

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОНЪЮГАТОВ ГЕМИНА С НЕЗАЩИЩЕННЫМИ ПЕПТИДАМИ

С.А. Окороченков, аспирант, Е.А. Быстрова, студент,

Е.М. Павлова, студент, Г.А. Желтухина, ведущий научный сотрудник,

*В.Е. Небольсин, генеральный директор

кафедра Химии и технологии биологически активных соединений

им. Н.А. Преображенского МИТХТ им. М.В. Ломоносова

*ООО «ФарминтерпрайсеЗ»

e-mail: laboratory211@yandex.ru

Синтезированы 3- и 13-членные аргининсодержащие пептиды – RGD и [⁵Ala]-индолицидин. Получены монозамещенные производные гемина, модифицированные остатками пептидов RGD, [⁵Ala]-индолицидина и грамицидина S. Показана биоцидная активность и низкая токсичность полученных конъюгатов.

Arginine-containing peptides consisted of 3- and 13- amino acids residues, namely RGD and [⁵Ala]-indolicidine were synthesized. Monosubstituted hemin derivatives modified by RGD, [⁵Ala]-indolicidine and gramicidine S were obtained. Biocide activity and low toxicity of obtained conjugates was shown.

Ключевые слова: гемин, антимикробные пептиды, биоцидная активность

Key words: hemin, antimicrobial peptides, biocide activity

Введение

В связи с развитием резистентности к существующим препаратам у патогенных для человека вирусов и микроорганизмов, представляется актуальным поиск новых антимикробных агентов. В последнее время особое внимание уделяется дизайну новых антимикробных агентов на основе антимикробных пептидов (АМП) [1]. Резистентность к АМП у микроорганизмов развивается довольно редко [2], по-видимому, вследствие того, что основным механизмом действия АМП является деструкция липидной мембраны бактерий, микроскопических грибов и вирусов [3]. По этой причине антимикробные пептиды рассматриваются как перспективный класс новых антибиотиков [4]. Антимикробные пептиды эндогенного происхождения являются частью самой древней системы защиты организмов от патогенов. Они обнаружены практически у всех живых организмов, от бактерий до человека [5].

Антимикробные пептиды, как правило, являются амфифильными соединениями с выраженными гидрофильными и гидрофобными участками. За редкими исключениями, молекулы АМП содержат несколько остатков лизина и/или аргинина и при физиологических значениях pH имеют значительный положительный заряд [3].

Наиболее важным фактором селективности действия АМП на бактерии, вирусы и эукариотические клетки является различие в составе и строении мембран [3]. Внешняя поверхность эукариотической мембраны состоит из цвиттер-ионных фосфолипидов, в то время как мембраны бактериальных клеток содержат большое количество отрицательно заряженных фосфолипидов как на внутренней, так и на внешней поверхности липидного бислоя. Кислотный характер внешней

стороны прокариотической мембраны обуславливает ее взаимодействие преимущественно с положительно заряженными АМП [5]. Кроме того, гибель клеток под действием АМП может происходить и по другим причинам, например, в результате взаимодействия антимикробных пептидов с внутриклеточными мишенями [6]. По схожим механизмам АМП воздействуют и на мембраны вирусов, приводя к их дезактивации [3].

Основными препятствиями к применению АМП в клинической практике являются их сравнительно высокая стоимость, чувствительность к действию протеолитических ферментов, а также присущий многим АМП гемолитический эффект [1]. По-видимому, вследствие этого на рынке пока отсутствуют препараты на основе АМП, состоящие исключительно из аминокислот L-ряда. Большинство АМП отсеиваются на ранних стадиях клинических испытаний.

В последнее время всё большее внимание уделяется различным стратегиям дизайна модифицированных АМП [7, 8], лишенных перечисленных выше недостатков. Впрочем, пока ни один из предложенных подходов не привел к их преодолению.

Известно, что гемин обладает некоторой бактерицидной активностью в отношении *S. aureus*, однако, использование гемина в качестве антибактериального средства затруднено вследствие его малой эффективности (МИК 100 мкМ, МБК 200 мкМ), нерастворимости в воде, гемолитической активности, а также кратковременности антибактериального эффекта [9]. Кроме того, показано, что пептидные производные гемина (ПГ) обладают разнообразными видами биологической активности, в частности, нуклеолитической в отношении плазмидной ДНК [10], а также способны ингибировать протеиназу ВИЧ и

оказывать вследствие этого противовирусное анти-ВИЧ-действие [11].

