



УДК 547.963.07

О СТРУКТУРЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ГЛИКОПЕПТИДА
ИЗ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *LACTOBACILLUS BULGARICUS**Андропова Т. М., Ростовцева Л. И., Добрушкина Е. П.,
Гаврилов Ю. Д., Дешко Т. Н., Иванов В. Т.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

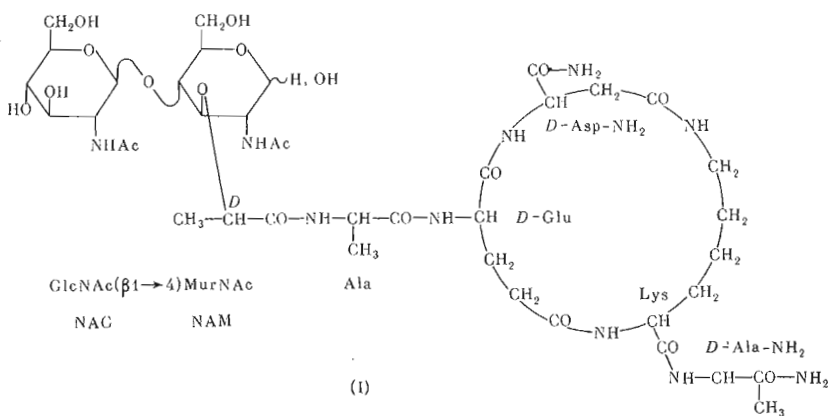
Осуществлен синтез дисахарид-пептапептида со структурой, предложенной ранее для противоопухолевого гликопептида, выделенного из продуктов частичного гидролиза клеточных стенок *Lactobacillus bulgaricus*. Полученный продукт оказался неидентичным по физико-химическим свойствам природному образцу, откуда вытекает, что структура последнего нуждается в дальнейшем исследовании.

К концу 50-х годов из клеточных стенок *Lactobacillus bulgaricus* болгарскими исследователями [1—4] был выделен препарат, обладающий противоопухолевой активностью, в частности вызывающий избирательный некроз опухолевой ткани у мышей с саркомой 180. Дальнейшие исследования показали, что специфическое противоопухолевое действие обусловлено присутствием в необработанном продукте нейтральной гликопептидной фракции, состоящей из смеси полимергомологов молекулярного веса 1000, 2000 и ~10 000 [5].

В результате изучения структуры гликопептида с молекулярным весом 1000 была предложена формула (I), содержащая 16-членный трипептидный цикл и амидированную карбоксильную группу *D*-аланинового остатка [5]. Циклическая система состоит из трех полифункциональных аминокислот: *D*-глутаминовой, *D*-изоаспарагина и *L*-лизина, из которых *D*-изоаспарагин образует амидную связь своей β -карбоксильной группой с ϵ -аминогруппой лизина, а γ -карбоксил *D*-глутаминовой кислоты связан с α -аминогруппой лизина. Подобные циклические структуры в гликопептидных фрагментах клеточных стенок бактерий ранее не обнаруживали.

С целью проверки предложенной структуры и изучения связи между структурой и биологической активностью этого необычного циклического гликопептида был предпринят его химический синтез. Выбранная схема синтеза циклопептида предусматривала циклизацию путем образования амидной связи между γ -карбоксильной группой *D*-глутаминовой кислоты и α -аминогруппой лизина, ее преимуществами являются относительная простота синтеза линейного пептапептида и отсутствие риска рацемизации при активации γ -карбоксильной функции.

* В работе приняты стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Кроме того, использованы следующие сокращения: GlcNAc — *N*-ацетил-глюкозамин, MurNAc — *N*-ацетил-мурамовая кислота, Pcr — пентахлорфенил, ДМФА — диметилформамид, ТЭА — триэтиламин, ТФА — трифторацетат.



Первоначальный план синтеза пептидного компонента гликопептида (I) предусматривал построение защищенного линейного пентапептида (IX) (схема 1) и удаление гидролизом бензильной и бензилоксикарбонильной защитных групп с последующей циклизацией. Линейный пентапептид (IX) получали ступенчатым наращиванием пептидной цепи, исходя из амида *D*-аланина с использованием метода активированных эфиров. Для защиты α -аминогрупп использовали *tert*-бутилоксикарбонильную группировку (за исключением α -аминогруппы лизина, защищенной бензилоксикарбонильной группировкой), удаляемой действием трифторуксусной кислоты в течение 30 мин без признаков деблокирования бензилоксикарбонильной защиты. На стадиях получения трипептида (IV), тетрапептида (VI) и пентапептида (IX), требуемый продукт выпадал из реакционной смеси в виде осадка. Пентапептид (IX) гидрировали над Pd-чернью в

