



УДК 577.182.26'17:547.964.4.057

СИНТЕЗ ДИМЕРНЫХ АНАЛОГОВ ГРАМИЦИДИНА А

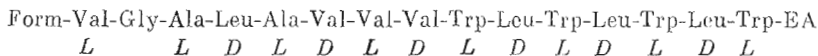
*Фомина Л. А., Дежина А. М., Сычев С. В., Иванов В. Т.,
Хлавачек Я.**

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

**Институт органической химии и биохимии Академии наук ЧССР, Прага*

Осуществлен синтез 13 димерных аналогов грамицидина А, в которых взаимное расположение N- и C-концевых групп молекул антибиотика было фиксировано по принципу «голова к голове», «голова к хвосту» и «хвост к хвосту» за счет создания ковалентных мостиков с различной длиной метиленовой цепи.

Одним из наиболее популярных объектов для изучения трансмембранного ионного транспорта является антибиотик грамицидин А, образующий в биологических и модельных мембранах ионные каналы, проводящие ионы щелочных металлов и протоны. Грамицидин А представляет собой линейный 15-членный пептид с чередованием аминокислотных остатков L- и D-конфигурации и блокированными концевыми группами — формил (Form) на N-конце и этаноламин (EA) на C-конце молекулы:



Проблема пространственного строения грамицидина А в растворе и мембране уже в течение ряда лет привлекает внимание исследователей. Известно, что в растворе грамицидин А образует четыре димерные формы, находящиеся в равновесии друг с другом и с мономерной формой. В неполярных средах равновесие устанавливается чрезвычайно медленно, что позволило выделить указанные димерные формы в индивидуальном состоянии и получить их спектральные характеристики [1].

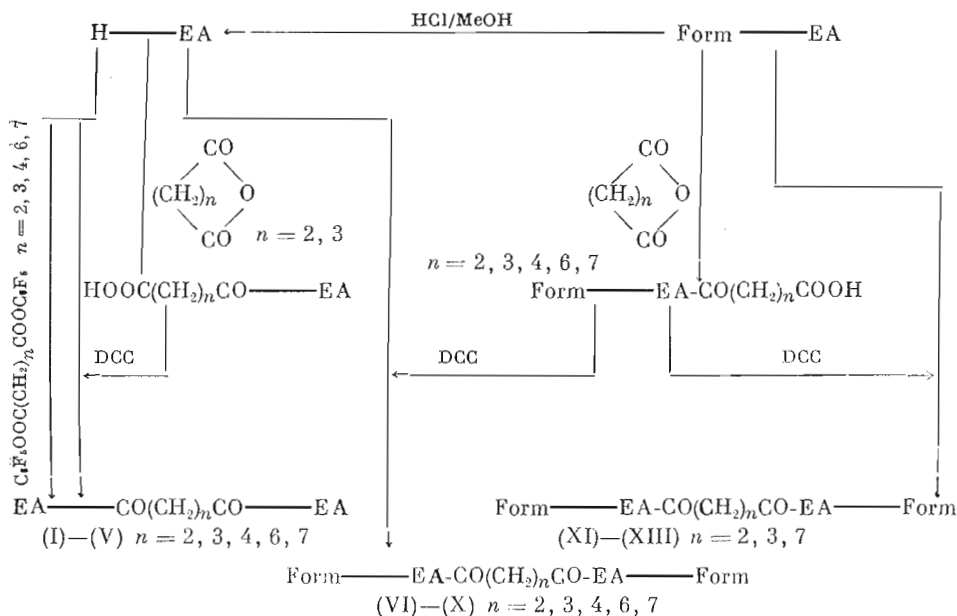
В независимых работах Урри и сотр. [2, 3] и Рамачандран и Чандра-секаран [4, 5] предложили для грамицидина А спиральную структуру, отличающуюся от ранее описанных спиралей и названную π_{LD} -спиралью. Две молекулы антибиотика, ассоциируя за счет межмолекулярных водородных связей по типу «голова к голове», образуют так называемую $\pi_{LD}\pi_{LD}$ -спираль. Урри и сотр. [2, 3] рассмотрели несколько таких спиралей, отличающихся числом остатков на виток; из них $\pi_{LD}^{6,3}\pi_{LD}^{6,3}$ -спираль (шесть межмолекулярных H-связей, 6,3 остатка на виток) имела длину $\sim 30 \text{ \AA}$, что приблизительно отвечало толщине углеводной части липидного бислоя.