С целью повышения эффективности действия, снижения токсичности и приобретения новых полезных свойств, в частности, водорастворимости и устойчивости к протеолизу, в настоящей работе осуществлена конъюгация природных соединений двух классов – гемина и антимикробных пептидов и их фрагментов.

Результаты и их обсуждение

Синтез пептидных конъюгатов гемина

Для присоединения к гемину нами были выбраны следующие пептиды: применяющийся в клинической практике для лечения наружных инфекций циклический пептид грамицидин S, линейный антимикробный пептид [⁵Ala]-индолицидин, высокоактивный в отношении грам-

положительных и грамотрицательных бактерий, а также пептид Arg-Gly-Asp (RGD), являющийся фрагментом антимикробных пептидов семейства цекропинов [12], многих белков бактерий и фибронектина поверхности клеток млекопитающих [13]. Недостатками грамицидина S и [⁵Ala]-индолицидина является их гемолитическая активность [14, 15].

Присоединение остатка гемина к грамицидину S было осуществлено двумя способами – действием 6(7)-моно-N-окси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимидного эфира гемина (HemONb) (2) на грамицидин S (1) или путем активации карбоксильных групп гемина 3 ди-*трет*-бутилпиروкарбонатом (Boc₂O) в присутствии пиридина с последующим ацилированием грамицидина S полученным активированным комплексом (схема 1).

