



УДК 577.112.6:577.182.82:615.33

ПЕПТИДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ МАКРОЛИДОВ, РОДСТВЕННЫХ ТИЛОЗИНУ

© 2007 г. Г. А. Коршунова[#], Н. В. Сумбатян, Н. В. Федорова, И. В. Кузнецова, А. В. Шишкина, А. А. Богданов

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 26.09.2005 г. Принята к печати 06.09.2006 г.

С целью изучения конформации и топографии растущей пептидной цепи в рибосомном туннеле с помощью специально сконструированных пептидных производных макролидных антибиотиков разработаны подходы к синтезу модельных соединений на основе родственных тилозину макролидов – десмикозина и *O*-микаминозилтилонолида. Разработан метод селективного бромацетилирования десмикозина по гидроксильной группе мицинозы, включающий предварительное ацетилирование микаминозы. Реакцией 4"-бромацетильного производного антибиотика с цезиевыми солями дипептида Woc-Ala-Ala-OH и гексапептида $\text{MeOTr-Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro-OH}$ получены соответствующие пептидные производные десмикозина. Осуществлена конденсация защищенных пептидов Woc-Ala-Ala-OH , $\text{Woc-Ala-Ala-Phe-OH}$ и $\text{Woc-Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro-OH}$ с C23-гидроксильной группой *O*-микаминозилтилонолида.

Ключевые слова: тилозин, десмикозин, *O*-микаминозилтилонолид, пептидные производные макролидов.

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотик тилозин относится к классу макролидов, которые способны связываться с большой субъединицей бактериальной рибосомы и ингибировать биосинтез белка [1]. Тилозин (Tyl, **I**) представляет собой производное 16-членного лактона, к которому в положение C5 присоединен остаток дисахарида микарозилмикаминозы, а в положение C23 – остаток моносахарида мицинозы.

Родственные тилозину антибиотики содержат то же самое лактонное кольцо с меньшим числом углеводных остатков: десмикозин (Des, **II**) лишен остатка микарозы, а в *O*-микаминозилтилонолиде (OMT, **III**) отсутствуют остатки микарозы и мицинозы.

Макролидные антибиотики представляют интерес не только как терапевтические средства, но также как удобные инструменты для исследования функциональных аспектов биосинтеза белка. Анализ структуры комплексов рибосомных субъединиц с антибиотиками также важен для понимания

молекулярных механизмов связывания антибиотиков, для понимания причин антибиотической устойчивости и для рационального конструирования лекарственных средств. В последние годы получены кристаллические комплексы тилозина и других антибиотиков с 50S субъединицей бактериальной рибосомы [2, 3]. Рентгеноструктурный анализ этих комплексов с разрешением порядка 3Å показал, что антибиотики связываются в рибосомном туннеле вблизи пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) [4, 5]. При этом дисахаридный заместитель при C5 тилозина простирается вдоль туннеля в направлении ПТЦ, а остаток мицинозы в положении C23 лактонного кольца направлен к выходу из туннеля.

Исходя из известной пространственной ориентации тилозина в рибосомном туннеле, можно сконструировать пептидные производные по положениям C20 и C23 антибиотика, пептидный фрагмент которых соответственно простирается в направлении к ПТЦ (условно “вверх по туннелю”) и в противоположном от него направлении (условно “вниз по туннелю”). Эти пептидные фрагменты в какой-то степени будут моделировать растущую пептидную цепь в рибосомном туннеле как вблизи ПТЦ, так и ближе к выходу из туннеля.

Указанные пептидные производные макролидов могут служить полезными инструментами для изучения конформации и топографии синтезируемого полипептида в рибосомном туннеле. Ранее нами были получены пептидные производные ти-

Сокращения: βAla – β -аланин; DCC – *N,N'*-дициклогексилкарбодимид; Des – десмикозин; DIEA – диизопропилэтиламин; DMAP – 4-диметиламинопиридин; DNPH – 2,4-динитрофенилгидразин; Gluc – гликозил; HBTU – гексафторфосфат *N*-гидроксисбензотриазолилурия; MeOTr – 4-монометокситритил; Tyl – тилозин; OMT – *O*-микаминозилтилонолид; ПТЦ – пептидилтрансферазный центр. Все аминокислоты *L*-ряда.

[#] Автор для связи (тел.: (495) 9395520; факс: (495) 9393181; эл. почта: korsh@genebee.msu.ru).

мут ожидаемое нами положение “вниз по туннелю”. Описано большое число биологически активных производных десмикозина по различным функциональным группам, включая 4"-гидроксильную группу мицинозы, однако пептидные производные по этому положению неизвестны. Известно [9], что 2'- и 4'-гидроксильные группы микаминозы ацилируются легче, чем 4"-гидроксильная группа мицинозы. Это обстоятельство было использовано нами при разработке подходов к синтезу 4"-*O*-пептидилдесмикозинов: 2',4'-дизащищенный десмикозин предполагалось вводить в реакцию с бромацетилбромидом с целью последующего ацилирования полученного бромпроизводного десмикозина с помощью цезиевых солей карбоновых кислот [10].

В структуре ОМТ (III) при C23 имеется первичная гидроксильная группа, которая может быть селективно ацилирована высокоактивными реагентами как с предварительной защитой гидроксильных групп микаминозы, так и без таковой [11]. В литературе имеются сведения о дипептидных производных по положению C23 антибиотика, полученных ацилированием предварительно введенной в это положение аминокислоты [12]. Этот путь синтеза представлялся нам достаточно сложным, поэтому был применен другой подход, заключающийся в ацилировании непосредственно C23-гидроксила с предварительным блокированием 2',4'-гидроксильных функций микаминозы.