С х е м а 1

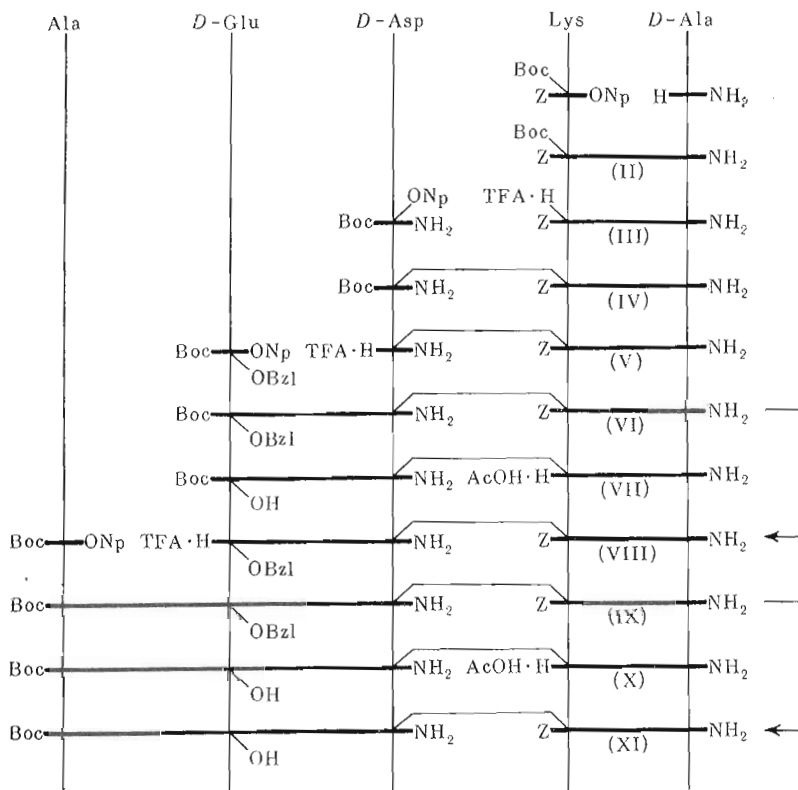
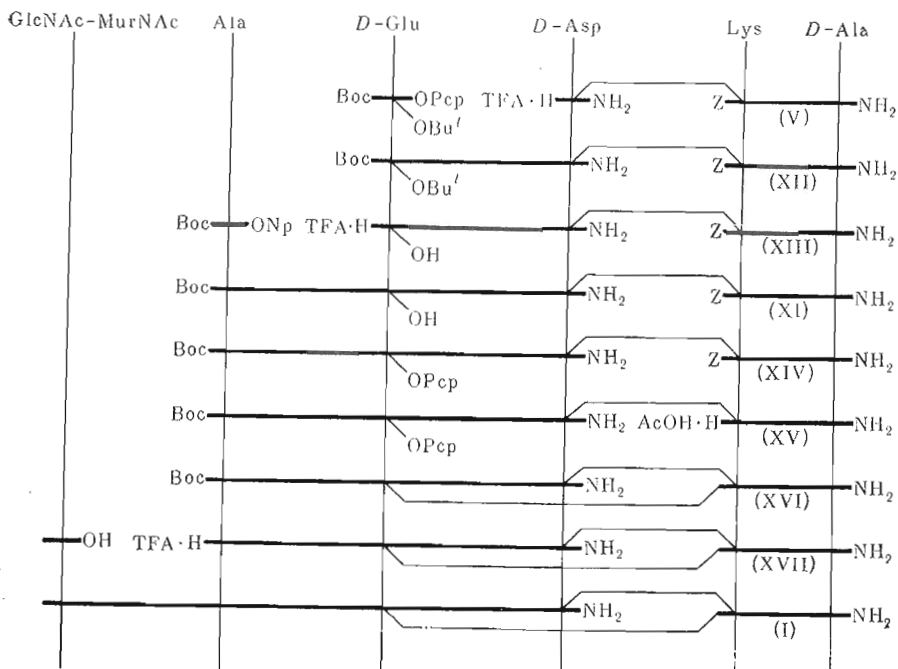


Схема 2

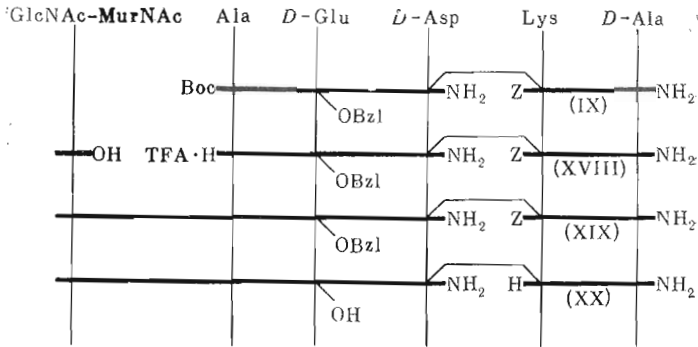


уксусной кислоте в течение 4 ч. Полученный ацетат пентапептида (X) пытались циклизовать различными методами: хлорангидридным (1 моль хлористого тионила в пиридине при -60°C), карбодимидным методом при обычном разбавлении (0,002 М, 1 моль дициклогексилкарбодимида и 2 моль оксисбензтриазола, ДМФА), при высоком разбавлении (0,0004 М, 2 моль дициклогексилкарбодимида и 4 моль оксисбензтриазола, ДМФА) и с помощью реактива Будворда К (0,01 М, 2 моль реактива Будворда К, ДМФА). После отделения поногенных примесей на амберлите IR-410 и даэксе 50 \times 2 во всех случаях получали смесь, которую фракционировали на силикагеле в смеси хлороформ — метанол. Для получаемых фракций измеряли электрофоретическую подвижность и масс-спектры, однако искомого циклопептида обнаружить не удалось. Не привела к успеху и попытка циклизации тетрапептида (VII), получаемого гидрогенолизом (VI).

С целью преодоления возникших трудностей была изменена схема циклизации линейного пентапептида, которая теперь включала получение защищенной кислоты (XI), ее превращение в активированный эфир, удаление бензилоксикарбонильной защиты и внутримолекулярный аминолиз активированного эфира. Бензильную группу (IX) удаляли омылением в смеси ДМФА — вода. Однако при этом образовывался ряд неидентифицированных побочных продуктов и не удалось добиться удовлетворительного воспроизведения выхода целевого продукта от опыта к опыту; в лучших опытах выход не превышал 35%.

Более удовлетворительным оказался альтернативный путь получения кислоты (XI) (схема 2). Трипептид (V) конденсировали с γ -OBu'-производным *D*-глутаминовой кислоты. Защитные группы последней удаляли действием трифторуксусной кислоты и образовавшийся *N*-защищенный тетрапептид превращали в кислоту (XI). Последующие стадии — получение пентахлорфенилового эфира и гидрогенолиз — протекали без осложнений. Продукт гидрогенолиза (XV) циклизовали в разбавленном растворе (0,01 М) абсолютного пиридина при 40°C в течение 48 ч. Выпадающий из реакционной смеси циклопептид (XVI) выделяли после перекристаллизации из метанола с выходом 9%.

