



УДК 547.96;541.6

## СИНТЕЗ ДЕПСИПЕПТИДНЫХ АНАЛОГОВ ГРАМИЦИДИНА S \*

Крут Н. А., Жузе А. Л., Андропова Т. М.,  
Филатова М. П., Раздель Г. А., Щукина Л. А.

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

Для выяснения вклада ВМВС в конформационную устойчивость грамицидина S(I) и влияния их элиминирования на биологическую активность антибиотика синтезированы депсипептидные аналоги [NuIv<sup>1,6</sup>]-GS (II) и [NuIv<sup>1,6</sup>, NuIc<sup>3,8</sup>]-GS (III). Последовательным наращиванием цепи получены защищенные пентадепсипептиды, которые после селективного отщепления N- или C-защитных групп превращены хлорангидридным методом в линейные декадепсипептиды. Циклизация последних осуществлена методом *n*-нитрофениловых эфиров и хлорангидридным методом.

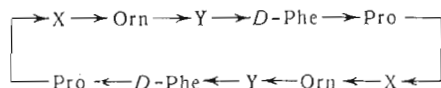
Изучение конформации ряда биологически активных пептидов показало, что в организации их пространственной структуры участвуют ВМВС [1–3]. Одним из возможных подходов к локализации ВМВС и выяснению их роли в сохранении устойчивой конформации пептидов может явиться депсипептидная модификация молекул, при которой NH-группы амидных связей, участвующих в образовании ВМВС, заменяются на атомы кислорода. Поскольку известно, что замена амидной группы на близкую ей в стереохимическом отношении сложноэфирную группу не лишает пептиды специфического биологического действия [4, 5], такая модификация открывает также возможность корреляции между конформационными превращениями пептидов и их биологической активностью.

В качестве объекта для выяснения возможности реализации предлагаемого подхода к изучению биологически активных пептидов был выбран антибиотик грамицидин S(GS) (I), конформация которого в настоящее время достаточно четко установлена [3, 6, 7]. Показано, что в растворителях различной полярности этот антибиотик обладает жесткой пространственной структурой с четырьмя ВМВС типа CO...NH между остатками валина и лейцина.

С целью выяснения вклада ВМВС в конформационную устойчивость грамицидина S и влияния на биологическую активность антибиотика их элиминирования был предпринят синтез депсипептидных аналогов (II) и (III), в которых два остатка валина или одновременно два остатка валина и два остатка лейцина заменены на остатки соответствующих окси-

\* Сокращения: OBU<sup>t</sup> – трет-бутилокси; ONp – *n*-нитрофенокси; Z – бензилоксикарбонил; NuIv – *L*- $\alpha$ -оксизовалериановая кислота, NuIc – *L*- $\alpha$ -оксизокапроновая кислота, ДЦГК – N,N'-дихлороксилкарбодимид, ДЦГМ – N,N'-дихлороксилмочевина, ТЭА – триэтиламин, ТГФ – тетрагидрофуран, ДМФА – диметилформамид, ТФУ – трифторуксусная кислота, Fomf – формил-, ВМВС – внутримолекулярные водородные связи.

кислот и, следовательно, отсутствуют две из четырех (II) или все четыре (III) ВМВС



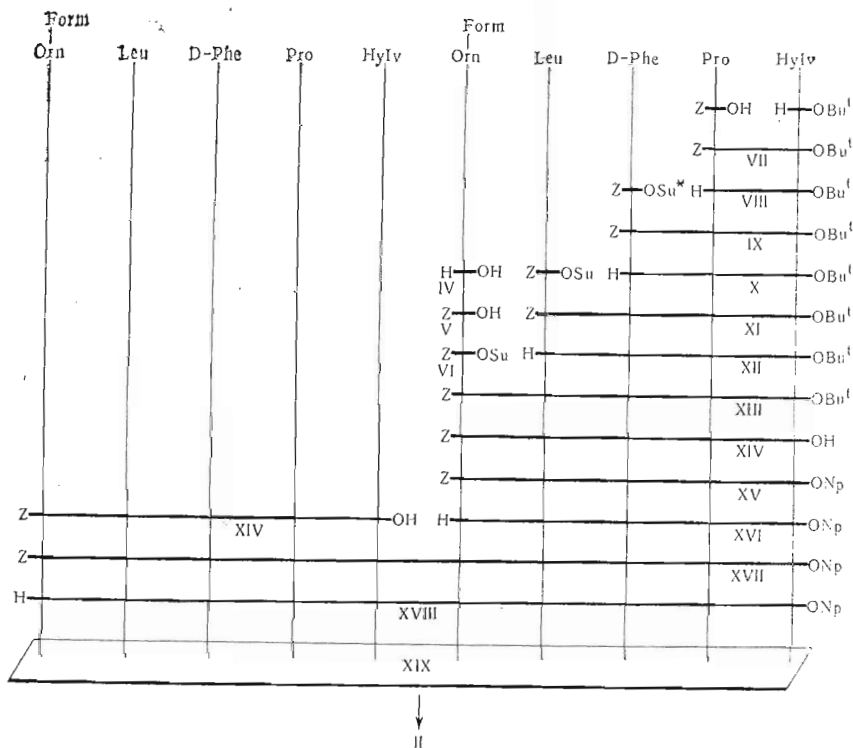
(I) X = Val, Y = Leu (GS)

(II) X = HyIv, Y = Leu ([HyIv<sup>1,6</sup>]-GS)

(III) X = HyIv, Y = HyIc ([HyIv<sup>1,6</sup>, HyIc<sup>3,8</sup>]-GS)

[HyIv<sup>1,6</sup>]-GS (II) синтезирован по схеме 1, которая включает ступенчатый синтез защищенного пентадецепептида (XIII), превращение его в карбоксильную (XIV) и аминок-(XVI) компоненты и соединение последних в декадецепептид (XVII) хлорангидридным методом. Значительная разница в скорости ацилирования аминогруппы хлорангидридами и активированными эфирами позволила использовать *n*-нитрофениловый эфир сначала для защиты карбоксильной функции пентадецепептида (XIV), а затем для циклизации декадецепептида (XVIII) методом активированных эфиров.