При разработке подходов к синтезу пептидилмакролидов мы видели два возможных пути. Один заключался в первоначальном присоединении к антибиотику первой с C-конца аминокислоты и последующем ступенчатом наращивании цепи методами классической пептидной химии, другой предполагал ацилирование антибиотика предварительно синтезированным пептидом. Первый путь нам представлялся более перспективным, так как применяемая в этом методе активация аминокислот, в отличие от пептидов, в меньшей степени сопровождается рацемизацией. Кроме того, этот метод позволяет использовать комбинаторный подход для получения большого числа аналогов.

В ходе наших предварительных исследований было показано, что таким путем, используя Вос-аминокислоты, можно получить пептидилмакролиды, однако в стандартных условиях удаления защитной группы антибиотика претерпевали сильное осмоление и деградацию, что заставило нас отказаться от этого подхода и в дальнейшем искать другие подходящие защитные группировки.

Более успешным оказался второй подход, а именно, ацилирование антибиотиков готовыми модельными пептидами. Для этой цели нами был использован ряд коротких пептидных фрагментов (IV)–(VII), полученных в ходе синтеза целевых более протяженных пептидных последовательностей.

Вос-Ala-Ala-OH (IV),

Вос-Ala-Ala-Phe-OH (V),

Вос-Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro-OH (VI) и

MeOTr-Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro-OH (VII).

Как уже указывалось, пептидные производные макролидов могут служить инструментами для изучения конформации и функционирования растущей пептидной цепи в рибосомном туннеле. Поэтому представляют интерес пептиды различного строения и пространственной структуры, в частности, имеющие склонность к образованию α -спирали, β -структуры, а также неупорядоченные. При выборе таких пептидов мы руководствовались общетеоретическими представлениями об аминокислотных остатках, предпочитающих ту или иную вторичную структуру [13].

Синтез пептидов (IV) и (V) проводили классическим методом с использованием DCC в присутствии HOBT, реакции вели при охлаждении (0°C) в растворе DMF, что гарантирует лишь незначительную степень рацемизации [14]. Карбоксильные группы защищали этерификацией. Синтез пептида (V) вели с C-конца, получая вначале Вос-Ala-Phe-OEt (Va), который после удаления Вос-группы трифторуксусной кислотой конденсировали с Вос-Ala-OH. Эфиры пептидов омыляли спиртовой щелочью. В результате получили пептидилкислоты (IV) и (V), необходимые для конъюгации с ОМТ. Для модификации десмикозина дипептид (IV) превращали в соответствующую цезиевую соль [10, 15].

Пептид (VI) получали на твердой фазе с использованием смолы Меррифилда [16], Вос-аминокислот и DCC в качестве активирующего агента. Снятие Вос-групп проводили раствором хлористого водорода в диоксане, отделение пептида от полимера осуществляли переэтерификацией метанолом в присутствии DIEA. После очистки с помощью колоночной хроматографии на силикагеле был получен в индивидуальном состоянии (по ТСХ и ВЭЖХ) пептид (VI), строение которого было подтверждено аминокислотным анализом и масс-спектрометрически.

Поскольку использование Вос-группы для синтеза пептидилмакролидов, как уже указывалось, не является оптимальным, в отдельных случаях Вос-группу заменяли на 4-монометокситритильную, которая удаляется в более мягких условиях [17]. Так, обработкой деблокированного Вос-гексапептида (VI) 4-метокситрифенилхлорметаном в DMF при 40°C в течение 16 ч был получен пептид (VII), который удалось очистить на колонке с силикагелем, однако в масс-спектре его был обнаружен только пик, соответствующий детритилированному производному.

Синтез пептидных производных десмикозина был выполнен следующим образом. На первом этапе реакцией антибиотика с уксусным ангидридом было получено 2',4'-диацетильное производ-

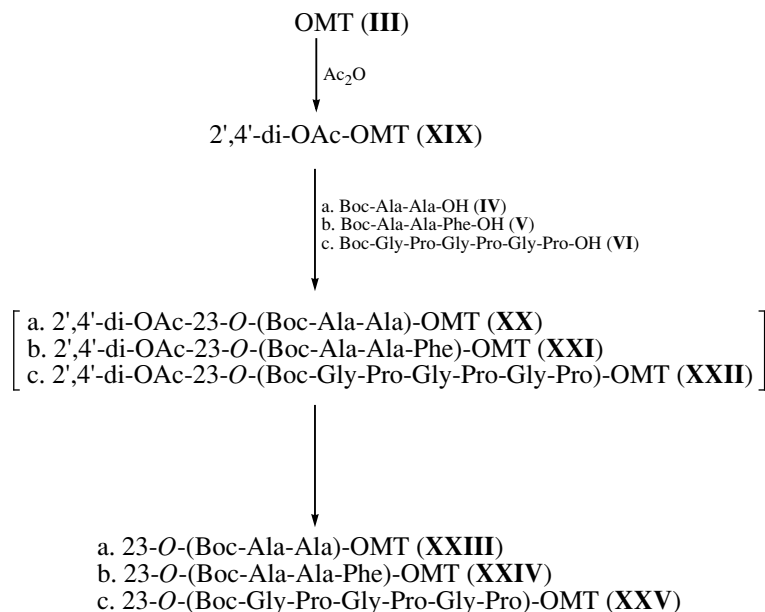


Схема 3.

ствии в масс-спектрах пиков соединений (XV) и (XVI), скорее всего, свидетельствует о том, что *O*-ацетильные группы в остатке микаминозы так же, как и тритильная функция, оказываются крайне неустойчивыми в условиях хроматографии производных на силикагеле в системах, содержащих метанол. Эти факты согласуются с литературными данными о лабильности 2'- и 4'-ацетильных групп микаминозы в присутствии метанола [9, 18].

