальная нагрузка 1000 клеток/мл. Соединения растворялись в диметилформамиде, причем содержание растворителя в культуральной среде не превышало 2%.

N-Защищенные аминокислоты, а также их N-оксисукцинимидные, метиловые и *tert*-бутиловые эфиры получали по стандартным методикам [12]. После каждой стадии конденсации, при получении защищенных пептидов, реакционную массу промывали 10%-ным раствором лимонной кислоты, насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и отгоняли растворитель. Дальнейшую очистку защищенных пептидов проводили колоночной хроматографией на окиси кремния в соответствующей системе растворителей (градиентное элюирование) (см. табл. 3).

Бензилоксикарбонильную группу удаляли гидрогенолизом над палладиевой чернью в метаноле при концентрации пептида не более 5%. В случае пептидов (69), (71), (73), (98), (100) и (102) (схемы 2, 4) гидрирование осуществляли в присутствии 1 моль уксусной кислоты во избежание

образования дикетопиперазинов. Снятие *трет*-бутилоксикарбонильной группы и гидролиз *трет*-бутилового эфира проводили абсолютной трифторуксусной кислотой (концентрация пептида 15—20%) при 20° в течение 30 мин. Затем, отогнав кислоту, продукт высаживали абсолютным эфиром.

*Трет*-бутилоксикарбонилпептиды (50), (79), (122), (124) и *формил*-пептиды (22), (126) [12] (схемы 2,7). К 1 ммоль компонента со свободной карбоксильной группой добавляли 3 ммоль  $\text{NaHCO}_3$  и полученные Натсоли (79а), (80), (81), (82) или (125) растворяли в воде до суммарной концентрации компонентов 20%. При интенсивном перемешивании прибавляли 20%-ный раствор (1 ммоль) активированного эфира (40а), (45), (48), (48а) или (81) в диоксане. Реакционную смесь выдерживали при 20° в течение 24 ч, разбавляли в 4 раза водой и дважды экстрагировали эфиром. Водный слой пропускали через дауэкс 1 × 2 (в  $\text{HCO}_3^-$ ). Пептиды элюировали 1 н. муравьиной кислотой, раствор упаривали и получали хроматографически чистые пептиды.

*N*-Оксисукцинимидные эфиры (51) и (127) (схемы 1, 7). 1 ммоль пептида (22) или (126) растворяли в абсолютном диметилформамиде при 0°, перемешивали и добавляли 1 ммоль *N*-оксисукцинимид и 1 ммоль дициклогексилкарбодимид. Реакционную смесь перемешивали 10 ч (20°) фильтрат упаривали и полученный продукт кристаллизовали из смеси диоксана с диметилформамидом (1 : 1).

*Формил*пептиды (53), (128), (129) и (130) (схемы 1, 7). К 1 ммоль соединения (52), (80) или (123) в абсолютном пиридине при перемешивании добавляли 1 ммоль активированного эфира (51) или (127) (суммарная концентрация компонентов 15%). Смесь выдерживали при комнатной температуре 12 ч, отгоняли растворитель, остаток растворяли в воде и пропускали через дауэкс 1 × 2 ( $\text{HCO}_3^-$ ). Пептиды элюировали 5—10%-ной муравьиной кислотой, после упаривания которой получали хроматографически чистые вещества.

*Метил*овые эфиры *трет*-бутилоксикарбонилпептидов (46), (49) и *трет*-бутиловые эфиры бензилоксикарбонилпептидов (71), (73), (98), (100), (102) (схемы 1, 2, 4). В абсолютном диоксане при 10° и перемешивании смешивали 1 ммоль соединения (44), (47), (70), (72), (98а), (99) или (101), 1 ммоль триэтиламина и 1 ммоль активированного эфира (42), (43) или (48). Реакционную массу выдерживали 12 ч при 20°, упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали и после удаления растворителя очищали колоночной хроматографией на силикагеле с элюцией в системе гексан — бензол — этилацетат (градиентное элюирование).