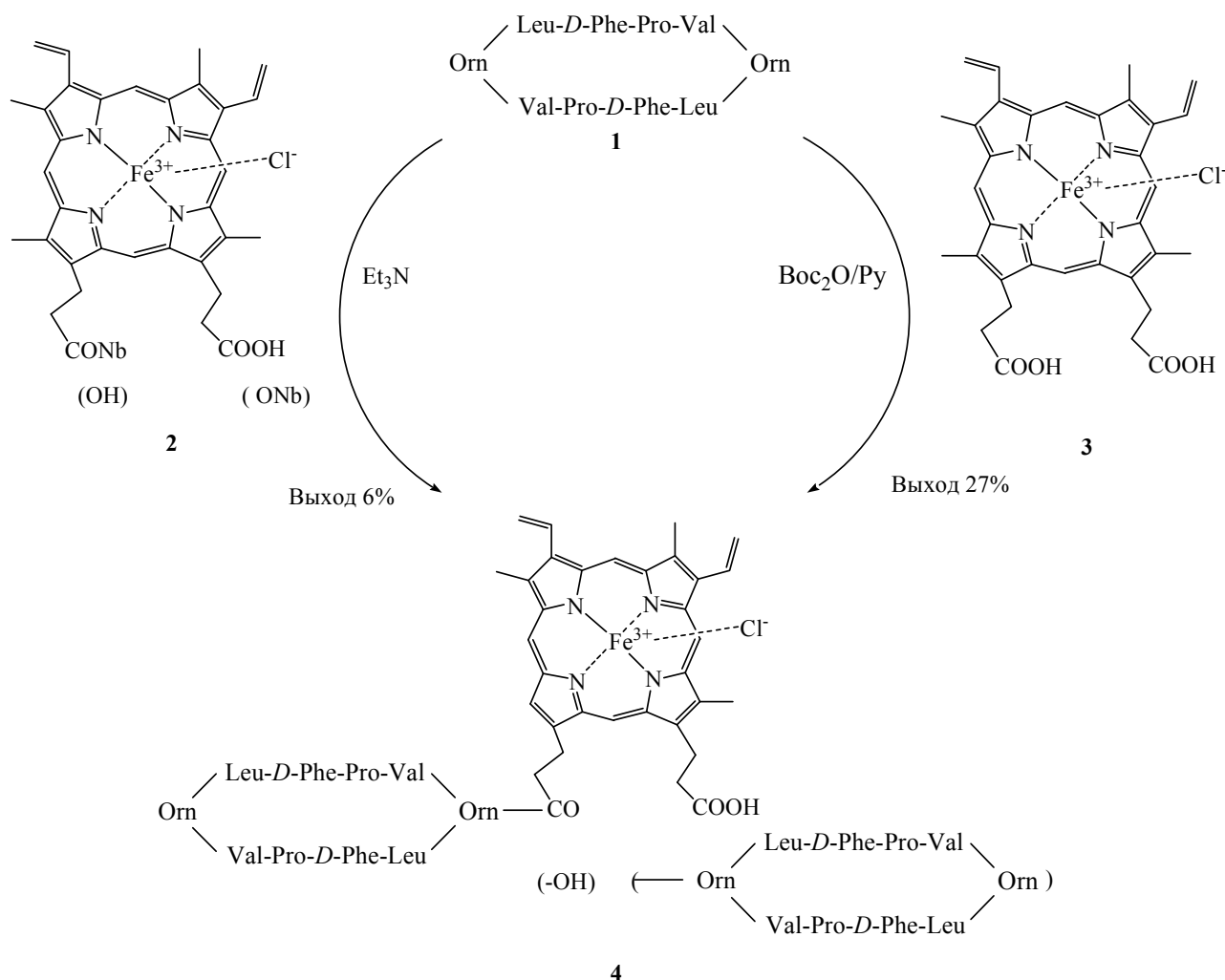


Схема 1

Второй подход оказался предпочтительнее, поскольку при его использовании был достигнут больший выход целевого продукта 4. Кроме того, при ацилировании грамицидина S HemONb, судя по данным масс-спектрометрии, протекают побочные реакции, а именно ацилирование второй аминогруппы грамицидина S остатком гемина, а также образование полимерных продуктов,

обусловленное наличием в исходном норборненовом эфире гемина 2 примеси 6,7-бис-N-окси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимидного эфира гемина. При активации карбоксильных групп гемина Boc₂O в присутствии пиридина образования продуктов сополимеризации гемина и грамицидина S не наблюдалось.