Синтез пептидных производных ОМТ проводили по схеме 3. Обработкой ОМТ уксусным ангидридом в дихлорметане при комнатной температуре, как описано [19], было получено 2',4'-диацетильное производное ОМТ (XIX). Первичный гидроксил при С23 при этом в реакцию не вступает [18, 19]. Соединение (XIX) было получено с хорошим выходом и однородным по ТСХ и ВЭЖХ. Поскольку в патенте [19] не имелось для него никаких констант, кроме хроматографической подвижности в одной системе, был снят масс-спектр, который подтвердил структуру (XIX). Далее полученное производное вводили в конденсацию с защищенными пептидами, используя методы пептидной химии.

В первом случае для дипептида: Boc-Ala-Ala-OH (IV) в качестве конденсирующего средства мы использовали DCC в присутствии катализатора DMAP. Как известно, конденсация DCC-методом [20] идет с высоким выходом, но может сопровождаться значительной рацемизацией, особенно в присутствии DMAP [21]. Для подавления рацемизации реакцию проводили в среде дихлорметана, при низкой температуре (0°C) и с минимальным количеством основания (0.1–0.2 экв.). После выде-

ления и очистки предполагаемого продукта реакции (XX) на силикагеле было получено хроматографически индивидуальное вещество, по масс-спектру соответствующее дезацетилированному производному 23-*O*-(Boc-Ala-Ala)-ОМТ (XXIII). Оценить оптическую чистоту полученного соединения (как и других пептидил-макролидов) нам не представлялось возможным из-за недостаточного количества материала. Кроме того, не умаляя важности этого аспекта в выполняемом исследовании, следует заметить, что основное внимание в настоящей работе было уделено поиску принципиальных подходов к синтезу пептидил-макролидов.

Аналогично дипептиду (IV), проводили конденсацию диацетата (XIX) с гексапептидом (VI), для которого условия реакции (DCC, DMAP, –5°C, раствор дихлорметана и DMF) были более благоприятными, так как *C*-концевой пролин обычно не обладает склонностью к рацемизации [22]. Трипептид (V) конденсировали с диацетатом (XIX) с использованием урониевого реагента HBTU [23], который сводит к минимуму рацемизацию, но требует особых предосторожностей из-за его высокой реакционной способности.

Полученные пептидные производные ОМТ (XX), (XXI), (XXII) очищали на колонке с силикагелем. Соединения, индивидуальные по ТСХ, анализировали с помощью масс-спектрометрии. Во всех случаях обнаружены пики, соответствующие целевым веществам (XXIII)–(XXV), не имеющим в своем составе ацетильных групп. Как и в случае десмикозина, это можно объяснить повышенной лабильностью ацетильных групп 3-дезоксизимидина.

тиламиноглюкозы в условиях очистки на колонке силикагеля в системах, содержащих метанол [9, 18].

Таким образом, в настоящей работе на примере модельных соединений разработаны подходы к синтезу специально сконструированных пептидных производных макролидов, которые могут быть использованы как инструменты для изучения конформации и топографии растущей полипептидной цепи в рибосомном туннеле.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы следующие реагенты: производные аминокислот фирм "Fluka", "Bachem", DCC, бромацетилбромид, 4-диметиламинопиридин (DMAP) (Merck), *N*-гидроксibenзотриазолилуроний гексафторфосфат (Fluka); остальные реактивы – отечественного производства, в том числе тилозин (ООО "Мосагроген").

ТСХ пептидных производных проводили на пластинках силикагеля 60 F254 (Merck). Для колоночной хроматографии использовали Silicagel 60 (0.063–0.2 мм) фирмы "Fluka".

Применяли следующие системы растворителей: изопропанол–25% водный аммиак–вода, 14 : 1 : 5 (№ 1); хлороформ–метанол, 7 : 3 (№ 2); хлороформ–метанол, 9 : 1 (№ 3); хлороформ–метанол, 4 : 1 (№ 4); бензол–ацетон–уксусная кислота, 50 : 25 : 2 (№ 5); хлороформ–25% водный аммиак–метанол, 65 : 4 : 25 (№ 6); дихлорметан–метанол–25% водный аммиак, 8 : 1 : 0.1 (№ 7); дихлорметан–метанол–25% водный аммиак, 4 : 1 : 0.06 (№ 8); бензол–ацетон, 4 : 1 (№ 9); хлороформ–метанол–32% уксусная кислота, 60 : 45 : 20 (№ 10).

Соединения, поглощающие в УФ-области, наблюдали с помощью хемископа Брумберга. Соединения со свободной α -аминогруппой обнаруживали нингидриновым реактивом (0.2 г нингидрина в смеси 100 мл ацетона, 5 мл воды и 5 мл уксусной кислоты); соединения, содержащие Вос-группу – тем же методом после нагревания пластинки до 90°C. Тилозин, десмикозин, ОМТ и их производные детектировали 0.4% раствором DNPH в 2 М растворе HCl.

Кислотный гидролиз пептидов проводили в стандартных условиях (6 М HCl, 105°C, 24 ч), в запаянных ампулах. Содержание аминокислот в гидролизатах определяли с помощью аминокислотного анализатора фирмы "Hitachi", модель 835.

Величины оптического вращения пептидов измеряли на поляриметре Perkin-Elmer (модель 341) при длине волны 589 нм. Температуру плавления измеряли на приборе РНМК (VEB Wagetechne Rapid).

ОФВЭЖХ проводили на хроматографе Милихром А-02 фирмы "Эконова" на колонке ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2.0 × 75 мм, 5 мкм) в градиенте от 15 до 70% Б в А за 20 мин: А – 0.1% TFA в воде, Б – 0.1% TFA в ацетонитриле; скорость элюции –

100 мкл/мин. Детекцию осуществляли при 214 и 300 нм.

Молекулярные массы определяли методом TOF-MALDI-масс-спектрометрии на приборе Ultraflex фирмы "Bruker Daltonics" (Германия), оснащенном лазером (λ 337 нм).