*Этан*оламиды бензилоксикарбонилпептидов (55), (57), (59), (61), (63), (65), (67), (83), (85), (87), (88), (90), (92), (93), (95), (97), (106), (112), (114), (116), (118) и (120) (схемы 1—6). Пептиды получали методом активированных эфиров, используя 1 ммоль *N*-оксисукцинимидного эфира соответствующей бензилоксикарбониламиноокислоты и 1 ммоль соответствующего компонента со свободной аминогруппой (см. схемы) в абсолютном диметилформамиде, в течение 12—24 ч при 20°. После удаления растворителя пептиды очищали колоночной хроматографией на силикагеле с элюцией в системах хлороформ — метанол или хлороформ — этилацетат — этанол (градиентное элюирование).

*Этан*оламиды бензилоксикарбонилпептидов (38), (75), (76), (104), (108) и *этан*оламиды *формил*пептидов (1) — (3), (5), (6), (8), (9), (11) — (14), (16) — (20) (табл. 1, схемы 2, 4, 5). Пептиды получали конденсацией блоков дициклогексилкарбодимидным методом. Смешивали в абсолютном диметилформамиде (с суммарной концентрацией компонентов 15%) 1 ммоль аминокompонента, 3 ммоль *N*-оксисукцинимид и 1 ммоль *N*-концевого пептида со свободной карбоксильной группой. Реакционную смесь охлаждали до -20°, добавляли 1 ммоль дициклогексилкарбодимид, выдерживали при этой температуре 2 ч, при 0° — 24 ч и при 20° — 48 ч.

Затем, отогнав растворитель, реакционную смесь растворяли в 90%-ном метаноле и пропускали последовательно через дваэкс  $50 \times 2$  ( $H^+$ ) и  $1 \times 2$  ( $HCO_3^-$ ). Элюат упаривали, остаток хроматографировали на сефадексе LH-20 в метаноле, после удаления метанола проводили последовательно хроматографию на окиси кремния и окиси алюминия с элюцией в системе хлороформ — этилацетат — этанол (градиентное элюирование).

*Этаноламиды формилпептидов (4), (7), (10) и (15)* (табл. 1) 2 ммоль пептида (51) растворяли в абсолютном диметилформамиде и добавляли 1 ммоль одного из соединений (29), (33), (37) или (121) (суммарная концентрация компонентов 15%). Реакционную смесь перемешивали при 20° в течение 36 ч, отгоняли растворитель и очищали, как описано в предыдущей методике.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. (1974) Мембрано-активные комплексы, с. 273—416, «Наука», М.
2. Hotchkiss R. D., Dubos R. J. (1941) J. Biol. Chem., 141, 155—161.
3. Sarges R., Witkop B. (1965) J. Amer. Chem. Soc., 87, 2011—2020.
4. Sarges R., Witkop B. (1965) J. Amer. Chem. Soc., 87, 2020—2027.
5. Byrn St. R. (1974) Biochemistry, 13, 5186—5193.
6. Urry D. W. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 672—676.
7. Urry D. W., Goodall M. C., Glickson J. D., Myers D. F. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 1907—1911.
8. Veatch W. R., Blout E. R. (1974) Biochemistry, 13, 5257—5264.
9. Veatch W. R., Fossel E. T., Blout E. R. (1974) Biochemistry, 13, 5249—5257.
10. Fossel E. T., Veatch W. R., Ovchinnikov Yu. A., Blout E. R. (1974) Biochemistry, 13, 5264—5275.
11. Fontana A., Gross E. (1973) Proc. 12 European Peptide Symposium, Reinhardtbrunn, 1972, North-Holland Publ. Co., 229—234.
12. Шредер Е., Любке К. (1967) Пептиды, т. 1, с. 28—116, «Мир», М.

Поступила в редакцию  
1.XII.1975

#### SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NEW GRAMICIDIN A ANALOGS

SHEPEL E. N., IORDANOV St., 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*

To probe the relations between the structure, physico-chemical characteristics and biological activity of membrane-active compounds, the synthesis has been performed for gramicidin A and its analogs differing from the antibiotic in chain length or in nature and alternation of *L*- and *D*-amino acid residues. The implications of the observed structure-antimicrobial activity dependence are discussed.