Витч и сотр. [6] предложили альтернативную модель, согласно которой пептидные цепи антибиотика образуют двойную спираль, стабилизированную 28–30 межмолекулярными водородными связями. Ориентация цепей при этом может быть параллельной ($\uparrow\uparrow\pi$) или антипараллельной ($\uparrow\downarrow\pi$), а диаметр осевой полости и длина димера здесь приблизительно те же, что и для $\pi_{LD}\pi_{LD}$ -спиралей. Однако ни для одного из описанных типов спиралей в указанных работах не было приведено скольких-нибудь убедительных физико-химических доказательств.

Для того чтобы получить такие доказательства, грамицидин А и большая серия его укороченных аналогов, описанных в работе [7], была

Принятые сокращения: DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид, Form — формил, EA — этаноламин, GgA — грамицидин А.

Синтез димерных аналогов грамицидина А



исследована методами КД, флуоресценции и ИК-спектроскопии [8]. Основываясь главным образом на сопоставлении расчетных и экспериментальных данных ИК-спектров, авторы пришли к выводу, что ни одна из димерных форм грамицидина А не является конформационно чистой, а все они представляют собой равновесную смесь $\uparrow\downarrow\pi\pi_{LD}$ -спиралей, которые являются доминирующими, и $\pi_{LD}\pi_{LD}$ -димеров. Структура одной из форм была подтверждена данными двумерной ЯМР-спектроскопии [9, 10].

Исключительная сложность конформационного равновесия грамицидина А затрудняла его дальнейшее физико-химическое исследование и анализ связи между пространственной структурой и мембранными свойствами. Для того чтобы облегчить преодоление указанных трудностей, мы предприняли синтез и исследование серии новых аналогов грамицидина, в которых взаимное расположение концевых групп молекулы было фиксировано по принципу «голова к голове», «голова к хвосту» и «хвост к хвосту» путем введения ковалентных мостиков различной длины (схема, табл. 1). Предполагалось, что фиксация взаимного расположения концов молекул грамицидина А в димере должна упростить конформационное равновесие антибиотика за счет исключения ряда форм.

К настоящему времени в литературе описан синтез одного димерного аналога грамицидина — малонилбисграмицидина, осуществленный с использованием симметричных бифункциональных реагентов — надокиси $\text{O}=\text{C}=\text{C}=\text{C}=\text{O}$ [11] и ди-*n*-нитрофенилового эфира малоновой кислоты [12].

При синтезе димеров типа «голова к голове» (соед. (I)–(V)) нами было исследовано взаимодействие дезформилграмицидина А с различными активированными производными дикарбоновых кислот. Попытки использовать хлорангидриды соответствующих кислот оказались безуспешными.

Трудность получения и выделения хлорангидридов в чистом виде и образование большого числа побочных продуктов в ходе конденсации с дезформилграмицидином А вынудили нас отказаться от этого метода. Не привело к успеху и использование *N*-оксисукцинимидных эфиров дикарбоновых кислот, так как они обладали недостаточной реакционной способностью. Кроме того, при получении этих эфиров с помощью *N,N'*-дициклогексилкарбодимида образовывалось большое количество побочных продуктов, особенно в случае янтарной и глутаровой кислот.