Протонные и двумерные спектры для растворов веществ в CDCl₃ были зарегистрированы при температуре 303 К на приборе Bruker DRX-500 с рабочей частотой 500.13 МГц по протонам, углеродные (с развязкой от протонов) – на приборе Bruker AM-300 с рабочей частотой 75.43 МГц по ¹³C. Мультиплетность сигналов в спектрах ¹³C определялась при помощи методики INEPT. В качестве внутреннего стандарта использовался остаточный сигнал хлороформа (δ_H 7.27, δ_C 77.0). Двумерные спектры регистрировали с использованием стандартных методик фирмы "Bruker" (COSY – в магнитудном представлении, для HSQC использовалась ¹J_{CH} 135 Гц, для HMBSC – ³J_{CH} 8 Гц). Химические сдвиги приведены в миллионных долях, а КССВ – в герцах.

Десмикозин (II). Раствор 5.0 г (5.47 ммоль) тилозина в 100 мл воды и 10 мл 1 н. HCl (pH 3) выдерживали 4 сут и доводили pH до 8.5 добавлением сухого бикарбоната натрия. Экстрагировали хлороформом (4 × 20 мл), объединенные вытяжки сушили сернокислым магнием, отфильтровывали, упаривали досуха. Получали 3.85 г (91.6%) соединения (II); т. пл. 95–120°C; лит. данные [7]: 95–115°C; *R_f* 0.45 (2), *R_f* 0.5 (7). МС: [M + H]⁺ 772.8 (100%). Вычислено для C₃₉H₆₅NO₁₄: 771.8.

О-Микаминозилтилонолид (III). К раствору 10 г (10.92 ммоль) тилозина в 500 мл воды добавляли 600 мкл конц. серной кислоты, доведя pH до 1.68, и раствор кипятили 50 ч. Экстрагировали хлороформом (3 × 130 мл). Водную фазу доводили до pH 9.5 водным 25% раствором аммиака и повторно экстрагировали хлороформом (4 × 200 мл). Объединенные органические вытяжки сушили прокаленным MgSO₄ и концентрировали до 1/5 объема. Добавляли диэтиловый эфир до полноты выпадения осадка. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, высушивали, получали 6.62 г продукта, 1 г которого очищали на колонке с силикагелем (25 × 3 см) в градиенте систем № 2 → № 8. Выход соединения (III) 380 мг (38%); т. пл. 132–135°C; лит. данные [8]: 115–118°C; *R_f* 0.26 (2), *R_f* 0.3 (7). МС: [M + H]⁺ 598.7 (100%). Вычислено для C₃₁H₅₁NO₁₀: 597.8. ¹H-ЯМР, COSY, HSQC (CDCl₃, 500 МГц): 9.64 (1 H, с, H20), 7.28 (1 H, д, *J* 15.0, H11), 6.29 (1 H, д, *J* 15.0, H10), 5.86 (1 H, д, *J* 10.7, H13), 4.93 (1 H, ддд, *J* 9.4, 9.4, 1.7, H15), 4.22 (1 H, д, *J* 7.3, H1'), 3.80 (1 H, д, *J* 10.5, H3), 3.70 (3 H, м, H5, H23), 3.44 (1 H, дд, *J* 10.0, 7.7, H2'), 3.23 (1 H, м, H5'), 3.03 (1 H, т, *J* 9.0, H4'), 2.90 (1 H, дд, *J* 17.7, 9.6, H19), 2.84 (1 H, м, H14), 2.50 (1 H, уш. с, H8), 2.47 (3 H и 1 H, с и м, N(CH₃)₂, H2), 2.34 (2 H, м, H3', H19), 2.10 (1 H,

уш. с, Н6), 1.91 (1 Н, д, J 16.5, Н2), 1.81 (1 Н, м, Н16), 1.58 (4 Н, м, Н4, Н7, Н16), 1.40 (1 Н, м, Н7), 1.78 (3 Н, с, Н22), 1.22 (3 Н, д, J 6.4, Н6'), 1.17 (3 Н, д, J 6.6, Н22), 0.97 (3 Н, д, J 6.6, Н21), 0.90 (3 Н, т, J 7.3, Н14). ^{13}C -ЯМР, *INEPT*, *HSQC* (CDCl_3 , 500 МГц): 203.5 (С9), 203.0 (С20), 173.9 (С1), 148.0 (С11), 141.8 (С13), 135.8 (С12), 118.9 (С10), 104.0 (С1'), 81.2 (С5), 75.1 (С15), 73.3 (С5'), 70.9 (С2'), 70.8 (С4'), 70.2 (С3'), 67.0 (С3), 62.4 (С23), 47.2 (С14), 44.5 (С8), 43.7 (С19), 41.7 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 40.3 (С4), 39.5 (С2), 32.8 (С7), 32.6 (С6), 25.6 (С16), 17.8 (С6'), 17.3 (С21), 13.1 (С22), 9.7 (С17), 9.0 (С18).

трет-Бутилоксикарбонил-аланил-аланин (IV). Метиловый эфир трет-бутилоксикарбонил-аланил-аланина (IVa). К смеси 1.89 г (10 ммоль) Вос-аланина и 2.0 г (14.8 ммоль) НОВt в 15 мл DMF при охлаждении (0°C) и перемешивании добавляли раствор 3.0 г (14.5 ммоль) DCC в 10 мл DMF и перемешивание продолжали 2 ч при 0°C . Затем в реакционную смесь добавляли раствор 1.5 г (10.7 ммоль) гидрохлорида метилового эфира аланина и 1.82 мл (10.7 ммоль) DIEA в 15 мл DMF и далее оставляли на 12 ч при комнатной температуре. После завершения реакции реакционную смесь фильтровали, фильтрат разбавляли водой в 10 раз и экстрагировали этилацетатом (3×100 мл). Этилацетатный экстракт промывали 0.05 М раствором H_2SO_4 (3×60 мл), водой (60 мл), 5% раствором NaHCO_3 (3×60 мл), насыщенным раствором NaCl (50 мл) и сушили безводным MgSO_4 . После удаления осушителя раствор упаривали на роторном испарителе, остаток кристаллизовали под петролейным эфиром. Выход: 2.25 г (82%); R_f (5) 0.80.