Схема 3



Конденсация циклопептида с дисахаридом GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 4$)-MurNAc, выделенным по методике [6] из ферментативного гидролизата клеточных стенок *Micrococcus lysodeikticus*, была проведена по разработанному нами ранее способу [7] с использованием реактива Вудворда К в качестве конденсирующего агента. Выход дисахарид-циклопептида (I) 30%.

В качестве образца для сравнения при физико-химических исследованиях был синтезирован также линейный дисахарид-пептид (XX) (схема 3).

Индивидуальность всех полученных веществ контролировали тонкослойной хроматографией, аминокислотным и элементным анализом. Соединение (XVI) не мигрирует в условиях электрофореза на бумаге (рН 1,9 и 3; 3000 В, 1 ч). N-Концевой анализ соединения (XVII) дансильным методом не обнаружил N-концевого лизина; единственным N-концевым остатком был аланин. Структуры циклопептидов (XVI) и (XVII) подтверждены также данными ЯМР, КД-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Ввиду недостаточной летучести пептидов получить масс-спектры, содержащие пики молекулярных ионов обычным способом, т. е. масс-спектрометрией электронного удара, не удалось. Информация о молекулярном весе циклопептида (XVI) была получена из спектров полевой десорбции. На рис. 1 показаны масс-спектры, полученные при различных токах нагрева эмиттера. При токе нагрева 20 мА в спектре наблюдали интенсивный пик $(M+H)^+$ и небольшое количество пиков от осколочных ионов. Повышение тока нагрева до 22 мА приводит к появлению серии пиков, отвечающих продуктам присоединения ионов натрия и калия к исходному циклопептиду и их фрагментации. Источником щелочных катионов являются, по-видимому, соли металлов, присутствующие в следовых количествах в растворах, использованных для нанесения вещества на эмиттер. Дополнительные сведения о масс-спектрах пептида (XVI), а также спектры линейных пептидов (V), (VI), (IX), (XII), (XI) приводятся в работе [8]. Между кривыми КД линейного пептида с удаленной для повышения растворимости Boc-группой (соединение (XVIII)) и продукта циклизации (XVI) или его дез-Boc-производного (XVII) наблюдаются заметные различия (например, обращение знака эффекта $n \rightarrow \pi^*$ -перехода при ~ 215 нм в воде, рис. 2), указывающие на различия в пространственной структуре этих веществ. Полученный результат может рассматриваться как косвенное подтверждение циклической природы соединений (XVI) и (XVII).

Убедительным подтверждением структуры продукта циклизации (XVI) служат спектры ПМР дез-Boc-производного (XVII), снятые в метаполе и диметилсульфоксиде (табл. 1 и рис. 3), содержащие все ожидаемые на основании химической формулы сигналы и не содержащие «лишних» сигналов. При сопоставлении снятых в одинаковых условиях спектров три-

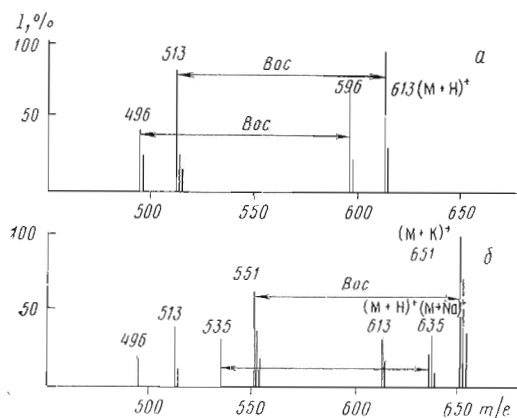


Рис. 1. Масс-спектры полевой десорбции циклопептида (XVI), снятые при токе нагрева эмиттера 20 мА (а) и 22 мА (б)

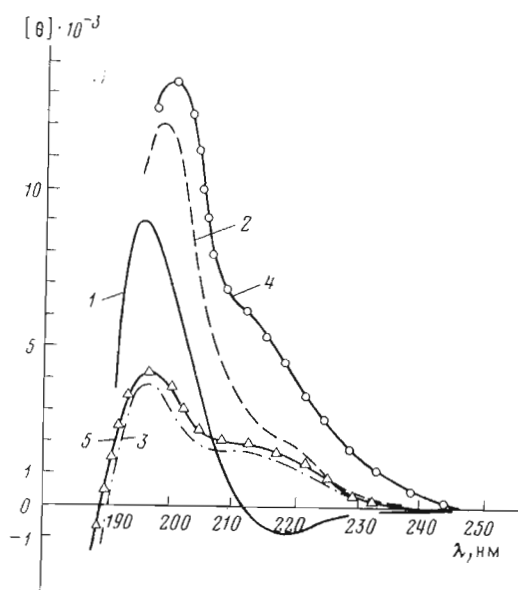


Рис. 2. Спектры КД трифторацетата пентапептида (XVIII) в H_2O (1) и $MeOH$ (2), трифторацетата циклопептида (XVII) в H_2O (3) и $EtOH$ (4); циклопептида (XVI) в H_2O (5)

фторацетата (XVII) и линейного пентапептида (IX) (рис. 3 и табл. 1) обращают на себя внимание значительные различия для химических сдвигов сигналов $C^{\alpha}H$ и NH остатка D -Asp и сигнала $C^{\alpha}H$ остатка Lys ($\Delta\delta$ 1,05; 0,78 и 0,37 м. д. соответственно), а также пониженная конформационная подвижность фрагмента CH_2-NH (Lys) у соединения (XVII), о чем свидетельствует присутствие в его спектре двух различных констант $^3J_{NH-CH(\epsilon)}$ (3,7 и 8,5 Гц) в отличие от одной усредненной константы у соединения (IX) (5,4 Гц). Указанные различия мы рассматриваем как следствие конформационной перестройки, сопровождающей образование цикла, включающего остатки D -изоаспарагина, D -глутаминовой кислоты и L -лизина.