Лучшие результаты были получены при конденсации дезформилграмицидина А с пилентафторфениловыми эфирами дикарбоновых

Выход и хроматографическая подвижность димерных аналогов грамицидина А

Соединение	Тип связи	n	Выход, %	R _f в системе	
				Б	В
(I)	«Голова к голове» *	2	20	0,39	
(II)		3	45	0,56	
(III)		4	50	0,69	
(IV)		6	60	0,75	
(V)		7	60	0,78	
(VI)	«Голова к хвосту»	2	58		0,32
(VII)		3	60		0,34
(VIII)		4	55		0,36
(IX)		6	50		0,47
(X)	«Хвост к хвосту»	7	40		0,50
(XI)		2	30		0,51
(XII)		3	50		0,49
(XIII)		7	50		0,44

* Все производные синтезированы с помощью пентафторфениловых эфиров дикарбоновых кислот.

кислот, обладающими высокой реакционной способностью. Эти соединения образуются с высокими выходами при взаимодействии дикарбоновых кислот с пентафторфенолом, легко очищаются перекристаллизацией и устойчивы при хранении. Исключение составляют лишь дипентафторфениловые эфиры янтарной и глутаровой кислот, получение которых с помощью дициклогексилкарбодимидов протекает с низким выходом вследствие образования большого количества побочных продуктов.

Соединения (I) и (II) получали в две стадии. На первой стадии синтеза аминогруппу дезформилграмицидина ацилировали ангидридом соответствующей кислоты с образованием N-ацилдезформилграмицидина А; аналогичная методика использована в работе [13]. Вторая стадия включала в себя присоединение другой молекулы дезформилграмицидина карбодимидным методом.

Аналоги серии «голова к хвосту» и «хвост к хвосту» также получали двустадийным синтезом. Гидроксил этаноламидной группы грамицидина обладает относительно низкой реакционной способностью и для его ацилирования требуется довольно энергичное воздействие. Эта проблема была успешно решена путем использования ангидридов дикарбоновых кислот, которые ацилируют этаноламидный гидроксил с хорошим выходом. Вторую молекулу грамицидина А или дезформилграмицидина А присоединяли карбодимидным методом; в случае аналогов «хвост к хвосту» требовались значительные избытки конденсирующего агента и длительное (72 ч) время проведения реакции.

Все полученные аналоги отделяли от ионогенных примесей ионообменной хроматографией и далее очищали препаративной хроматографией в тонком слое силикагеля. Они представляют собой бесцветные аморфные соединения, хорошо растворимые в полярных (метанол, диметилформамид) и плохо в неполярных (гексан, бензол) растворителях. Контроль за ходом реакций и чистотой полученных соединений осуществляли с помощью ТСХ на силикагеле. В сериях «голова к голове» и «голова к хвосту» с увеличением числа метиленовых групп подвижность соединений увеличивалась, в серии «хвост к хвосту» — уменьшалась. Индивидуальность димерных аналогов подтверждали высокоэффективной хроматографией на колонке с обращенной фазой. В качестве примера на рис. 1 приведены профили элюции соединений (I), (VII) и (XII); наличие множественных пиков, по-видимому, вызвано присутствием в исходном [Val]грамицидине А примеси [He]грамицидина А.

Анализ ИК-спектров полученных соединений показал, что по мере удлинения метиленовой цепочки во всех трех группах наблюдается увеличение интенсивности полос валентных колебаний групп C=O (рис. 2).