К раствору 274 мг (1.0 ммоль) (IVa) в 5 мл метанола добавляли 0.6 мл 2 н. раствора NaOH, перемешивали 3 ч. Метанол упаривали, доводили рН раствора до 3 добавлением 0.05 М раствора H_2SO_4 , экстрагировали этилацетатом (3×20 мл), органическую фазу промывали водой, насыщенным раствором NaCl и сушили безводным MgSO_4 . Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали до небольшого объема и вещество (IV) высаживали петролейным эфиром. Выход: 180 мг (70%); R_f (5) 0.50; т. пл. $95\text{--}97^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} -31^\circ$ (с 1; метанол) (лит. данные: т. пл. $97\text{--}98^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} -33^\circ$ (с 1; метанол) [24]).

трет-Бутилоксикарбонил-аланил-аланил-фенилаланин (V). Этиловый эфир трет-бутилоксикарбонил-аланил-фенилаланина (Va). К раствору 5.10 г (27 ммоль) Вос-аланина и 4.72 г (34.8 ммоль) НОВt в 35 мл DMF при 0°C и перемешивании добавляли раствор 7.17 г (34.8 ммоль) DCC в 15 мл DMF. Перемешивание продолжали 2 ч при охлаждении. Затем в реакционную смесь добавляли раствор 6.5 г (28.4 ммоль) гидрохлорида этилового эфира фенилаланина и 6.77 мл триэтиламина (48.3 ммоль) в 35 мл DMF и перемешивали 12 ч при комнатной

температуре. Реакционную смесь обрабатывали так же, как в случае пептида (IVa). Выход: 8.43 г (90%). Т. пл. $105\text{--}106^\circ\text{C}$ (из этилового эфира). R_f 0.91 (система 4), 0.82 (система 5). Аминокислотный анализ: Ala 1 (1), Phe 1.15 (1).

Этиловый эфир аланил-фенилаланина (трифторацетат) (Vб). Раствор 8.1 г (22.3 ммоль) (Va) в 15 мл TFA выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре. TFA упаривали на роторном испарителе, остаток переупаривали трижды с метанолом, растворяли в 3 мл метанола и высаживали пептид этиловым эфиром. Получали 7.50 г белого кристаллического вещества. Выход 90%. Т. пл. $157\text{--}159^\circ\text{C}$. R_f (1) 0.80, R_f (6) 0.79.

Этиловый эфир трет-бутилоксикарбонил-аланил-аланил-фенилаланина (Vв). К раствору 2.34 г (12.4 ммоль) Вос-Ala и 2.53 г (18.6 ммоль) НОВt в 16 мл DMF при 0°C добавляли раствор 3.83 г (18.6 ммоль) DCC в 8 мл DMF. Перемешивание продолжали несколько часов при охлаждении. Затем в реакционную смесь добавляли раствор 4.95 г (13.1 ммоль) трифторацетата (Vб) и 3.32 мл триэтиламина (23.6 ммоль) в 16 мл DMF и перемешивали 12 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь обрабатывали так же, как в случае пептида (IVa). Получали 5.09 г (90%) (Vв) с т. пл. $139\text{--}140^\circ\text{C}$ (этилацетат-петр. эфир); R_f (4) 0.85, R_f (5) 0.50.

Синтез производного (V) проводили аналогично получению (IV) в метаноле, исходя из 500 мг (1.15 ммоль) (Vв) и 690 мкл 2 М раствора NaOH (1.38 ммоль). Выход 448 мг (95%). Т. пл. $113\text{--}115^\circ\text{C}$. R_f (4) 0.73, R_f (5) 0.21. ВЭЖХ: $\tau = 15.2$ мин (градиент $0\text{--}60\%$ Б в А за 20 мин). Аминокислотный анализ: Ala 2.14 (2), Phe 1 (1). $[\alpha]_D^{20} -34^\circ$ (с 1; DMF). МС: 408.6 $[M + H]^+$. Вычислено для $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$: 407.5.

трет-Бутилоксикарбонилглицил-пролил-глицил-пролил-глицил-пролин (VI). Метиловый эфир трет-бутилоксикарбонилглицил-пролил-глицил-пролил-глицил-пролина (VIa). Вос-Pro-полимер (3.5 г; 0.75 ммоль/г смолы; общее количество аминокислоты 2.625 ммоль) загружали в реакционный сосуд и добавляли 30 мл диоксана. Использовали трехкратный избыток производных Вос-Gly-OH и Вос-Pro-OH и DCC, применяя 10%-ный раствор карбодиимида в дихлорметане. Последовательно выполняли следующие операции (объем раствора при промывках 30 мл, при конденсации – 20 мл): деблокирование 4 н. раствором HCl в диоксане (30 мин), промывка диоксаном, промывка дихлорметаном, нейтрализация 10%-ным раствором Et_3N в дихлорметане (10 мин), промывка дихлорметаном, добавление раствора Вос-аминокислоты в дихлорметане (5 мин), добавление раствора DCC в дихлорметане (2 ч), промывка дихлорметаном. На каждом шаге синтеза контролировали полноту протекания реакции конденсации

с помощью теста Кайзера [25]. После окончания синтеза пептидил-полимер переносили из сосуда Меррифила в круглодонную колбу и обрабатывали при комнатной температуре и перемешивании 152 мл 0.46 мМ раствора DIEA в метаноле. Затем полимерный носитель отфильтровывали, фильтрат упаривали на роторном испарителе. Получали продукт в виде желтого жидкого масла, которое очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (50 г) в системе № 3. Получали 660 мг (55%) вещества в виде белого твердого масла. Т. пл. 150°C. R_f (3) 0.58, R_f (4) 0.85; ВЭЖХ: τ = 18.2 мин (градиент 0–50% Б за 25 мин). Аминокислотный анализ: Gly 1.31 (1), Pro 1 (1). $[\alpha]_D^{20}$ – 48° (с 1; DMF). МС: 595.2 $[M + H]^+$. Вычислено для $C_{27}H_{42}N_6O_9$: 594.7.