Аминокислотный, углеводный и N-концевой анализ дисахарид-циклопептида (I) дали результаты, согласующиеся с теоретическими; ПМР-спектр (табл. 1, рис. 4) также отвечал структурной формуле. Свойства получен-

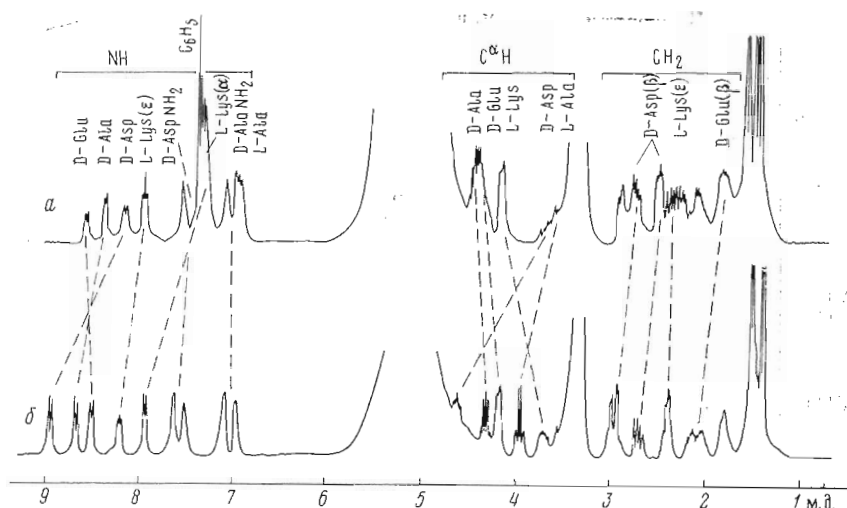


Рис. 3. Спектры ^1H -ЯМР (300 МГц) пентапептида (IX) (а) и циклопептида (XVII) (б) в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (32°C)

ного продукта были сопоставлены со свойствами гликопептида, исследованного в работе [5]. Хотя оба вещества электрически нейтральны и не мигрируют в условиях электрофореза, из табл. 2 видно, что они существенно различаются по хроматографической подвижности, точке плавления и оптической активности. Отсюда следует, что формула (Г) не отвечает продукту, выделенному из гидролизата клеточных стенок *L. bulgaricus*, а структура последнего нуждается в дальнейшем исследовании. Скорее всего, этот продукт имеет линейную структуру пептидной части, поскольку его спектр КД, существенно отличающийся от спектра циклического производного (I), весьма близок спектру линейного дисахарид-пентапептида (XX) (рис. 5).

В заключение отметим, что полученный нами гликопептид обладал некоторой (хотя и более слабой, чем природная смесь гликопептидов) противоопухолевой активностью на мышах против саркомы 180 в дозах 50 и 2,5 мг/кг в условиях, описанных в работе [9].

Авторы выражают благодарность А. И. Гуревичу за предоставление образца препарата гликопептида, выделенного из клеточной стенки *L. bulgaricus*, И. Б. Сорокиной и В. П. Мальковой за измерение противоопухолевой активности и И. Е. Федуловой за проведение аминокислотного и углеводного анализов.

Экспериментальная часть

Системы для тонкослойной хроматографии (силикагель фирмы «Мерск»): бензол — этанол, 8:2 (А), этилацетат — метанол, 4,5:0,5 (Б), хлороформ — метанол, 4,5:0,5 (В), хлороформ — метанол, 4:1 (Г), хлороформ — метанол, 2:1 (Д), хлороформ — метанол, 1:1 (Е), бутанол — вода — уксусная кислота, 3:1:1 (Ж), бутанол — вода — уксусная кислота, 2:1:1 (И), изомасляная кислота — 1% аммиак, 5:3 (К), хлороформ — метанол — уксусная кислота, 9:1:0,5 (Л).

Обнаружение продуктов на хроматограммах Вос-производных проводили нингидрином, предварительно выдержав их в парах HCl ; хроматограммы гликопептидов обрабатывали бензидином и анилинфталатом. Электрофорез проводили на бумаге Filtrac № 12 в буферных системах с рН 1,9 и 3 при напряжении 900 и 3000 В и экспозиции 40–60 мин. Аминокислотный анализ пептидов проводили в стандартных условиях на аминокислотном анализаторе «Liquimat» (Labotron). Образцы гликопептидов

Химические сдвиги (м. д.) протонов пентапептида (IX), циклопептида

Соединение, растворитель	Фрагмент										
	Ala			D-Glu				D-Asp			
	C β H $_3$	C α H	NH*	C γ H $_2$	C β H $_2$	C α H	NH*	C β H $_2$	C α H	NH* (α)	NH $_2$ (β)
(IX) C 2 H $_3$ OH	1,46	3,49	6,90 6,2 (6,8) 4,0	1,51	1,97	4,27	8,54 6,3 (6,9) 7,5	2,78	3,55	8,12 7,6 (8,3) 1,7	7,32; 7,28 4,6
(XVII) C 2 H $_3$ OH	1,49	3,93	—	1,3	2,06	4,16	8,54 7,1 (7,8) 3,5	2,93	4,60	8,90 6,8 (7,4) 9,8	7,60; 7,48 4,0
(XVII) (C 2 H $_3$) $_2$ SO	1,32	3,87	—	1,5	1,63	4,38	8,49 7,8 (8,5) 3,5	2,79	4,49	8,06 8,8 (9,6) 3,2	7,36; 7,30 4,8
(I) (C 2 H $_3$) $_2$ SO	1,19	4,17	8,09 7,7 (8,4) 5,6	1,5	1,84	4,10	8,54 6,4 (7,0) 5,4	2,82	4,29	8,29 7,4 (8,0) 4,9	7,28; 7,14 4,5

* Для сигналов NH приведены значения констант $^3J_{\text{NHSC}\alpha\text{H}}$ (Гц) (в скобках — с поправкой $(\Delta\delta/\Delta T) \cdot 10^3$, м. д./°C).