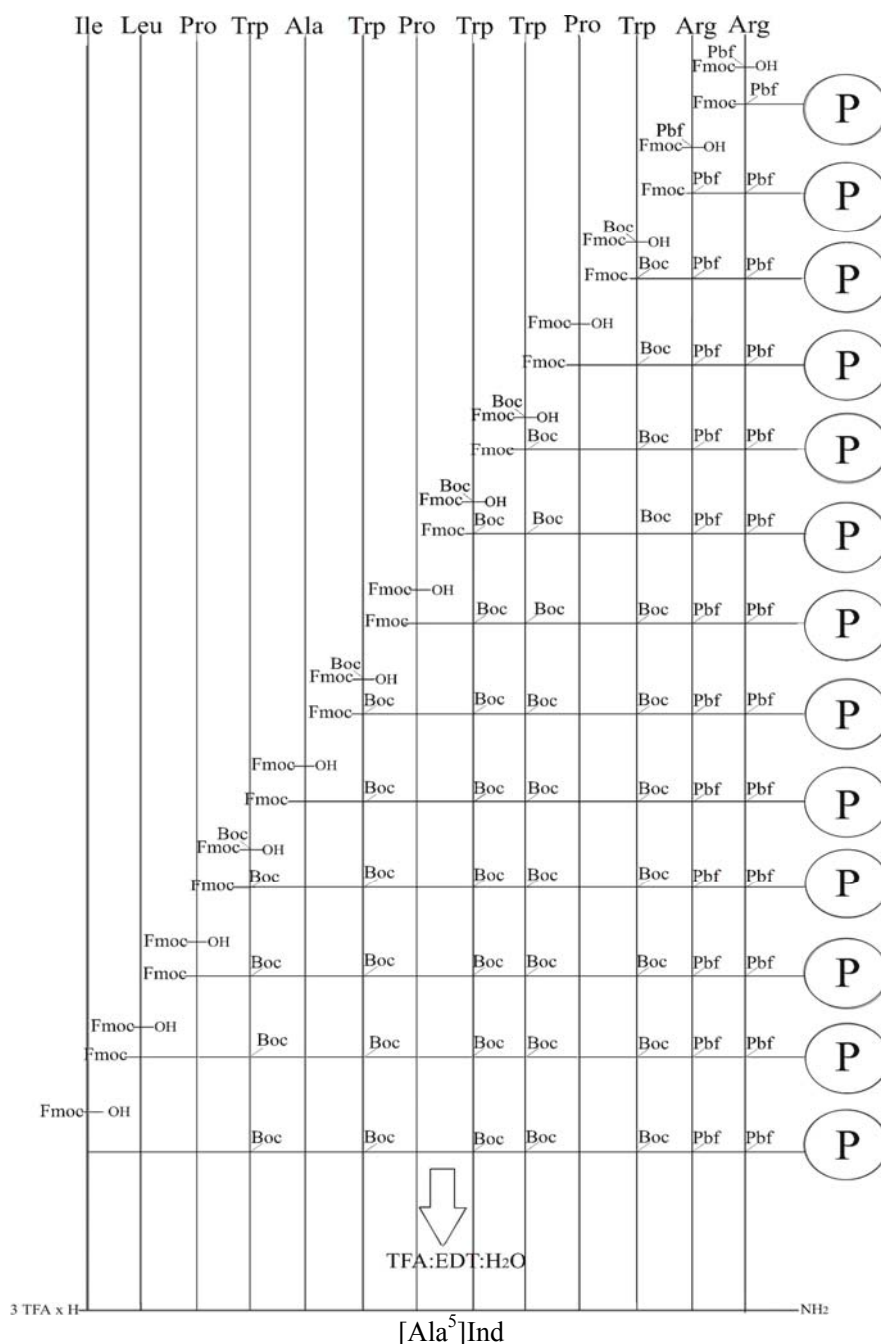


Схема 2. Схема твердофазного синтеза пептида [Ala⁵]-индолицидина (P – Ринк-амидный полимер).

Пептид [Ala⁵]-индолицидин **5** был синтезирован твердофазным методом по стандартной Fmoc-стратегии на Ринк-амидном полимере (схема 2). Активация карбоксильного компонента осуществлялась диизопропилкарбодиимидом (DIC) в присутствии 1-гидроксибензотриазола (HOBt) в качестве нуклеофильной добавки. Защита боковых функциональных групп аминокислот была выбрана с учетом их конечного деблокирования трифторуксусной кислотой. Для защиты гуанидиновых групп остатков аргинина использовали 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонильную группу (Pbf), для защиты индольных групп триптофана – *tert*-бутилоксикарбонильную группу (Boc).

Очистку аналога индолицидина [Ala⁵]Ind проводили с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе. Его чистота составила 98%. Пептид индивидуален по данным аналитической ВЭЖХ (рис. 1), а его молекулярная масса, по данным масс-спектрометрии, соответствовала расчетной.

Ацилирование [Ala⁵]-индолицидина HemONb гладко протекает в диметилформамиде в присутствии триэтиламина с образованием конъюгата **6** (схема 3). Наибольшую трудность в синтезе конъюгата **6** представляет отделение продукта от примеси гемина, содержащейся в исходном HemONb. После удаления растворителя в вакууме целевой продукт отделяли от гемина экстракцией метанолом из сухого остатка реакционной смеси.

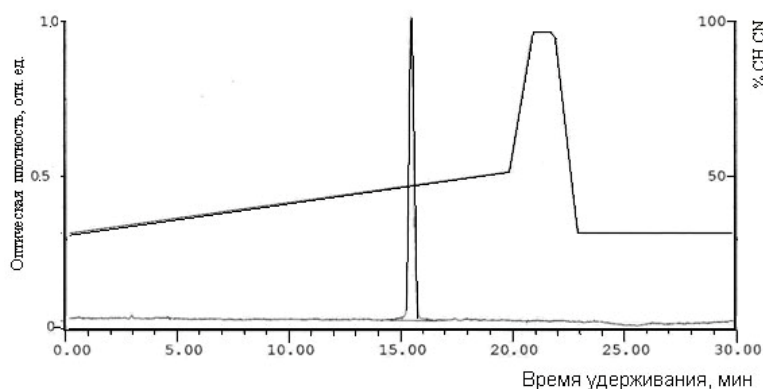


Рис. 1. Аналитическая ВЭЖХ-хроматограмма пептида [Ala⁵]Ind (условия см. Экспериментальную часть).

Синтез входящего в состав конъюгата **14** трипептида Arg-Gly-Asp (**11**) с более высоким выходом, по более простой и экономически целесообразной методике, нежели предложенные к настоящему времени, представляет самостоятельный научный интерес. Исторически первый способ синтеза Arg-Gly-Asp [16] предполагал получение целевого пептида по схеме [1+2] с использованием N^α,N^ω-ди-(бензилоксикарбо-

нил)аргинина и дибензилового эфира аспарагиновой кислоты. Недостатком метода является применение в качестве исходного реагента указанного производного аргинина. Известно, что в таком соединении гуанидиновая группа аргинина защищена недостаточно, что может приводить к образованию побочных продуктов в синтезах с его использованием [17].