К раствору 260 мг (0.438 ммоль) (VIa) в 3.5 мл метанола добавляли 0.265 мл (0.53 ммоль) 2 М раствора NaOH. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Далее реакционную смесь обрабатывали, как в случае (IV). Выход: 180 мг (из этилацетата гексаном) (71%) R_f (6) 0.41, R_f (10) 0.79. ВЭЖХ: τ = 13.3 мин (градиент 0–60% Б за 20 мин). МС: 581.8 $[M + H]^+$. Вычислено для $C_{26}H_{40}N_6O_9$: 580.6.

4-Монометокситритилглицил-пролил-глицил-пролил-глицил-пролин (VII). К 50 мг (0.086 ммоль) гексапептида (VI) добавляли 0.5 мл TFA, смесь выдерживали 1 ч при комнатной температуре, удаляли избыток TFA на роторном испарителе, остаток упаривали несколько раз с абс. метанолом, растворяли в 0.5 мл DMF и добавляли 31 мкл (0.18 ммоль) DIEA и 50 мг (0.162 ммоль) MeOTrCl. Смесь выдерживали 16 ч при температуре 40°C, после чего растворитель удаляли в вакууме, а остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле в системе хлороформ–метанол, 7 : 3, содержащей 0.5% пиридина. Выход 47 мг (73%); R_f (2) 0.43, R_f (4) 0.35. МС: 480.4 $[M + H - MeOTr]^+$. Вычислено для $C_{21}H_{31}N_6O_7$: 479.4

2',4'-Ди-О-ацетилдесмикозин (VIII). К раствору 183 мг (0.25 ммоль) десмикозина в 7 мл дихлорметана при охлаждении льдом и перемешивании прибавили 75 мкл (0.8 ммоль) As_2O_3 . Перемешивали 1 ч при комнатной температуре, после чего вливали реакционную смесь в разбавленный аммиачный раствор (0°C) и экстрагировали дважды хлористым метиленом. Органические вытяжки сушили прокаленным $MgSO_4$ и упаривали. Получали 183 мг (85.5%) соединения (VIII); R_f 0.91 (2), R_f 0.65 (3), R_f 0.11 (9). МС: найдено $[M + H]^+$ 856.9 (100%), $[M + Na]^+$ 878.8 (36%). Вычислено для $C_{43}H_{69}NO_{16}$: 855.9.

2'- и 4'-О-[N-(трет-Бутилоксикарбонил)-β-аланил]-десмикозины (X) и (XI). 282 мг (1.5 ммоль) Вос-βAla-OH растворяли в смеси 50 мкл DMF и 0.5 мл дихлорметана, раствор охлаждали до 0°C и

добавляли в него охлажденный (0°C) раствор 154.5 мг (0.75 ммоль) DCC в 0.5 мл дихлорметана. Перемешивали смесь 1 ч при охлаждении, добавляли раствор высушенного в вакууме над P_2O_5 при 63°C десмикозина (270 мг, 0.35 ммоль) в 0.4 мл абс. дихлорметана. Через 10 мин добавляли 17 мг (0.14 ммоль) DMAP и перемешивали при комнатной температуре 12 ч. Осадок отфильтровывали, промывали дихлорметаном, фильтрат дважды промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия, водой и сушили прокаленным $MgSO_4$. После упаривания получили 230 мг хроматографически однородной смеси (X) и (XI): ТСХ: R_f 0.95 (2); ВЭЖХ: время выхода 18.1 мин (у исходного десмикозина 11.7 мин). МС: $[M]$ 943.4. Вычислено для $C_{47}H_{78}N_2O_{17}$: 943.02. 1H -ЯМР ($CDCl_3$, 500 МГц), δ , м.д.: (X): 4.98 (1 H, м, H2'), 4.56 (1 H, д, J 8.0, H1'), 4.31 (1 H, д, J 8.0, H1'), 3.75 (1 H, с, H3''), 3.55 (1 H, м, H5''), 3.29 (1 H, м, J 6.5, H5'), 3.22 (1 H, д, J 7.0, H4''), 3.10 (1 H, т, J 8.5, C4'), 3.05 (1 H, дд, J 8.0, < 2.0, H2''), 2.55 (1 H, т, J 8.0, C3'); (XI): 4.80 (1 H, т, J 8.5, H4'), 4.56 (1 H, д, J 8.0, H1'), 4.25 (1 H, д, J 8.0, H1'), 3.75 (1 H, с, H3''), 3.55 (1 H, м, H5''), 3.35 (1 H, м, H2'), 3.29 (1 H, м, J 6.5, H5'), 3.22 (1 H, д, J 7.0, H4''), 3.05 (1 H, дд, J 8.0, < 2.0, H2''), 2.56 (1 H, т, J 8.5, H3').

2',4'-Ди-О-ацетил-4''-О-бромацетилдесмикозин (XII). 2',4'-Ди-О-ацетилдесмикозин (171 мг, 0.2 ммоль) сушили, дважды упаривая с абсолютным пиридином, растворяли в 3 мл сухого хлористого метилена, добавляли к раствору 50 мкл абс. пиридина и охлаждали до –15°C. При перемешивании к реакционной смеси добавляли 50 мкл (0.95 ммоль) бромацетилбромида. Выпадал белый осадок, который растворялся при добавлении 3 мл хлористого метилена. После 10 мин перемешивания при температуре –10–15°C реакционную смесь переносили в смесь льда и хлористого метилена. Органический слой отделяли, промывали 5%-ным раствором бикарбоната натрия и насыщенным раствором хлористого натрия, высушивали над $MgSO_4$ и упаривали на роторном испарителе. К образовавшемуся маслянистому остатку добавляли абсолютный эфир и несколько раз упаривали. Получали 110 мг (56.3%) соединения (XII) в виде светло-желтого осадка; R_f 0.31 (9). МС: $[M]^+$ 975.6 (100%), неидентифицированные пики 1007.7 (15%) и 1027.7 (37%). Вычислено для $C_{45}H_{70}BrNO_{17}$: 976.8.