гидролизовали 6 н.НСI при 110°С в течение 16 ч и анализировали в аналогичных же условиях. При обработке результатов делали поправку на степень разложения аминокислотных и аминокислотных остатков при 16-часовом гидролизе. Данные элементного анализа синтезированных соединений соответствовали вычисленным. Температуры плавления определяли в блоке Кофлера (температуры не исправлены), углы вращения — на поляриметре «Perkin-Elmer 141». Спектры КД получены на дихрографе фирмы «Jobin Jvon», модель III, в растворах H $_2$ O и спектрально чистых этаноле и метаноле с концентрацией растворов 1 мг/мл и длиной кювет от 0,1 до 0,01 см при 23°С. Спектры ^1H -ЯМР регистрировали на спектрометре SC-300 (Varian) со сверхпроводящим соленоидом и рабочей частотой 300 МГц в режиме фурье-преобразования. Стабилизацию резонансных условий осуществляли по сигналу дейтерия растворителя ((C 2 H $_3$) $_2$ SO, C 2 H $_3$ OH, Stohler Isotope Chemicals). Химические сдвиги измеряли относительно натриевой соли 2,2-диметил-2-силапептан-5-сульфоната с точностью $\pm 0,005$ м.д., константы спин-спинового взаимодействия — с точностью $\pm 0,1$ Гц. Температуру образца поддерживали с точностью $\pm 1^\circ\text{C}$. Отнесение сигналов и констант взаимодействия выполняли двойным и тройным резонансом при использовании внешнего синтезатора частоты «Schomandle» по методике, приведенной в работе [10].

Z-Lys(Boc)-D-Ala-NH $_2$ (II) (схема 1)

К раствору 2,4 г (16 ммоль) ацетата амида D-аланина [11] и 2,1 г (16 ммоль) оксибензтриазола в 40 мл ДМФА прибавляли при охлаждении и при перемешивании 2,2 мл (16 ммоль) ТЭА и 8,39 г (16,7 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира N $^\alpha$ -бензилоксикарбонил-N $^\epsilon$ -трет-бутилоксикарбониллизина [12]. Реакционную смесь выдерживали 1 сут при 40°С. Упаривали ДМФА, остаток растворяли в *n*-бутаноле, промывали 1 н. NH $_4$ OH, водой, 1 н. лимонной кислотой, насыщенным раствором NaCl. Растворитель упаривали до небольшого объема, вещество высаживали эфиром.

(XVII) и пептидной части дисахарид-циклопептида (I)

Фрагмент											
Lys							D-Ala				
C ^ε H ₂	C ^δ H ₂	C ^γ H ₂	C ^β H	N ^α H	NH* (α)	NH (ε)	C ^β H ₃	C ^α H	NH*	NH ₂	
2,38	1,8	1,5	1,8	4,05	7,51	7,92	1,33	4,34	8,34	7,02; 6,95	
					7,5 (8,2) 8,1	5,0 (5,4) 6,1				7,0 (7,6) 8,4	6,3
2,37	1,8	1,5	1,8	3,68	7,93	8,17	1,39	4,30	8,63	7,06; 6,94	
					6,2 (6,8) 6,9	3,4 (3,7) 7,8 (8,5) 6,9				8,68 (8,8) 6,7	7,2
2,18	1,7	1,5	1,8	4,22	8,03	7,77	1,19	4,18	7,60	7,09; 7,03	
					7,8 (8,5) 4,9	7,8 (8,5) 3,3				7,9 (8,6) 3,5	5,8
2,31	1,8	1,5	1,8	4,05	8,43	8,00	1,24	4,43	7,89	7,15; 7,02	
					5,3 (5,8) 9,7					7,5 (8,2) 5,2	5,3

на электроотрицательность заместителя) и температурные градиенты химических сдвигов

После перекристаллизации из метанола получали 5,0 г (6,8%) соединения (II). Т. пл. 158–160°С; $[\alpha]_D^{20} +3,36$ (с 0,41; MeOH); R_f 0,52 (А), 0,40 (В), 0,80 (Д), C₂₂N₄O₆H₃₄.

Boc-D-Asp(ONp)-NH₂

Гидрогенолизом α-бензилового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-*D*-изоаспарагина [13] в метаноле над Pd-чернью при 30°С в течение 4 ч получали хроматографически чистый *трет*-бутилоксикарбонил-*D*-изоаспарагин; R_f 0,27 (А), 0,50 (Г).

Конденсацией 9 г (38 ммоль) *трет*-бутилоксикарбонил-*D*-изоаспарагина и 5,56 г (40 ммоль) *n*-нитрофенола в присутствии 8,24 г (40 ммоль) дициклогексилкарбодимиды по методике [14] получили после перекристаллизации из изопропанола 6,50 г (50%) *n*-нитрофенилового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-*D*-изоаспарагина. Т. пл. 120–121°С; $[\alpha]_D^{20} +21,7°$ (с 1; ДМФА); R_f 0,56 (А), 0,60 (В), 0,72 (В).

Boc-D-Asp-NH₂ — *Z-Lys-D-Ala-NH₂* (IV) (схема 1)

Раствор 3 г защищенного дипептида (II) в 10 мл трифторуксусной кислоты выдерживали 30 мин, продукт высаживали абс. эфиром, высушивали в эксикаторе над NaOH. Получили белый кристаллический порошок трифторацетата дипептида (III) с выходом 3,3 г (98%).

К раствору 1,9 г (4 ммоль) трифторацетата дипептида (III) в 20 мл ДМФА добавляли при 0°С 0,55 мл (4 ммоль) ТЭА и 1,58 мл (4,5 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-*D*-изоаспарагина. Реакционную смесь выдерживали при 40°С в течение 2 сут. Выпавший осадок промывали метанолом и эфиром. После перекристаллизации из ДМФА получали 1,68 г (79%) трипептида (IV). Т. пл. 215–216°С; $[\alpha]_D^{20} 8,64°$ (с 0,41; ДМФА); R_f 0,21 (А), 0,69 (Д). C₂₆N₆O₈H₄₀. Аминокислотный ана-