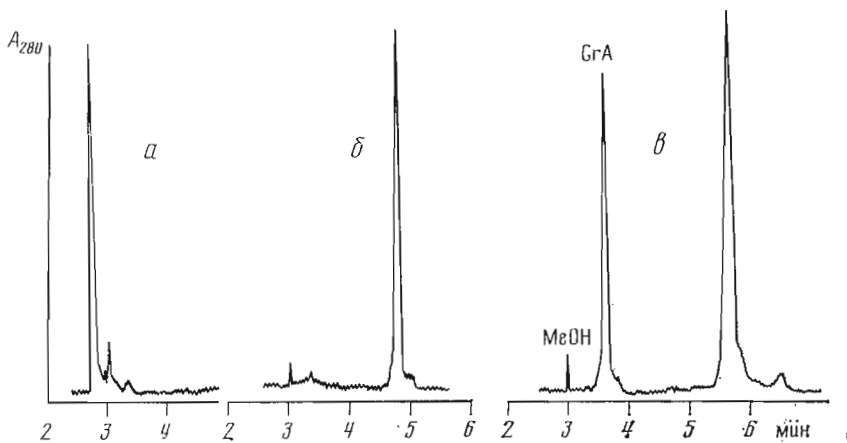


Рис. 1. Хроматография соединений (II) (а), (VII) (б) и (XII) в смеси с грамицидином А (с) в системе 5 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — метанол (1:9), рН 6,1, на колонке Sepharon STL-18

Некоторое увеличение интенсивности полосы валентных колебаний CH_3 -групп, вероятно, связано с ее перекрыванием с полосами CH_2 -групп. Исследование димерных аналогов на бислойных липидных мембранах показало, что аналоги всех трех групп образуют в мембранах ионные каналы, среднее время жизни которых в 30–60 раз превышает время жизни грамицидинового канала [14].

Экспериментальная часть

Грамицидин А получали делением природной смеси грамицидинов (фирмы Sigma) методом противоточного распределения в системе хлороформ — метанол — бензол — вода, 1,5:2,3:1,5:0,7, как описано в работе [15]. Все использованные реактивы были марки ч.д.а., растворители очищали по стандартным методикам.

Деформилграмицидин А получали обработкой грамицидина А раствором хлористого водорода в метаноле согласно работе [16] и выделяли ионообменной хроматографией на даэуксе 50×2 в градиенте раствора NH_4OH (0–2 н.) в 90% водном метаноле.

Контроль за ходом реакций и индивидуальностью полученных соединений осуществляли ТСХ на пластинках с силикагелем (TLC-Platten F_{254} , Merck) в системах бензол — гексан, 1:1 (А), хлороформ — метанол — вода, 6,5:2,0:0,2 (Б) и хлороформ — метанол — вода — уксусная кислота, 6,5:0,8:0,1:0,1 (В). Препаративное деление проводили на пластинках 20×20 см с силикагелем (PLC-Platten F_{254} , Merck) в системе хлороформ — метанол — вода, 6,5:2,5:0,4. Вещества обнаруживали в УФ-свете.

Для высокоэффективной жидкостной хроматографии использовали колонки C_{18} Sepharon STL-18 ($25 \times 0,4$ см). Буфер — 5 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10%) — метанол (90%), рН 6,1; образцы растворяли в метаноле.

Температуры плавления определяли на приборе Voetius (ГДР). ИК-спектры регистрировали на приборе Perkin — Elmer 180 (США). Пленки получали испарением растворов димерных аналогов в диоксане. Спектры нормированы на одну интегральную интенсивность полосы Амид А (3280 см^{-1}).

Растворы веществ упаривали в вакууме при остаточном давлении 10 мм рт. ст. и температуре не выше 40°C .

Дипентафторфениловые эфиры дикарбоновых кислот. К раствору 1 ммоль соответствующей дикарбоновой кислоты в смеси 2,0 мл диоксана и 0,5 мл хлороформа при 5°C добавляли 390 мг (2 ммоль) пентафторфенола и раствор 412 мг (2 ммоль) дициклогексилкарбодимида в 2,0 мл диоксана. Перемешивали 4 ч при 18°C , выпавшую дициклогексилмочевину отфильтровывали и растворитель упаривали в вакууме. Полученный