Схема 1



Для защиты  $\alpha$ -аминогрупп использована бензилоксикарбонильная группировка. Что касается  $\delta$ -аминогруппы орнитина, то для ее блокирования была выбрана формильная группировка, позволяющая осуществить селективное отщепление N- и C-защитных групп. С другой стороны, введение этой защитной группы обеспечило получение аналогов (II) и (III) в виде хорошо растворимых в неполярных растворителях N,N'-диформильных производных (XIX) и (XXVI), использованных для проведения физико-химических исследований [8].

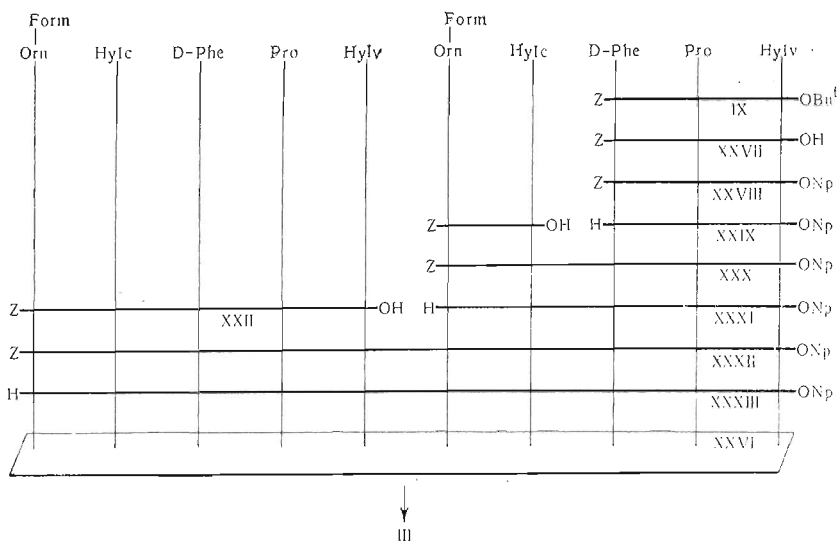
\* OSu — N-оксусуцинимид.

N<sup>6</sup>-формил-L-орнитин (IV) был получен с выходом 81% по модифицированному нами методу [9] и обычным способом превращен в N-оксисукцинимидный эфир N<sup>α</sup>-бензилоксикарбонил-N<sup>6</sup>-формил-L-орнитина (VI).

Декарбобензоксигирование защищенных декадепептидов (VII), (IX) и (XI) осуществляли гидрированием в метаноле в присутствии кислот, причем в случае соединения (IX) прибавления уксусной или винной кислоты было недостаточно для того, чтобы предотвратить расщепление образующегося при гидрогенолизе аминокэфира (X) на (пролил-фенилаланил)-дикетопиперазин и *tert*-бутиловый эфир α-оксизовалериановой кислоты; реакцию проводили в присутствии 1 эквивалента HCl. *n*-Нитрофениловый эфир защищенного декадепептида (XVII) был освобожден от N<sup>α</sup>-защитной группы действием бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте. Полученный активированный эфир (XVIII) циклизовали в абс. пиридине при 60–65° в течение 24 ч. N,N'-диформил-[HyIv<sup>1,6</sup>]-GS (XIX) очищали с помощью ионообменных смол с последующим хроматографированием на силикагеле. [HyIv<sup>1,6</sup>]-GS (II) получали деформилированием N,N'-диформилпроизводного (XIX) 50%-ной тиогликолевой кислотой при 37° [10].

[HyIv<sup>1,6</sup>, HyIc<sup>3,8</sup>]-GS (III) первоначально получали по схеме 2.

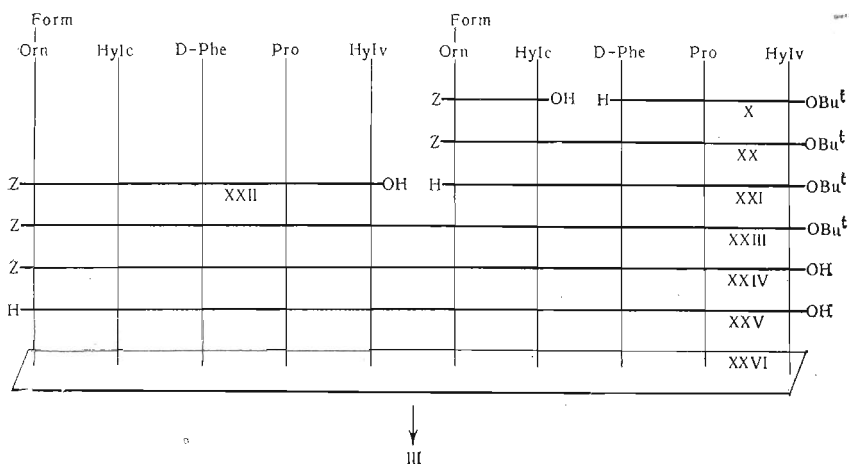
Схема 2



Необходимые для синтеза соответствующего линейного декадепептида (XXV) ациламинокислота (XXII) и аминокэфир (XXI) получали конденсацией трипептида (X) и N<sup>α</sup>-бензилоксикарбонил-N<sup>6</sup>-формил-L-орнитил-L-α-оксизовалериановой кислоты [11] хлорангидридным методом с последующим селективным отщеплением N- или C-концевой защитной группы гидрогенолизом с Pd-чернью или ацидолизом ТФУ. Хлорангидридным методом циклизации декадепептида (XXV) получили циклическое соединение (XXVI) с выходом, не превышавшим 13%.