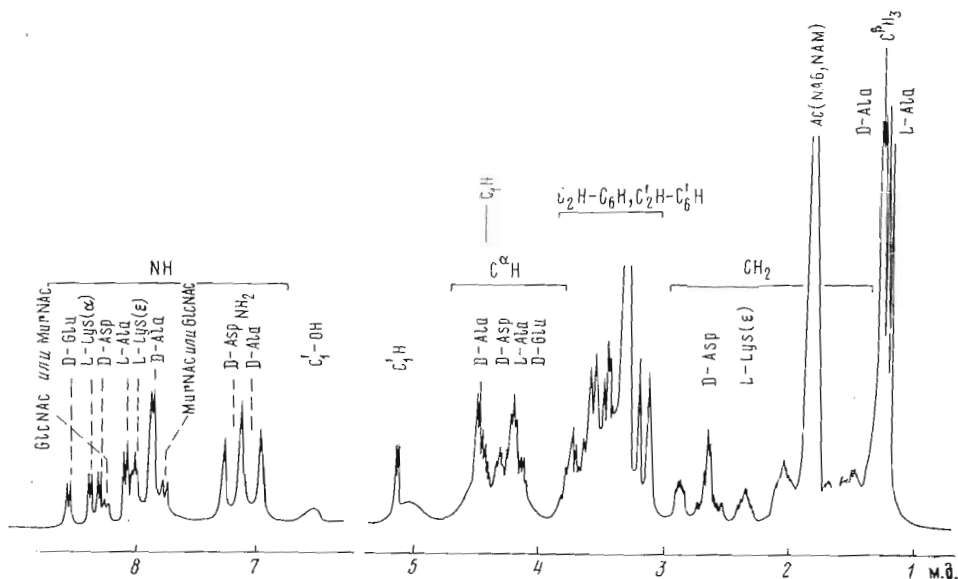
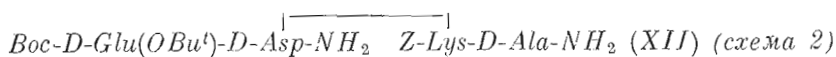
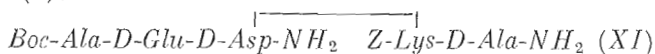


Рис. 4. Спектр $^1\text{H-NMR}$ (300 МГц) дисахарид-циклопептида (I) в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (32°C)

лиз: Asp 0,97 (1), Ala 1,00 (1), Lys 0,97 (1).



В условиях предыдущего опыта из 4 г трипептида (IV) получали трифторацетат (V) с выходом 4,2 г (95%). К раствору 1,55 мл (2,6 ммоль) соединения (V) в 15 мл абс. ДМФА добавляли при 0°C 0,36 мл (2,6 ммоль) ТЭА и затем 1,6 мл (2,9 ммоль) α -пентахлорфенилового эфира γ -трет-бутилового эфира *N*-трет-бутилоксикарбонил-*D*-глутаминовой кислоты [15]. Реакционную смесь выдерживали 12 ч при 20°C , упаривали до масла, добавляли *n*-бутанол, промывали насыщенным раствором NaHCO_3 , водой, 1 н. лимонной кислотой, насыщенным раствором NaCl , сушили над MgSO_4 . Растворитель упаривали в вакууме до небольшого объема, образовавшуюся смесь выдерживали 1 ч при 4°C , осадок после фильтрования кристаллизовали из метанола, получали 1,2 г (60%) производного (XII). Т. пл. $190\text{--}200^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} +2,88^\circ$ (*c* 0,41; ДМФА); R_f 0,22 (А), 0,57 (Г). $\text{C}_{35}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{H}_{35}$. Аминокислотный анализ: Glu 1,00 (1), Asp 0,82 (1), Lys 0,83 (1), Ala 0,97 (1).



К раствору 1,1 г (1,5 ммоль) тетрапептида (XII) в 4 мл трифторуксусной кислоты добавляли 2 мл воды, выдерживали 2 ч, упаривали до масла, затем несколько раз упаривали с бензолом. Остаток переосаждали из уксусной кислоты эфиром и получали 0,98 г (95%) трифторацетата тетрапептида (XIII) (схема 2).

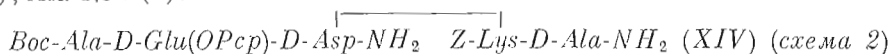
К раствору 0,98 г (1,3 ммоль) трифторацетата (XIII) в 8 мл ДМФА при охлаждении добавляли 0,35 мл (2,6 ммоль) ТЭА, 0,2 г (1,6 ммоль) оксидбензтриазола и 0,47 г (1,5 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира трет-бутилоксикарбонилаланина [12]. Реакционную смесь выдерживали 1 сут при 40°C . Растворитель упаривали до большого объема, высаживали *n*-бутанолом, осадок промывали эфиром. После перекристаллизации из 200 мл этанола получали 0,9 г (84,9%) соединения (XI) (схема 2). Т. пл. $196\text{--}198^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} -3,84^\circ$ (*c* 0,41; ДМФА); R_f 0,16 (Д), 0,35 (Е),

Физико-химические свойства гликопептида из клеточной стенки *Lactobacillus bulgaricus* и дисахарид-циклопептида (I)

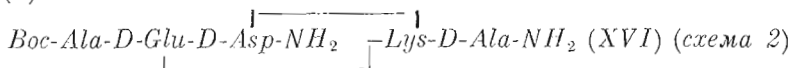
Соединение	Т. пл., °С	R_f^*	Удельная эллиптичность, [Ψ] ^o		
			235 нм	225 нм	205 нм
Гликопептид из <i>L. bulgaricus</i> (I)	250 (разл.)	0,0	+98	+173	-315
	202-204	0,70	+227	0	-1500

* Изомасляная кислота — 1% аммиак, 5 : 3 (система К, см. «Экспериментальную часть»).

0,75 (Ж). Аминокислотный анализ: Glu 1,00 (1), Asp 0,87 (1), Lys 0,89 (1), Ala 1,92 (2).