4''-О-(трет-Бутилоксикарбонил)-аланил-аланил-гликолил)-десмикозин (XVII). Растворяли 10 мг (0.010 ммоль) производного (XII) и 3.74 мг (0.010 ммоль) предварительно приготовленной цезиевой соли Вос-аланил-аланина (метанольный раствор пептида смешивали с 2 М водным раствором карбоната цезия в эквивалентном соотношении, упаривали досуха, тщательно сушили) в 100 мкл DMF. Оставляли на 68 ч при 45°C в термостате, после чего реакционную смесь разбавляли водой и дважды экстрагировали хлороформом. Органиче-

ский слой промывали водой и сушили над прокаленным $MgSO_4$. Остаток после упаривания хлороформа (2.2 мг) исследовали хроматографически: R_f 0.59 (2); вещество поглощает в УФ, проявляется нингидрином и DNPН. ВЭЖХ: $\tau = 22.3$ мин. МС: $[M + H]^+$ 1073.3. Вычислено для $C_{52}H_{85}N_3O_{20}$: 1072.13.

4''-О-(Глицил-пролил-глицил-пролил-глицил-пролил-глицил)-десмикозин (XVIII). 12 мг (0.016 ммоль) пептида (VII) смешивали с 5.2 мг (0.016 ммоль) углекислого цезия и растворяли в 1 мл этилового спирта, полученный раствор упаривали досуха, а затем дважды упаривали с абсолютным пиридином. К остатку добавляли 14 мг (0.014 ммоль) 2',4'-ди-О-ацетил-4''-О-бромацетилдесмикозина (XII) и 0.5 мл абсолютного DMF и оставляли при перемешивании на 24 ч при температуре 50°C. Реакционную смесь упаривали, добавляли равные объемы воды и хлористого метилена и активно встряхивали. Органический слой отделяли, промывали водой и высушивали ситами 4Å. Очищали на колонке силикагеля в системе № 2. Получали 3 мг (14.5%) соединения (XVIII). МС: $[M + H]^+$ 1293.3. Вычислено для $C_{62}H_{97}N_7O_{22}$: 1292.36.

2',4'-Ди-О-ацетил-ОМТ (XIX) [19]. Раствор 0.5 г (0.84 ммоль) ОМТ и 0.63 мл (6.68 ммоль) уксусного ангидрида в 4.5 мл ацетона перемешивали при комнатной температуре 2 ч. Реакционную смесь упаривали, затем упаривали с толуолом (2 × 5 мл). Остаток высушивали в вакуум-эксикаторе, получали 0.56 г (98%) соединения (XIX). R_f 0.9 (2); R_f 0.3 (9). Т. пл. 127–133°C, ВЭЖХ: $\tau = 10.4$ мин (градиент 20–80% Б за 20 мин). МС: $[M + H]^+$ 682.7 (100%), [AcOMT] 640.5 (54%), [OMT] 598.5 (23%). Вычислено для $C_{35}H_{55}NO_{12}$: 681.8.

23-О-(трет-Бутилоксикарбонил-аланил-аланил)-ОМТ (XXIII). К раствору 7.8 мг (0.01 ммоль) 2',4'-ди-О-ацетил-ОМТ (XIX), 0.2 мг DMAP и 4 мг (0.015 ммоль) пептида (IV) в 100 мкл дихлорметана при перемешивании и охлаждении (0°C) прибавляли раствор 3.1 мг (0.015 ммоль) DCC в 50 мкл дихлорметана. Перемешивание продолжали 36 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали разбавленным водным раствором аммиака и упаривали. Остаток очищали на колонке с силикагелем (3 × 0.8 см) в системе № 2: R_f 0.95 (2). Вещество проявляется DNPН и нингидрином. МС: $[M + H]^+$ 840.4 (100%), [OMT]: 598.4 (68%). Вычислено для $C_{42}H_{69}N_3O_{14}$: 839.5.

23-О-(трет-Бутилоксикарбонил-аланил-аланил-фенилаланил)-ОМТ (XXIV). Раствор 5 мг (0.07 ммоль) 2',4'-ди-О-ацетил-ОМТ (XIX), 7.4 мг (0.019 ммоль) Вос-Ala-Ala-Phe-OH (V) и 5 мг (0.013 ммоль) HBTU в смеси дихлорметана и DMF (100 мкл) перемешивали при комнатной температуре 12 ч. Реакционную смесь упаривали, к остатку добавляли 1 мл дихлорметана, промывали разбавленным водным раствором аммиака и сушили молекулярными ситами 4 Å. После упари-

вания дихлорметана остаток фракционировали на колонке с силикагелем (20 × 5 мм) в системе № 2, собирая вещество с R_f 0.91. По ТСХ вещество индивидуально, поглощает в УФ, проявляется DNPН и нингидрином. МС: $[M + H]^+$ 988.0; $[M + H - Вос]^+$ 887.9. Вычислено для $C_{51}H_{78}N_7O_{15}$: 987.1.