Параллельно аналог (III) был получен по схеме 3, где для циклизации линейного декадепептида использован, как и при получении аналога (II), метод *n*-нитрофениловых эфиров. Выход хроматографически чистого соединения (XXVI) в этом случае достигал 24%. В ходе синтеза было найдено, что использование *n*-нитрофенилового эфира в качестве защитной группы на ранних этапах синтеза, а именно на стадии тридепептида (XXVII), упрощает очистку и повышает выход промежуточных

Схема 3



продуктов. Бензилоксикарбонильную группу активированных эфиров ацилдепептидов (XXVIII), (XXX) и (XXXII) удаляли действием HBr в ледяной уксусной кислоте. Для очистки диформильного производного (XXVI) и получения аналога (III) использовали те же методы, что и для очистки и деформилирования соединения (XIX). N,N'-диформил-грамицидин S, необходимый для проведения сравнительных физико-химических исследований, получен формилированием антибиотика *n*-нитрофенилформатом.

Результаты физико-химического исследования N,N'-диформил-[Hylv<sup>1,6</sup>]-GS (XIX) и N,N'-диформил-[Hylv<sup>1,6</sup>, Hylc<sup>3,8</sup>]-GS (XXVI) методами ИК-спектроскопии и КД, а также микробиологическое исследование аналогов (II) и (III) показали, что нарушение системы ВМВС приводит к изменению пространственной структуры антибиотика и падению его антимикробной активности [8].

### Экспериментальная часть

Все органические растворители, применявшиеся для синтеза, были предварительно очищены и высушены по стандартным методикам. Растворы веществ в органических растворителях высушивали MgSO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме при температуре не выше 40° (если нет других указаний).

Индивидуальность полученных веществ контролировали ТСХ на пластинках с силикагелем или Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, а также электрофорезом на бумаге FN 15 при 900В, pH 2,4 (1 M CH<sub>3</sub>COOH). Аминокислотный анализ пептидов и депептидов, гидролизованных в запаянных ампулах 6 н. HCl при 110° в течение 48 ч, выполнен на автоматическом анализаторе «Biocal» BC 201 (ФРГ). Молекулярный вес циклодепептидов определен термоэлектрическим методом на осометре фирмы «Hewlett-Packard», США. Элементный анализ синтезированных соединений удовлетворительно совпадал с вычисленным.

*N*<sup>o</sup>-Формил-*L*-орнитин (IV). 15 г монохлоргидрата *L*-орнитина растворяли в 60 мл 2 н. NaOH и при перемешивании вибромешалкой приливали раствор 11,5 г CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O в 60 мл воды и 100 мл метанола. К охлажденному до 0° раствору приливали 6 н. NaOH до pH 11, при энергичном перемешивании добавляли в течение 1 ч 30 мл свежеперегнанного этилформиата, поддерживая pH 11 добавлением 6 н. NaOH. Выдерживали 30 мин в тех же условиях и приливали в течение 1,5 ч еще 45 мл этилформиата; при этом начинал выпадать осадок медного комплекса *N*<sup>o</sup>-формил-*L*-орни-

тина. Смесь перемешивали еще 1 ч при комнатной температуре, поддерживая рН 11, органические растворители отгоняли, и водный раствор оставляли на ночь при 5°. Медный комплекс (16 г) отфильтровывали, промывали водой (4°, 2×30 мл), метанолом и эфиром, суспендировали в 200 мл воды и пропускали сероводород. CuS отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме до небольшого объема и прибавлением к водному раствору метанола осаждали N<sup>o</sup>-формил-L-орнитин. Выход 12,6 г (80,8%), т. пл. 228–229°,  $[\alpha]_D^{20} + 2,6^\circ$  (с 3,97, вода) (ср. [9]). Обнаруживаемую в некоторых опытах незначительную примесь орнитина (электрофореграмма при рН 2,4) удаляют на колонке с амберлитом IRC-50 (H<sup>+</sup>-форма).

*N*-Оксисукцинимидный эфир *N*<sup>o</sup>-бензилоксикарбонил-N<sup>o</sup>-формил-L-орнитина (VI) получали из N<sup>o</sup>-бензилоксикарбонил-N<sup>o</sup>-формил-L-орнитина [12] по методу [13] с выходом 74%. Т. пл. 125–127° (из изопропилового спирта),  $[\alpha]_D^{20} - 22,0^\circ$  (с 0,1, ТГФ).

*трет*-Бутиловый эфир бензилоксикарбонил-L-пролил-L- $\alpha$ -оксиизовалериановой кислоты (VII). К охлажденному до -5° раствору 27,4 г бензилоксикарбонил-L-пролина в 150 мл пиридина прибавляли при перемешивании 14 мл бензолсульфохлорида и перемешивали еще 15 мин при 0°, после чего приливали по каплям охлажденный раствор 17,4 г *трет*-бутилового эфира L- $\alpha$ -оксиизовалериановой кислоты [14] в 40 мл пиридина. Перемешивали 1 ч при 0° и 1 ч при комнатной температуре, выливали реакционную смесь в воду со льдом, перемешивали 1–2 ч и экстрагировали выпавшее масло этилацетатом. Этилацетатный раствор промывали 1 н. HCl, 5%-ным раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой, сушили и упаривали. Выход эфира (VII) 35,6 г (87,8%), т. пл. 49–50° (петролейный эфир),  $[\alpha]_D^{20} - 64,4^\circ$  (с 0,25, ТГФ).