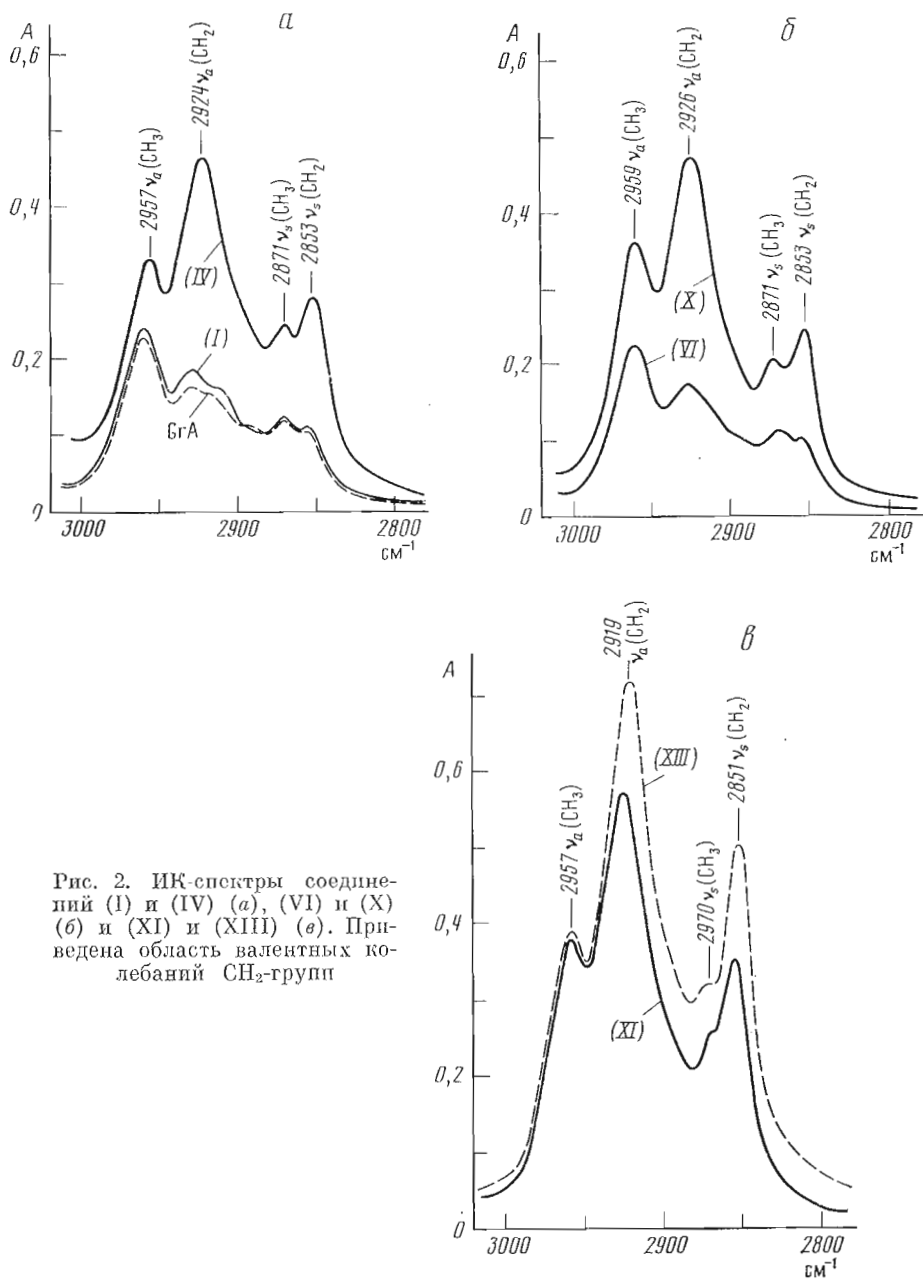


Рис. 2. ИК-спектры соединений (I) и (IV) (а), (VI) и (X) (б) и (XI) и (XIII) (в). Приведена область валентных колебаний CH_2 -групп

эфир перекристаллизовывали из гексана. Выходы и константы полученных дипентафторфениловых эфиров приведены в табл. 2.