23-О-(трет-Бутилоксикарбонил-глицил-пролил-глицил-пролил-глицил-пролил)-ОМТ (XXV). Раствор 11.2 мг (0.015 ммоль) производного (XIX), 0.3 мг (0.0025 ммоль) DMAP, 11.6 мг (0.02 ммоль) гексапептида (VI) в смеси 100 мкл дихлорметана и 50 мкл DMF охлаждали до -5°C и при перемешивании добавляли раствор 4.1 мг (0.02 ммоль) DCC в 100 мкл дихлорметана. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при комнатной температуре и промывали разбавленным водным раствором аммиака, затем сушили прокаленным $MgSO_4$. После упаривания остаток очищали на колонке с силикагелем (30 × 10 мм) в системе № 2. Выделяли вещество с R_f 0.91. По ТСХ вещество индивидуально, поглощает в УФ, проявляется DNPН и нингидрином при нагревании. МС: $[M + H]^+$ 1161.2 (100%), $[M + Na]^+$ 1183.2 (54%), [Ac₂-ОМТ] 682.7, [Ac-ОМТ] 640.9. Вычислено для $C_{57}H_{89}N_7O_{15}$: 1160.3.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящая работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 04-04-49480a и 05-04-08131 офи_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gale E.F., Candliffe E., Reynolds P.E., Richmond M.H., Waring M.J. // The Molecular Basis of Antibiotic Action. London John: Wiley & Sons, 1981.
2. Hansen J.L., Ippolito A., Ban N., Nissen P., Moore P.B., Steitz A. // Mol. Cell. 2002. V. 10. P. 117–128.
3. Schlunzen F., Zarivach R., Harms J., Bashan A., Tocilj A., Albrecht R., Yonath A., Franceschi F. // Nature. 2001. V. 413. P. 814–821.
4. Schlunzen F., Harms J., Franceschi F., Hansen H.A., Bartels H., Zarivach R., Yonath A. // Structure. 2003. V. 11. P. 329–338.
5. Богданов А.А. // Молекуляр. биология. 2003. Т. 37. С. 1–4.
6. Сумбатян Н.В., Коршунова Г.А., Богданов А.А. // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 1436–1438.
7. Hamill R.L., Haney M.E., McGuire J.M., Stamper M.C. Antibiotics tylosin and desmycosin and derivatives thereof: US Patent № 3178341. 1965.
8. Morin R., Gorman M. O-Mycaminosyl tylonolide and process for the preparation thereof: US Patent № 3459853. 1969.
9. Tanaka A., Watanabe A., Tsuchiya T., Umezawa S. // J. Antibiotics. 1981. V. 34. P. 1381–1384.
10. Gisin B.F. // Helv. Chim. Acta. 1973. V. 56. P. 1476–1482.

11. *Kirst H.* OMT ester derivatives. GB Patent № 2111497A. 1983.
12. *Kirst H., Toth J.* C-23-Modified derivatives of OMT, pharmaceutical compositions and method of use: US Patent № 4459290. 1984.
13. *Финкельштейн А.В., Птицын О.Б.* Физика белка: Курс лекций, 3-е изд. М.: Книжный дом "Университет", 2005. 456 с.
14. *Konig W., Geiger R.* // *Ber.* 1970. V. 103. P. 788–798.
15. *Wang S.S., Gisin B.F., Winter D.P., Makofske R., Kulesha I.D., Tzograki C., Meienhofer I.* // *J. Org. Chem.* 1977. V. 42. P. 1286–1290.
16. *Merrifield R.B.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1963. V. 85. P. 2149–2154.
17. *Kohli V., Blocker H., Koster H.* // *Tetrahedron Lett.* 1980. V. 21. P. 2683–2686.
18. *Jian T., Phanly T., Busuyek M., Hou Y., Or Y., Qiu Y., Vo N.* 23-O-Substituted 5-O-mycaminosyltylonolide derivatives: US Patent № 6753415B2. 2003.
19. *Fujiwara T., Watanabe H., Hirano T., Sakakibara H.* 23-O-Acyl-23-desmycosin derivatives: GB Patent № 2116170A. 1983.
20. *Sheehan J.C., Hess G.P.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1955. V. 77. P. 1067–1068.
21. *Kessler H., Siegmeier R.* // *Tetrahedron Lett.* 1983. V. 24. P. 281–282.
22. *McDermott J.R., Benoiton N.L.* // *Can. J. Chem.* 1973. V. 51. P. 2555–2561.
23. *Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W., Gillessen D.* // *Tetrahedron Lett.* 1989. V. 30. P. 1927–1932.
24. *Медведкин В.Н., Заболотских В.Ф., Пермяков Е.А., Митин Ю.В., Сорокина М.Н., Клименко Л.В.* // *Биоорганическая химия.* 1995. Т. 21. С. 684–690.
25. *Kaiser E., Colecott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I.* // *Anal. Biochem.* 1970. V. 34. P. 595–598.

Peptide Derivatives of Tylosin-Related Macrolides

G. A. Korshunova[#], N. V. Sumbatyan, N. V. Fedorova, I. V. Kuznetsova, A. V. Shishkina, and A. A. Bogdanov

[#]Phone: +7 (495) 939-5520; fax: +7 (495) 939-3181; e-mail: korsh@genebee.msu.ru

Belozersky Research Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

Faculty of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

Approaches to the synthesis of model compounds based on the tylosin-related macrolides desmycosin and *O*-mycaminosyltylonolide were developed using specially designed peptide derivatives of macrolide antibiotics to study the conformation and topography of the nascent peptide chain in the ribosome tunnel. A method for selective bromoacetylation of desmycosin at the hydroxyl group of mycinose was developed, which involves preliminary acetylation of mycaminose. The reaction of the 4"-bromoacetyl derivative of the antibiotic with cesium salts of the dipeptide Boc-Ala-Ala-OH and the hexapeptide MeOTr-Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro-OH led to the corresponding peptide derivatives of desmycosin. The protected peptides Boc-Ala-Ala-OH, Boc-Ala-Ala-Phe-OH, and Boc-Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro-OH were condensed with the C23-hydroxyl group of *O*-mycaminosyltylonolide. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2007, vol. 33, no. 2; see also <http://www.maik.ru>

Key words: tylosin, desmycosin, *O*-mycaminosyltylonolide, peptide derivatives of macrolides