*Тартрат трет*-бутилового эфира L-пролил-L- $\alpha$ -оксиизовалериановой кислоты (VIII). 15,2 г эфира (VII) гидрировали с Pd-чернью в 75 мл метанола, содержащего эквимолярное количество винной кислоты. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 10 мл метанола и тартрат аминокэфира (VIII) осаждали 10 мл абс. эфира. Выход 11,9 г (75%), т. пл. 125–126°,  $[\alpha]_D^{20} - 30,0^\circ$  (с 0,1, метанол).

*трет*-Бутиловый эфир бензилоксикарбонил-D-фенилаланил-L-пролил-L- $\alpha$ -оксиизовалериановой кислоты (IX). 7,86 г тартрата аминокэфира (VIII) встряхивали 5–7 мин в охлажденной до 5° смеси 100 мл 8%-ного раствора NaHCO<sub>3</sub> и 300 мл эфира. Эфирный слой отделяли, сушили 5 мин, упаривали при 20° и получали 4,11 г аминокэфира (VIII), который растворяли в 30 мл ДМФ и выдерживали сутки при комнатной температуре с 5,62 г N-оксисукцинимидного эфира бензилоксикарбонил-D-фенилаланина, полученного по методу [13]. К реакционной смеси приливали 150 мл этилацетата, этилацетатный раствор промывали 8%-ным NaHCO<sub>3</sub>, 5%-ным HCl, водой, сушили и упаривали. Остаток кристаллизовали из 15 мл спирта. Выход эфира тридецепептида (IX) 6,9 г (87%), т. пл. 102–103°,  $[\alpha]_D^{20} - 34,0^\circ$  (с 0,25, ТГФ).

*N*<sup>o</sup>-Бензилоксикарбонил-N<sup>o</sup>-формил-L-орнитил-L-лейцил-D-фенилаланил-L-пролил-L- $\alpha$ -оксиизовалериановая кислота (XIV). 5,52 г защищенного тридецепептида (IX) гидрировали с Pd-чернью при 28–30° в 50 мл метанола, содержащего 1 эквивалент HCl. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали и получали с количественным выходом хлоргидрат аминокэфира (X) в виде масла, которое растворяли вместе с 3,62 г N-оксисукцинимидного эфира N-бензилоксикарбонил-L-лейцина [13] в 45 мл ТГФ. К охлажденному до -10° раствору прибавляли при перемешивании 1,4 мл ТЭА и оставляли на сутки при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в этилацетате и промывали водой, 8%-ным NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 20%-ным NaCl. Растворитель отгоняли и получали защищенный тетрадецепептид (XI) с выходом 6,65 г (~100%) в виде стекловидной хроматографически однород-

ной массы. Вещество гидрировали с Pd-чернью при 28—30° в смеси 50 мл метанола и 0,6 мл ледяной  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, полученный аминоэфир (XII) (5,85 г) растворяли вместе с 3,91 г N-оксисукцинимидного эфира (VI) в 20 мл диоксана и оставляли на сутки при комнатной температуре. Раствор упаривали, остаток растворяли в этилацетате и промывали раствором водой, 0,5 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 8%-ным  $\text{NaHCO}_3$  и 20%-ным  $\text{NaCl}$ . Раствор упаривали и получали защищенный пентадеципептид (XIII) (7,8 г) в виде хроматографически однородного масла, которое растворяли в 50 мл ТФУ и оставляли на 1,5 ч при комнатной температуре. ТФУ отгоняли при 20°, остаток растворяли в этилацетате и упаривали, трижды прибавляя этилацетат, снова растворяли в этилацетате, раствор многократно промывали водой и исчерпывающе экстрагировали кислоту (XIV) 5%-ным  $\text{NaHCO}_3$ . Объединенные бикарбонатные экстракты (300 мл) промывали этилацетатом, добавляли 200 мл этилацетата, охлаждали смесь до 0° и при перемешивании подкисляли 2 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Органический слой отделяли, промывали водой, сушили и упаривали до объема 8—10 мл. К раствору приливали 200 мл абс. эфира и оставляли на облоду. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали абс. эфиром. Выход кислоты (XIV) 5,25 г [70%, считая на триденсипептид (IX)], т. пл. 129—130° (из этилацетата),  $[\alpha]_D^{20} = 43,6^\circ$  (с 0,25, бензол).

*n*-Нитрофениловый эфир *N*<sup>α</sup>-бензилоксикарбонил-*N*<sup>β</sup>-формил-*L*-орнитил-*L*-лейцил-*D*-фенилаланил-*L*-пролил-*L*-α-оксиэвалериановой кислоты (XV). К охлажденному до -20° раствору 1,5 г кислоты (XIV) и 0,33 г *n*-нитрофенола в 3,5 мл ТГФ прибавляли 0,45 г ДЦГК и оставляли при 0° на ночь. Осадок ДЦГМ отфильтровывали и фильтрат упаривали. Полученную сухую пенообразую массу растирали со смесью абс. эфира и петролейного эфира (1:1), периодически сменяя ее декантацией, до образования осадка, который кипятили несколько минут с эфиром и отфильтровывали. Выход эфира (XV) 1,56 г (90%). Т. пл. 99—103°. Для анализа вещество переосаждали из этилацетата петролейным эфиром. Т. пл. 107—108°,  $[\alpha]_D^{20} = 64,0^\circ$  (с 0,1, ТГФ).