Аналоги типа «голова к голове» (I) — (V). К раствору 46 мг (0,025 ммоль) дезформилграмицидина А в 0,3 мл диоксана при перемешивании (10°C) постепенно добавляли 0,01 ммоль дипентафторфенилового эфира соответствующей дикарбоновой кислоты в 0,2 мл диоксана. Раствор перемешивали 24 ч при 18°C и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 90% водном метаноле и пропускали через колонку с дауэксом 50×2 (5×1 см). Фракцию, содержащую пептид, отбирали и упаривали. Остаток растворяли в 0,2 мл метанола и наносили на препаративную пластинку. Зону, содержащую димерный аналог, снимали с пластинки и экстрагировали метанолом. Упаривали до небольшого объема, осаждали этилацетатом и высушивали в вакууме. Выход бисграмицидинов (I) — (V) составлял 20–60% (табл. 1).

N-Сукцинил- и *N*-глутарилдезформилграмицидин А. К раствору 37 мг

Выходы и характеристики дипентафторфениловых эфиров дикарбоновых кислот $(\text{COOH})_2(\text{CH}_2)_n$

n	Выход, %	Т. пл., °С	R_f (А)
2	45	133–134,5	0,50
3	50	62–64	0,50
4	70	96–96,5	0,52
6	80	76–77	0,59
7	88	26–26,5	0,61

(0,02 ммоль) дезформилграмидина А в 3 мл пиридина добавляли 1,0 ммоль янтарного или глутарового ангидрида и перемешивали 48 ч при 18° С. К раствору добавляли 10 мл воды, выпавший осадок отфильтровывали, промывали дистиллированной водой и сушили в вакууме. Полученный N,O-диацилдезформилграмидин растворяли в 2 мл метанола, к раствору добавляли 2 мл 1 н. NaOH и оставляли на 18 ч при 5° С. Затем раствор подкисляли до pH 5,0 1 н. HCl, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили в вакууме. Выход N-ацилдезформилграмидина А 70–75%, R_f (В) 0,61 (сукцинил), 0,57 (глутарил).

N,N'-Сукцинил- и *N,N'*-глутарилбисдезформилграмидин (I, II). К раствору 19,5 мг (0,01 ммоль) N-сукцинилдезформилграмидина А в 0,2 мл диметилформамида при 0° С добавляли 1,0 мг (0,01 ммоль) 1-оксибензтриазола и 2,0 мг (0,01 ммоль) дициклогексилкарбодиимида. Перемешивали 10 мин и добавляли 19,4 мг (0,01 ммоль) дезформилграмидина А в 0,2 мл диметилформамида. Перемешивали 48 ч при 18° С, затем к раствору добавляли 5 мл воды, выпавший осадок отфильтровывали и сушили в вакууме. Остаток растворяли в 0,2 мл метанола и наносили на препаративную пластинку. Зону, содержащую пептид, снимали с пластинки и экстрагировали метанолом. Упаривали, осаждали этилацетатом и высушивали в вакууме. Получали соединение (I) с выходом 65%. Аналогичным образом получали соединение (II) с выходом 70%.

O-Грамицидиловые эфиры дикарбоновых кислот. К раствору 18,8 мг (0,01 ммоль) грамицидина А в 0,5 мл абс. пиридина добавляли 0,1 ммоль ангидрида соответствующей дикарбоновой кислоты (ангидриды дикарбоновых кислот с n 3, 4, 6 и 7 получали непосредственно перед реакцией обработкой дикарбоновых кислот дициклогексилкарбодиимидом; ангидриды субериновой ($n=6$) и азелаиновой ($n=7$) кислот вводили в реакцию с грамицидином, не выделяя их из реакционной смеси). Перемешивали 48 ч при 18° С, затем к раствору добавляли 5% раствор NaHCO₃ до pH 7,0–7,5 и оставляли на 6 ч при 5° С. Полученную Na-соль монограмидилового эфира соответствующей дикарбоновой кислоты отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Затем растворяли в минимальном количестве метанола, осаждали 1 н. раствором HCl, промывали водой и высушивали. Выход 85–90%, R_f (В) 0,48 (n 2), 0,58 (n 3), 0,60 (n 4); R_f (В) 0,29 (n 6), 0,32 (n 7).