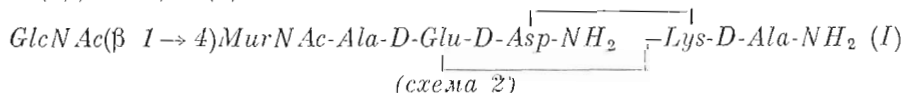


Раствор 0,9 г (1,1 ммоль) соединения (XI) и 0,42 г (1,5 ммоль) пентахлорфенола в 25 мл ДМФА охлаждали до -10°C , добавляли 0,3 г (1,4 ммоль) дициклогексилкарбодимида, перемешивали 1,5 ч при 0°C и 12 ч при 20°C . Дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали до небольшого объема, высаживали водой. После переосаждения из ДМФА этилацетатом получали 0,6 г (50,5%) пентахлорфенилового эфира (XIV). Т. пл. 206–210°С; $[\alpha]_D^{20} -4,77^\circ$ (с 0,5; ДМФА); R_f 0,63 (Д), 0,75 (Л). Аминокислотный анализ: Glu 1,00 (1), Asp 0,90 (1), Lys 0,92 (1), Ala 2,1 (2).



2,4 г (2,3 ммоль) γ -пентахлорфенилового эфира (XIV) суспендировали в метаноле, содержащем 4 экв. ледяной уксусной кислоты, и гидрировали над Pd-чернью до прекращения выделения CO_2 . Растворитель упаривали и получали 1,6 г (77%) ацетата (XV).

К 300 мл абс. пиридина, содержащего 0,5 мг (3,6 ммоль) ТЭА, при 40°C прикапывали в течение 2 ч раствор 1,6 г (1,8 ммоль) ацетата пентахлорфенилового эфира (XV) в 40 мл ДМФА, содержащий 3,6 ммоль ТЭА, выдерживали при 40°C в течение 8 ч, затем 3 сут при 20°C . Отфильтровывали вывавшийся осадок, промывали этанолом и эфиром. После перекристаллизации из метанола получали 0,1 г (9%) кристаллического вещества (XVI). Т. пл. 295–297°С; $[\alpha]_D^{20} -87^\circ$ (с 0,1; H_2O); R_f 0,20 (Д), 0,50 (Ж). $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_9\text{N}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Аминокислотный анализ: Lys 1,00(1), Asp 0,90(1), Glu 1,10 (1), Ala 2,30 (2).



Раствор 100 мг циклопептида (XVI) в 1 мл трифторуксусной кислоты выдерживали 30 мин, высаживали эфиром и получали 100 мг трифторацетата циклопептида (XVII).

К раствору 80 мг (0,17 ммоль) N-ацетилглюкозамипил ($\beta 1 \rightarrow 4$)-N-ацетилмурамовой кислоты в 10 мл ДМФА при 0°C прибавляли 0,025 мл (0,18 ммоль) ТЭА и 60 мг (0,21 ммоль) реактива Вудворда К. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°C и затем при 20°C до полного растворения реагента. Далее добавляли по каплям при перемешивании в течение 15 мин раствор 100 мг (0,15 ммоль) трифторацетата циклопептида (XVII)

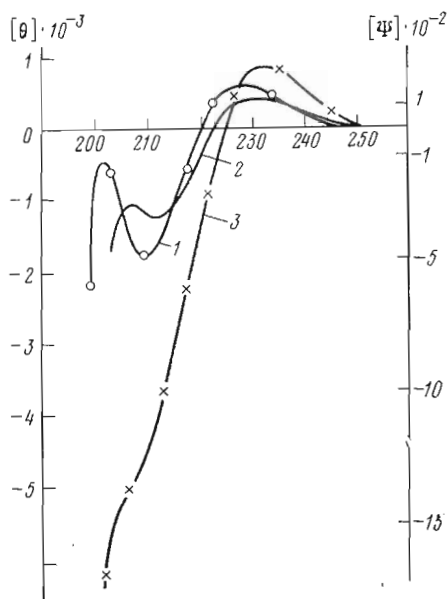
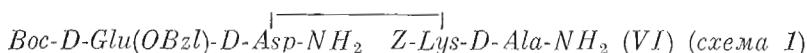
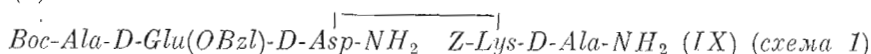


Рис. 5. Спектры КД, снятые в H_2O для гликопептида, выделенного из *Lactobacillus bulgaricus* (1); гликопептида (XX); гликоциклопептида (I). Шкала молярной эллиптичности $[\theta]$ относится к синтетическим гликопептидам (I) и (XX), шкала удельной эллиптичности $[\Psi]$ — к (I) и гликопептиду из *Lactobacillus bulgaricus*

в 4 мл ДМФА, содержащий 0,020 мл (0,15 ммоль) ТЭА, и перемешивали 20 ч при $20^\circ C$. После упаривания растворителя остаток растворяли в 1 мл воды и пропускали через колонку с анионообменником Bio Rad AG 3×4 в CH_3COO^- -форме. Элюат упаривали, продукт пересаждали из метанола эфиром. Полученные 70 мг вещества растворяли в 1 мл воды и пропускали через колонку с дауэксом 50×8 в H^+ -форме. Остаток после упаривания пересаждали из метанола эфиром. Получили 40 мг (25%) гликоциклопептида (I). Т. пл. $202-204^\circ C$; $[\alpha]_D^{20} -13^\circ$ (с 0,1; H_2O); R_f 0,25 (А), 0,70 (К). $C_{55}H_{78}N_{10}O_{21} \cdot 3,5H_2O$. Аминокислотный анализ: GlcNH₂ 0,98 (1), Mur 0,90 (1), Glu 1,00 (1), Ala 1,90 (2), Asp 0,80 (1), Lys 0,80 (1).