*n*-Нитрофениловый эфир *N*<sup>α</sup>-бензилоксикарбонил-*N*<sup>β</sup>-формил-*L*-орнитил-*L*-лейцил-*D*-фенилаланил-*L*-пролил-*L*-α-оксиэвалерионил-*N*<sup>δ</sup>-формил-*L*-орнитил-*L*-лейцил-*D*-фенилаланил-*L*-пролил-*L*-α-оксиэвалериановой кислоты (XVII). 1,57 г *n*-нитрофенилового эфира (XV) растворяли при 30—40° в 1,5 мл ледяной  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , прибавляли при 20° 15 мл 35%-ного раствора  $\text{HBr}$  в ледяной уксусной кислоте и через 30 мин приливали 160 мл абс. эфира. Выпавшее масло растирали до образования осадка, который промывали эфиром, отфильтровывали и сушили в вакууме над  $\text{KOH}$ . Получали 1,73 г бромгидрата *n*-нитрофенилового эфира пентадеципептида (XVI). 1,41 г кислоты (XIV) растворяли в 14 мл  $\text{SOCl}_2$  и выдерживали 30 мин. Раствор упаривали при 20°, прибавляя несколько раз бензол. Остаток высушивали в вакууме (1 мм), полученный хлорангидрид (1,58 г) растворяли в 15 мл ТГФ, приливали при перемешивании в течение 5 мин к охлажденному до -25° раствору 1,69 г бромгидрата *n*-нитрофенилового эфира (XVI). К смеси прибавляли 1,05 мл ТЭА в 10 мл ТГФ, перемешивали 2 ч при -5—(-10°) и оставляли на ночь при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали при 20—25°, остаток растворяли в 50 мл этилацетата, раствор промывали 0,5 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 8%-ным  $\text{NaHCO}_3$  и 10%-ным  $\text{NaCl}$  и упаривали. Остаток растирали с 40 мл абс. эфира, нагревали в эфире до кипения и оставляли на ночь при 20°. Осадок отфильтровывали и получали 2,33 г (84,1%) защищенного декадеципептида (XVII), т. пл. 112—115°. Для анализа вещество переосаждали из этилацетата петролейным эфиром. Т. пл. 122—125°,  $[\alpha]_D^{20} = 54,8^\circ$  (с 0,25, ТГФ).

Цикло(*N*<sup>δ</sup>-формил-*L*-орнитил-*L*-лейцил-*D*-фенилаланил-*L*-пролил-*L*-α-оксиэвалерионил-*N*<sup>β</sup>-формил-*L*-орнитил-*L*-лейцил-*D*-фенилаланил-*L*-пролил-*L*-α-оксиэвалерионил) (XIX). 1,23 г защищенного декадеципептида

(XVII) декарбобензоксигировали аналогично соединению (XV). Выход бромгидрата *n*-нитрофенилового эфира (XVIII) 1,3 г. Найдено Br 12,5%.  $C_{68}H_{94}N_{11}O_{15} \cdot 2HBr$ . Вычислено Br 10,88%. К 230 мл сухого пиридина, содержащего 0,42 мл ТЭА, при температуре 60–65° прибавляли в течение 4 ч раствор 1,22 г бромгидрата *n*-нитрофенилового эфира декадеципептида (XVIII) в смеси 31 мл диоксана и 1 мл ДМФА, содержащей 3 капли ледяной  $CH_3COOH$ . Перемешивание продолжали при 60–65° еще 20 ч, после чего растворитель отгоняли и к остатку прибавляли 50 мл этилацетата и 25 мл воды. Органический слой отделяли, промывали водой, сушили и упаривали. Остаток промывали многократно смесью петролейного эфира с абс. эфиром (1 : 1) и растворяли в теплом этилацетате. Этилацетатный раствор промывали 8%-ным  $NaHCO_3$ , 20%-ным  $NaCl$ , сушили и упаривали. Маслообразный остаток (0,6 г) растворяли в 5 мл 80%-ного спирта и пропускали раствор через колонку (1,3×10 см) с дауэксом 1×2 ( $HCO_3^-$ -форма), используя для элюирования вещества 85 мл 80%-ного этанола. Элюат упаривали, остаток растворяли в 5 мл 80%-ного этанола и пропускали через колонку (1,3×10 см) с дауэксом 50×2 ( $H^+$ -форма), используя для элюирования 100 мл 80%-ного спирта. Элюат упаривали, остаток (0,4 г) хроматографировали на колонке (2,2×40 см) с силикагелем КСК (100–150 мени) с градиентной элюцией от этилацетата до смеси этилацетат – метанол 3 : 1. Получали 185 мг (18,8%) хроматографически чистого аморфного циклодекадеципептида (XIX). После перекристаллизации из 6 мл метанола отфильтровывали 110 мг кристаллического вещества с т. пл. 288–289°,  $[\alpha]_D^{20} -106,4^\circ$  (с 0,25, метанол). Найдено *M* 1192.  $C_{62}H_{90}N_{10}O_{14}$ . Вычислено *M* 1199. Аминокислотный анализ: Phe 1,00; Leu 1,02; Pro 1,18; Orn 1,06.

[*l*- $\alpha$ -Оксизовалериановая кислота, 6-*L*- $\alpha$ -оксизовалериановая кислота]-грамцидин *S* (II). 8 мг циклодекадеципептида (XIX) растворяли в 0,8 мл 50%-ной водной тиогликолевой кислоты и выдерживали 7 сут при 36–37°, контролируя полную деформированность электрофоретически. Раствор пропускали через колонку с 5 мл амберлита IRA-410 ( $CH_3COO^-$ -форма). Вещество элюировали 2%-ной  $CH_3COOH$  и после упаривания получали 23 мг (86%) циклодеципептида (II), который при pH 2,4 имеет такую же электрофоретическую подвижность, как и грамицидин *S* (I).