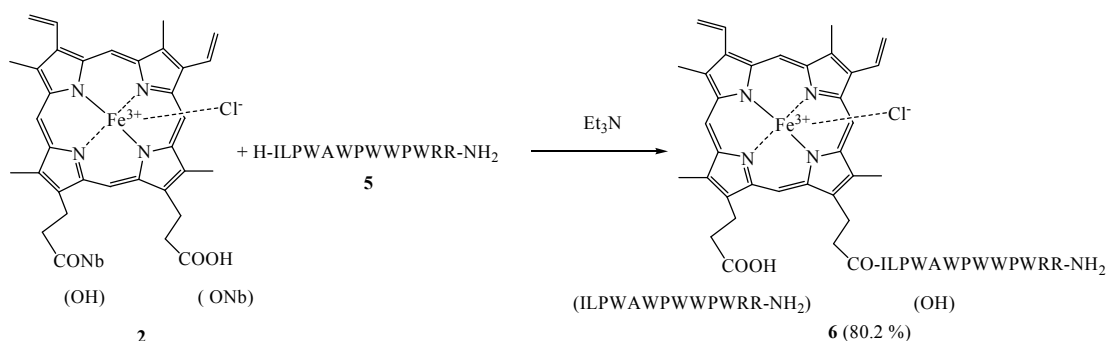


Схема 3

Выход целевого трипептида Arg-Gly-Asp, полученного способом [16], был сравнительно низким и составил 21%, считая на исходный реагент. Известен другой способ синтеза трипептида Arg-Gly-Asp в растворе по схеме [2+1] с использованием исходных реагентов Z-Arg(NO₂)-OH, H-Gly-OEt и H-Asp(OBzl)-OBzl [18]. Данный подход позволил повысить суммарный выход целевого пептида до 41%. В то же время, существенным недостатком этого метода является использование N^ω-нитропроизводного аргинина, отличающегося неполным блокированием гуанидиновой функции аргинина нитрогруппой. Кроме того, известно, что отщепление гидрогенолизом N^ω-нитрогруппы не всегда бывает удовлетворительным [17]. Предусмотренное в данной схеме синтеза омыление Z-Arg(NO₂)-Gly-OEt представляет собой нежелательное жесткое воздействие на дипептид, которое может приводить к рацемизации и частичной деструкции пептидной связи. Применение переносного гидрирования в присутствии палладиевой черни удлиняет и удорожает стадию конечного деблокирования целевого трипептида

Arg-Gly-Asp.

Ключевой проблемой синтеза пептида **11** является присоединение глицина к N^α,N^ω-защищенному производному аргинина. Свободный глицин нерастворим в органических растворителях, а применение эфиров глицина предполагает нежелательное жесткое воздействие на пептид при их отщеплении. Эта проблема нами была решена применением бис-(N,O)-триметилсилильного производного глицина **7** (схема 4), получаемого с количественным выходом действием на глицин бис-(N,O)-триметилсилилацетамида (BSA) в хлористом метиле при слабом нагревании. Присоединение N^α,N^ω,N^ω-три-(бензилоксикарбонил)аргинина к соединению **7** было с высоким выходом осуществлено методом смешанных ангидридов с использованием этилхлорформиата. При этом наличие триметилсилильной группы на аминогруппе не препятствует ацилированию последней активированным производным N^α,N^ω,N^ω-три-(бензилоксикарбонил)аргинина [19]. Снятие TMS-защиты с C-конца полученного дипептида осуществляется действием метанола и протекает с количественным выходом.