Аналоги типа «голова к хвосту» (VI)–(X). К раствору 19,5 мг (0,01 ммоль) соответствующего монограмидилового эфира в 0,3 мл диметилформамида добавляли 3 мг (0,03 ммоль) 1-оксибензтриазола и при 0° С 6,2 мг (0,03 ммоль) дициклогексилкарбодиимида. Перемешивали 20 мин при 18° С и добавляли 18,5 мг (0,01 ммоль) дезформилграмидина А в 0,2 мл диметилформамида. Перемешивали 48 ч при 18° С, отфильтровывали. К фильтрату добавляли 5 мл H₂O, выпавший осадок отфильтровывали, высушивали, растворяли в 0,2 мл метанола и наносили на препаративную пластинку. После выделения получили соединения (VI)–(X) с выходом 60–70% (табл. 1).

Аналоги типа «хвост к хвосту» (XI)–(XIII). К раствору 19,5 мг соответствующего монограмидилового эфира добавляли раствор 18,8 мг (0,01 ммоль) грамицидина А и 13 мг (0,05 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 0,1 мл диметилформамида. Перемешивали 72 ч при 18° С,

отфильтровывали. К фильтрату добавляли 5 мл воды, выпавший осадок отфильтровывали и высушивали. Остаток растворяли в 0,2 мл метанола и наносили на препаративную пластинку. После выделения получили соответствующие димерные аналоги с выходом 30–50% (табл. 1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Veatch W. R., Blout E. R. *Biochemistry*, 1974, v. 13, p. 5257–5264.
2. Urry D. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, v. 68, p. 672–676.
3. Urry D. W., Goodall M. C., Glickson J. D., Mayers D. F. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, v. 68, p. 1907–1911.
4. Ramachandran G. N., Chandrasekaran R. In: *Progress in Peptide Research*/Ed. Lande S. N. Y.: Gordon and Breach, 1972, p. 195.
5. Ramachandran G. N., Chandrasekaran R. *Ind. J. Biochem. Biophys.*, 1972, v. 9, p. 1–11.
6. Veatch W. R., Fossel E. T., Blout E. R. *Biochemistry*, 1974, v. 13, p. 5249–5256.
7. Шепель Е. Н., Иорданов С., Рябова И. Д., Мирошников А. И., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. *Биоорган. химия*, 1976, т. 2, с. 581–593.
8. Сычев С. В., Певская Н. А., Иорданов С., Шепель Е. Н., Мирошников А. И., Иванов В. Т. *Биоорган. химия*, 1977, т. 9, с. 121–151.
9. Арсеньев А. С., Барсуков И. Л., Сычев С. В., Быстров В. Ф., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. *Биол. мембраны*, 1984, т. 1, № 1, с. 5–17.
10. Arseniev A. S., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. *FEBS Lett.*, 1984, v. 165, № 1, p. 51–56.
11. Bamberg E., Janko K. *Biochem. et biophys. acta*, 1977, v. 465, p. 486–499.
12. Urry D. W., Venkatachalam C. M., Spisni A., Bradley R. J., Trapani T. L., Prasad K. U. J. *Membrane Biol.*, 1980, v. 55, p. 29–51.
13. Apell H.-J., Bamberg E., Alpes H. J. *Membrane Biol.*, 1979, v. 50, p. 271–285.
14. Ирхин А. И., Безруков С. М., Мельник Е. И. *Биол. мембраны*, 1984, т. 1, № 7.
15. Sarges R., Witkop B. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1965, v. 87, p. 2011–2020.
16. Gross E., Witkop B. *Biochemistry*, 1965, v. 4, p. 2459–2501.

Поступила в редакцию
7.V.1984

SYNTHESIS OF GRAMICIDIN A DIMERIC ANALOGUES

FONINA L. A., DEMINA A. M., SYCHEV S. V., IVANOV V. T.,
HLAVACEK Ya.*

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry,
Czechoslovak Academy of Sciences, Prague*

Thirteen gramicidin A new analogues have been synthesized having the head-to-head, head-to-tail or tail-to-tail disposition of the terminal groups fixed by covalent methylene bridges of varying chain-length.