трет-Бутиловый эфир *N*<sup>α</sup>-бензилоксикарбонил-*N*<sup>β</sup>-формил-*L*-орнитил-*L*- $\alpha$ -оксизокапроноил-*D*-фенилаланил-*L*-пролил-*L*- $\alpha$ -оксизовалериановой кислоты (XX). 1,73 г *N*<sup>α</sup>-бензилоксикарбонил-*N*<sup>β</sup>-формил-*L*-орнитил-*L*- $\alpha$ -оксизокапроновой кислоты [11] растворяли в 20 мл тионилхлорида, выдерживали 30 мин при комнатной температуре, упаривали, прибавляя несколько раз абс. бензол, и остаток сушили в вакууме. Полученный хлорангидрид (1,78 г) растворяли в 10 мл ТГФ и приливали при перемешивании к охлажденному до –10° раствору 2,1 г хлоргидрата аминокислоты (X) [см. получение пентадеципептида (XIV)] в 15 мл ТГФ, одновременно прибавляя раствор 1,5 мл ТЭА в 5 мл ТГФ. Перемешивали реакционную смесь 1,5 ч при –10–(–5)° и оставляли на ночь при 20°. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в этилацетате, и раствор промывали охлажденной до 0° 1 н.  $HCl$ , 8%-ным  $NaHCO_3$ , водой, сушили и упаривали. Остаток растворяли в 5 мл эфира и осаждали петролейным эфиром депептид (XX). Выход 3,05 г (87%), т. пл. 58–60°,  $[\alpha]_D^{20} -63,0^\circ$  (с 1, этанол).

*N*<sup>α</sup>-Бензилоксикарбонил-*N*<sup>β</sup>-формил-*L*-орнитил-*L*- $\alpha$ -оксизокапроноил-*D*-фенилаланил-*L*-пролил-*L*- $\alpha$ -оксизовалериановая кислота (XXII). 4 г защищенного пептадеципептида (XX) растворяли в 24 мл ТФУ и оставляли на 1,5 ч при комнатной температуре. Растворитель отгоняли, остаток растворяли в этилацетате, раствор промывали водой до нейтральной реакции, экстрагировали 8%  $NaHCO_3$ , подкисляли 10%  $HCl$  и экстрагировали этилацетатом. Этилацетатный раствор промывали водой, сушили, упаривали, остаток растворяли в этилацетате и осаждали кисло-



ту (XXII) петролейным эфиром. Выход 2,81 г (77%), т. пл. 85—87°,  $[\alpha]_D^{20} -85,3^\circ$  (с 1, этанол). Найдено  $M$  760 (титрование 0,01 н. NaOH).  $C_{39}H_{52}N_4O_{11}$ . Вычислено  $M$  752.

*трет-Бутиловый эфир  $N^\alpha$ -бензилоксикарбонил- $N^\delta$ -формил-L-орнитил-L- $\alpha$ -оксизокапроноил-D-фенилаланил-L-пролил-L- $\alpha$ -оксизовалериоил- $N^\delta$ -формил-L-орнитил-L- $\alpha$ -оксизокапроноил-D-фенилаланил-L-пролил-L- $\alpha$ -оксизовалериановой кислоты (XXIII)*. 1 г защищенного пентадеписептида (XX) гидрировали в метаноле с Pd-чернью в присутствии 1,1 экв. HCl. Катализатор отфильтровывали, растворитель отгоняли и остаток сушили в вакууме. Получали 0,84 г (выход 95%) хлоргидрата трет-бутилового эфира пентадеписептида (XXI). К раствору хлоргидрата (XXI) в 10 мл абс. ТГФ при  $-10^\circ$  прибавляли попеременно растворы хлорангирида (получен из 0,8 г кислоты (XXII) действием тионилхлорида) в 5 мл ТГФ и 0,5 мл ТЭА в 5 мл ТГФ. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при  $-5 - (-10)^\circ$ , оставляли на ночь при  $20^\circ$ , фильтровали, растворитель отгоняли, остаток растворяли в этилацетате, и раствор промывали водой, охлажденной до  $0^\circ$  1 н. HCl, 8%-ным  $NaHCO_3$ , снова водой, сушили, упаривали и остаток пересаждали петролейным эфиром из этилацетата. Выход защищенного декадеписептида (XXIII) 1,31 г (87%), т. пл. 95—98°,  $[\alpha]_D^{20} -60,2^\circ$  (с 1, этанол).

*$N^\alpha$ -Бензилоксикарбонил- $N^\delta$ -формил-L-орнитил-L- $\alpha$ -оксизокапроноил-D-фенилаланил-L-пролил-L- $\alpha$ -оксизовалериоил- $N^\delta$ -формил-L-орнитил-L- $\alpha$ -оксизокапроноил-D-фенилаланил-L-пролил-L- $\alpha$ -оксизовалериановая кислота (XXIV)*. Раствор 1,2 г защищенного декадеписептида (XXIII) в 15 мл ТФУ выдерживали 4 ч, упаривали, добавляли абс. эфир, оставляли на 3 ч при  $0^\circ$  и отфильтровывали 1 г (86,5%) кислоты (XXIV). Т. пл. 101—103°,  $[\alpha]_D^{20} -58,1^\circ$  (с 1, этанол). Найдено  $M$  1330 (титрование 0,01 н. NaOH).  $C_{70}H_{98}N_8O_{19}$ . Вычислено  $M$  1352.

*Бензилоксикарбонил-D-фенилаланил-L-пролил-L- $\alpha$ -оксизовалериановая кислота (XXVII)*. 3 г эфира (IX) растворяли в 8 мл ТФУ, через 45 мин упаривали и остаток растворяли в этилацетате. Раствор промывали водой, экстрагировали кислоту 8%-ным  $NaHCO_3$ , подкисляли 10%-ной HCl и кислоту (XXVII) экстрагировали этилацетатом. Раствор промывали водой, сушили, упаривали, кислоту (XXVII) пересаждали петролейным эфиром из эфира и сушили в вакууме (1 мм) до образования аморфного порошка. Выход 2,4 г (89%),  $[\alpha]_D^{20} -34,1^\circ$  (с 1, этанол).