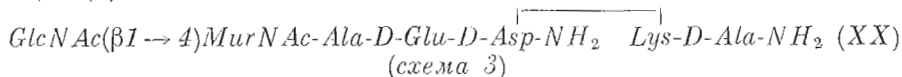
К раствору 4,2 г (7,4 ммоль) трифторацетата трипептида (V) в 30 мл ДМФА добавляли при $0^\circ C$ 0,81 мл (7,4 ммоль) N-метилморфолина, 3,51 г (8,1 ммоль) α -n-нитрофенилового эфира γ -бензилового эфира N-трет-бутил-оксикарбонил-D-глутаминовой кислоты [16]. Реакционную смесь выдерживали при $40^\circ C$ в течение 1 сут, а затем при $5^\circ C$ 1 ч. Выпавший осадок промывали последовательно метанолом и эфиром. После перекристаллизации из ДМФА получали 4,52 г (80%) тетрапептида (VI). Т. пл. $219-221^\circ C$; $[\alpha]_D^{20} -6,16^\circ$ (с 0,5; ДМФА); R_f 0,23 (А), 0,58 (Г). $C_{38}H_{53}N_7O_{11}$. Аминокислотный анализ: Glu 1,00 (1), Asp 0,87 (1), Ala 1,00 (1), Lys 0,85 (1).



Аналогично трифторацетату (V) из 2,6 г защищенного тетрапептида (VI) получали 2,55 г (96%) трифторацетата (VIII).

Из 2,53 г (3,3 ммоль) соединения (VIII), 1,24 г (4,0 ммоль) n-нитрофенилового эфира трет-бутилоксикарбонилаланина в присутствии 0,36 мл (3,3 ммоль) N-метилморфолина аналогично синтезу (VI) получали пеп-

тапептид (IX). Выход после перекристаллизации из ДМФА 2,3 г (81%). Т. пл. 225–228° С; $[\alpha]_D^{20}$ 5,36° (с 0,5; ДМФА); R_f 0,57 (Г). $C_{41}H_{58}N_8O_{12} \cdot H_2O$. Аминокислотный анализ: Glu 1,00 (1), Asp 0,84 (1), Lys 0,80 (1), Ala 1,72 (2).



Аналогично трифторацетату (V) из 2 г защищенного пентапептида (IX) получали 2,3 г трифторацетата (XVIII).

В условиях синтеза дисахарид-пептида (I) к 330 мг (0,66 ммоль) N-ацетилглюкозаминил(1→4)-N-ацетилмурамовой кислоты, 0,1 мл (0,7 ммоль) ТЭА, 300 мг (0,90 ммоль) реактива Вудворда К добавляли 300 мг (0,35 ммоль) трифторацетата пентапептида (XVIII), 0,048 мл (0,35 ммоль) ТЭА в ДМФА. Растворитель упаривали, вещество высаживали водой, промывали метанолом, эфиром и получали 120 мг (30%) защищенного гликопептида (XIX).

50 мг гликопептида (XIX) растворяли в 75% уксусной кислоте и гидрировали над Pd-чернью. После лиофилизации получали 35 мг соединения (XX). Т. пл. 184–186° С; $[\alpha]_D^{20}$ +7,7 (с 0,1; H_2O); R_f 0,0 (E), 0,50 (K). $C_{41}H_{68}N_{10}O_{20} \cdot 1,5H_2O$. Аминокислотный анализ: Asp 1,00 (1), Lys 0,96 (1), Glu 1,04 (1), Ala 2,20 (2), Mur 1,00 (1), $GlcNH_2$ 0,80 (1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bogdanov I. G. (1959) Symposium on Antibiotics, Prague, Abstracts of Papers, pp. 120–121.
2. Bogdanov I. G., Popkhristov P. (1961) Bulletin of the Scientific Research Institute for Anti-cancer Antibiotics, Sofia, No. 1.
3. Bogdanov I. G., Popkhristov P., Marinov L. (1962) VIII Intern. Anticancer Congr. Moscow, Abstracts of Papers, p. 335.
4. Bogdanov I. G., US patent 3762998.
5. Bogdanov I. G., Dalev P. G., Gurevich A. I., Kolosov M. N., Mal'kova V. P., Plemyanikova L. A., Sorokina I. B. (1975) FEBS Letters. 57, 259–261.
6. Sharon N., Osawa T., Flowers H. M., Jeanlor R. W. (1966) J. Biol. Chem., 241, 223–230.
7. Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Ростовцева Л. И., Андропова Т. М., Сорокина И. Б., Малькова В. П. (1977) Авт. свидет. № 727647.
8. Sadovskaya V. L., Andronova T. M., Merimson V. G., Rosinov B. V., (1980) Organic Mass Spectrometry, in press.
9. Богданов И. Г., Величков В. Т., Гуревич А. И., Далев П. Г., Колосов М. Н., Малькова В. П., Сорокина И. Б., Христова Л. Н. (1977) Бюл. exper. биол. и мед., 709–712.
10. Быстров В. Ф., Оханов В. В., Арсеньев А. С., Афанасьев В. А., Гуревич А. З. (1980) Биооргани. химия, 6, 386–392.
11. Chang I. K., Sievertsson H., Currie B., Folkers R. J. (1971) J. Med. Chem., 14, 484–487.
12. Sandrin E., Boissonnas R. A. (1963) Helv. chim. acta, 46, 1637–1669.
13. Lefrancier P., Choay J., Derrien M., Lederman I. (1977) Int. J. Peptide Protein Res., 9, 249–257.
14. Wünsch E., Drees F., Jentson J. (1965) Chem. Ber., 98, 803.
15. Visser S., Raap J., Kerling K. E. T., Havings E. (1970) Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 89, 865–875.
16. Jhough K., Watanabe K., Namba K., Otsuka H. (1970) Bull. Chem. Soc. Japan, 43, 3873–3882.

Поступила в редакцию
28.IV.1980

ON THE STRUCTURE OF ANTITUMOR GLYCOPEPTIDE FROM THE *LACTOBACILLUS BULGARICUS* CELL WALL

ANDRONOVA T. M., ROSTOV'TSEVA L. I., DOBRUSHKINA E. P.,
GAVRILOV Yu. D., DESHKO T. N., IVANOV V. T.

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

Total synthesis has been performed of a disaccharide-pentapeptide having the structure earlier proposed for the antitumor glycopeptide isolated from the partial hydrolysate of the *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. Synthetic product proved non-identical to the natural sample whose structure therefore requires further clarification.