*Бромгидрат  $n$ -нитрофенилового эфира D-фенилаланил-L-пролил-L- $\alpha$ -оксизовалериановой кислоты (XXIX)*. К раствору 3,8 г кислоты (XXVII) в 10 мл этилацетата при  $0^\circ$  прибавляли раствор 1,07 г  $n$ -нитрофенола в 5 мл этилацетата и 1,58 г ДЦГК. Раствор оставляли на сутки при  $20^\circ$ , фильтровали, упаривали и остаток сушили в вакууме (1 мм). Полученное масло декарбобензоксигировали аналогично соединению (XV). Выход бромгидрата эфира (XXIX) 3,48 г (81%). Найдено Вг 14,31%.  $C_{25}H_{29}N_3O_7 \cdot HBr$ . Вычислено Вг 14,19%.

*$n$ -Нитрофениловый эфир  $N^\alpha$ -бензилоксикарбонил- $N^\delta$ -формил-L-орнитил-L- $\alpha$ -оксизокапроноил-D-фенилаланил-L-пролил-L- $\alpha$ -оксизовалериановой кислоты (XXX)*. К охлажденному до  $-10^\circ$  раствору 3 г бромгидрата эфира (XXIX) в 15 мл абс. ТГФ прибавляли 1,8 мл ТЭА в 5 мл абс. ТГФ и 2,3 г хлорангирида  $N^\alpha$ -бензилоксикарбонил- $N^\delta$ -формил-L-орнитил-L- $\alpha$ -оксизокапроновой кислоты [11] в 10 мл абс. ТГФ. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при  $-5 - (-10)^\circ$ , оставляли на ночь при  $20^\circ$ , фильтровали, упаривали и остаток растворяли в этилацетате. Раствор промывали охлажденной до  $0-5^\circ$  1 н. HCl, 8%-ным  $NaHCO_3$ , водой, сушили и упаривали. Остаток растворяли в этилацетате и защищенный пентадеписептид (XXX) осаждали петролейным эфиром. Выход 4,15 г (97%), т. пл. 65—67°,  $[\alpha]_D^{20} -65,4^\circ$  (с 1, этанол).

*$n$ -Нитрофениловый эфир  $N^\alpha$ -бензилоксикарбонил- $N^\delta$ -формил-L-орнитил-L- $\alpha$ -оксизокапроноил-D-фенилаланил-L-пролил-L- $\alpha$ -оксизовалерио-*



*ил-N<sup>б</sup>-формил-L-орнитил-L-α-оксизокапроноил-D-фенилаланил-L-пролил-L-α-оксизовалериановой кислоты* (XXXII). Раствор 0,9 г кислоты (XXII) в 15 мл SOCl<sub>2</sub> выдерживали 30 мин при 20°, упаривали и сушили в вакууме. Получали 0,9 г (97%) хлорангидрида кислоты. Найдено Cl 4,82%. C<sub>39</sub>H<sub>51</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>10</sub>. Вычислено Cl 4,61%. 1,07 г *n*-нитрофенилового эфира (XXX) декарбобензоксигировали аналогично соединению (XV) и получали 1,0 г (~100%) бромгидрата *n*-нитрофенилового эфира (XXXI). Найдено Br 13,65%. C<sub>37</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub> · 1,5 HBr. Вычислено Br 13,9%. К охлажденному до -10° раствору 1 г бромгидрата (XXXI) в 10 мл абс. ТГФ прибавляли раствор 0,9 г хлорангидрида кислоты (XXII) в 8 мл ТГФ и 0,5 мл ТЭА в 5 мл ТГФ. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при -5—(-10)°, оставляли на ночь при 20°, фильтровали и концентрировали. Остаток растворяли в этилацетате, промывали охлажденной 1 п. HCl, 8%-ным NaHCO<sub>3</sub>, водой, сушили и упаривали. Защищенный декадепептид (XXXII) кристаллизировали из смеси этилацетат-петролейный эфир. Выход 1,5 г (85%), т. пл. 105—108°, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -64,2° (с 1, этанол).

*Цикло(N<sup>б</sup>-формил-L-орнитил-L-α-оксизокапроноил-D-фенилаланил-L-пролил-L-α-оксизовалериол-N<sup>б</sup>-формил-L-орнитил-L-α-оксизокапроноил-D-фенилаланил-L-пролил-L-α-оксизовалериол)* (XXVI). а) 1 г кислоты (XXIV) декарбобензоксигировали аналогично соединению (XV) и получали 0,97 г (98%) бромгидрата декадепептида (XXV). Найдено Br 9,30%. C<sub>62</sub>H<sub>90</sub>N<sub>8</sub>O<sub>17</sub> · 1,5 HBr. Вычислено Br 8,96%. 0,95 г бромгидрата декадепептида (XXV) растворяли в 15 мл тионилхлорида, через 30 мин упаривали и сушили в вакууме (1 мм). Раствор полученного хлоргидрата хлорангидрида кислоты (XXV) в 250 мл абс. бензола и раствор 1 мл ТЭА в 250 мл абс. бензола прибавляли одновременно при перемешивании к 1250 мл абс. бензола в течение 4 ч. Реакционную смесь оставляли на ночь, упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали водой, 1 п. HCl, снова водой, сушили и упаривали. К остатку добавляли абс. эфир, выдерживали 5—6 ч при 0—5°. Осадок отфильтровывали (0,56 г) и очищали сначала на ионообменных колонках с дауэксом 1×2 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма) и дауэксом 50×2 (H<sup>+</sup>-форма), затем нейтральный продукт (0,37 г) хроматографировали на силикагеле в этилацетате. Элюат упаривали, остаток переосадили из этилацетата петролейным эфиром и получали 110 мг (12,9%) циклодекадепептида (XXVI) с т. пл. 91—94°, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -71,3° (с 1, этанол). б) 1,5 г *n*-нитрофенилового эфира защищенного декадепептида (XXXII) декарбобензоксигировали аналогично соединению (XV) и получали 1,3 г (90%) бромгидрата *n*-нитрофенилового эфира декадепептида (XXXIII). Найдено Br 10,45%. C<sub>68</sub>H<sub>93</sub>N<sub>8</sub>O<sub>19</sub> · 2HBr. Вычислено Br 10,67%. Раствор 1,3 г бромгидрата соединения (XXXIII) в 15 мл ДМФА, содержащий 0,2 мл ледяной CH<sub>3</sub>COOH, прибавляли в течение 5 ч при 55—60° к 200 мл пиридина, содержащего 0,36 мл ТЭА. Перемешивали еще 5 ч при той же температуре и оставляли на ночь при 20°. Раствор упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали 1 п. HCl, водой, сушили и упаривали. К остатку приливали абс. эфир, выдерживали 4—6 ч на холоду и отфильтровывали 0,75 г вещества. После очистки (опыт а) получали 300 мг (24,6%) циклодекадепептида (XXVI), т. пл. 92—94°, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -71,0° (с 1, этанол). Найдено M 1205. C<sub>62</sub>H<sub>88</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub>. Вычислено M 1201. Амминокислотный анализ: Phe 1,00; Pro 0,86; Orn 0,90.

[1-L-α-оксизовалериановая кислота, 3-L-α-оксизокапроновая кислота, 6-L-α-оксизовалериановая кислота, 8-L-α-оксизокапроновая кислота]-грамицидин S (III). 16 мг циклодекадепептида (XXVI) деформировали в течение 5 сут аналогично соединению (XIX) и получали 13,5 мг (88,6%) циклодекадепептида (III). Вещество индивидуально по данным электрофореза и ТСХ. По электрофоретической подвижности не отличается от грамицидина S.

*N,N'*-Диформилграмицидин S. К раствору 136 мг дихлоргидрата природного грамицидина S в 5 мл абс. пиридина прибавляли 168 мг *n*-нитро-

фенилформиата. Реакционную смесь оставляли на ночь при 20°, прибавляли еще 84 мг *n*-нитрофенилформиата и через 12–15 ч упаривали при 30°. Остаток растворяли в 15 мл этилацетата, промывали 1 в. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5%-ным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и водой, сушили 5 мин Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. N,N'-диформилграмидин S кристаллизовали сначала из этилацетата, а затем из смеси этанол–вода (1:1). Т. пл. 310–316°,  $[\alpha]_D^{20}$  –294,4° (с 1, этанол).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ivanov V. T., Laine I. A., Abdullaev N. D., Senyavina L. B., Popov E. M., Ovchinnikov Yu. A., Schemyakin M. M. (1969) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **34**, 803–811.
2. Schwyzer R., Ludescher U. (1969) *Helv. chim. acta*, **52**, 2033–2040.
3. 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.
4. Semyakin M. M., Shchukina L. A., Vinogradova E. I., Ravdel G. A., Ovchinnikov Yu. A. (1966) *Experientia*, **22**, 535–536.
5. Ravdel G. A., Filatova M. P., Shchukina L. A., Paskhina T. S., Surovikina M. S., Trapeznikova S. S., Egorova T. P. (1967) *J. Med. Chem.*, **10**, 242–246.
6. De Santis P., Liquory A. M. (1971) *Biopolymers*, **10**, 699–710.
7. Ludescher U., Schwyzer R. (1971) *Helv. chim. acta*, **54**, 1637–1644.
8. Жузе А. Л., Коган Г. А., Крит Н. А., Андропова Т. М., Филатова М. П., Сенявина Л. Б., Мещерякова Е. А., Рябова И. Д., Равдель Г. А., Шукина Л. А. (1974) *Молекулярн. биология*, **8**, 84–90.
9. Okawa K., Hase S. (1963) *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **36**, 754.
10. Hoffmann K., Visser J. P., Finn F. M. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 2900–2909.
11. Крит Н. А., Филатова М. П., Равдель Г. А. (1972) *Химия природы соединений*, 508–510.
12. Jajima H., Kubo K., Kinomura J. (1967) *Chem. and Pharmac. Bull.*, **15**, 504.
13. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 1839–1842.
14. Овчинников Ю. А., Кирюшкин А. А., Шемякин М. М. (1966) *Ж. общ. химии*, **36**, 620–627.

Поступила в редакцию  
3.IX.1974

#### SYNTHESIS OF THE GRAMICIDIN S DEPSIPEPTIDE ANALOGS

KRIT N. A., ZHUZE A. L., ANDRONOVA T. M., FILATOVA M. P.,  
RAVDEL G. A., SHCHUKINA L. A.

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

To elucidate the contribution of the intramolecular hydrogen bonds to the conformational stability of the gramicidin S (GS) and the effect of their elimination on the biological activity of the antibiotic, the depsipeptide analogs [HyIv<sup>1,6</sup>]-GS and [HyIv<sup>1,6</sup>, Hylc<sup>3,8</sup>]-GS have been synthesized. The protected pentadepsipeptides were obtained by stepwise chain elongation. Selective deblocking and successive coupling by acyl chloride method afforded the linear decadepsipeptides, which were converted to the respective cyclopeptides via acyl chlorides or *p*-nitrophenyl esters.