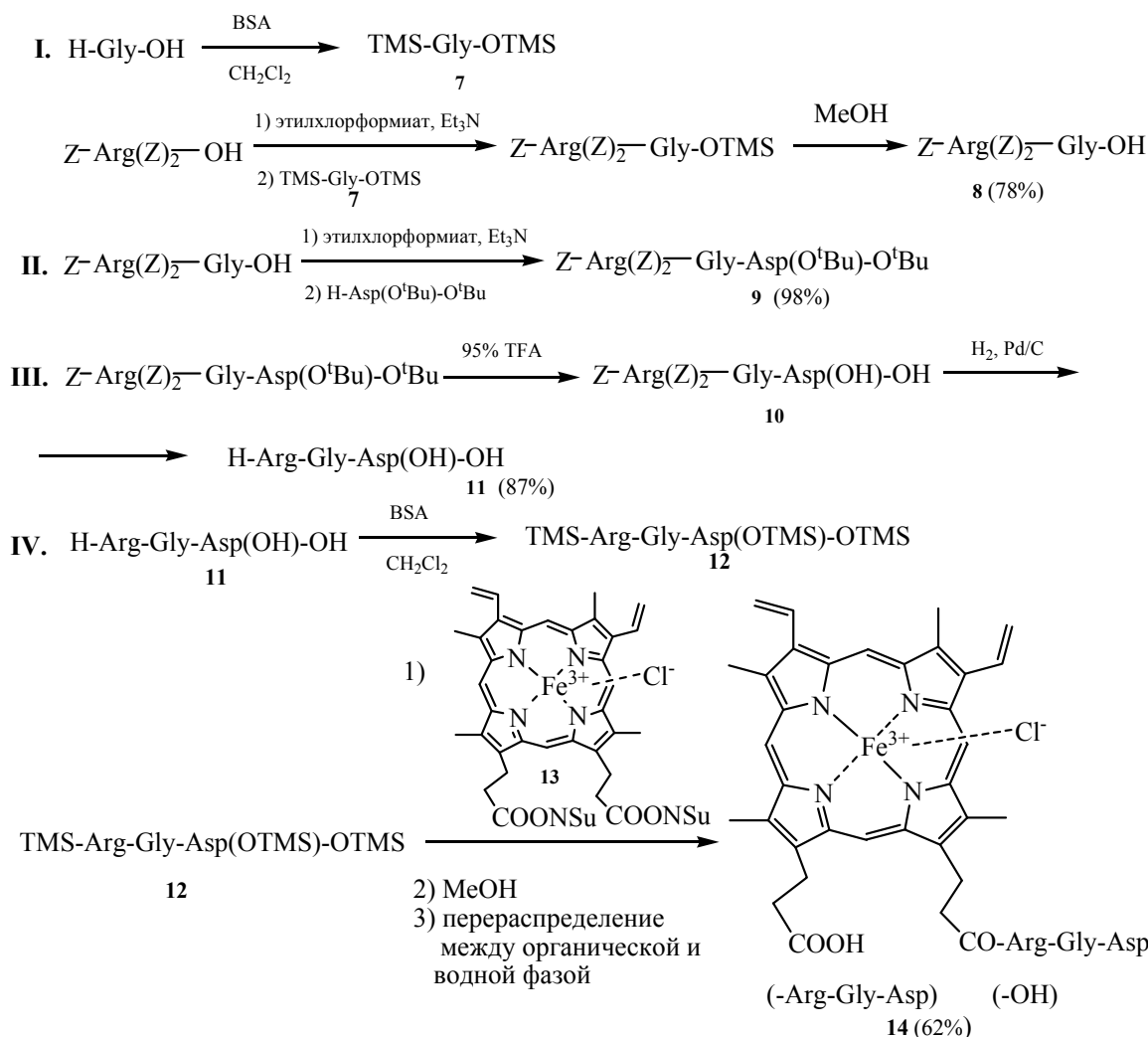


Схема 4

Таким образом, предложенный нами способ позволяет повысить выход целевого продукта – трипептида **11** до 67%, упростить процесс, в частности, исключить стадию омыления дипептида, уменьшить время гидрогенолиза и сделать процесс более экономически целесообразным в результате замены палладиевой черни на 10% палладий на угле. Двухстадийное снятие боковых защитных групп, Z и ^tBu, хотя и увеличивает количество стадий процесса, является необходимой мерой, поскольку в случае применения для блокирования карбоксильных групп аспарагиновой кислоты защитных групп, удаляемых каталитическим гидрированием, полностью защищенный трипептид будет нерастворим в содержащих воду смесях, применяемых для каталитического гидрогенолиза.

Синтез конъюгата **14** представляет известные затруднения вследствие нерастворимости в органических растворителях трипептида **11**. Эта проблема, а также проблема защиты карбоксильных групп трипептида **11** была решена получением растворимого в диметилформамиде триметилсилильного производного пептида **12** действием BSA. Как известно, наличие

триметилсилильной группы на аминогруппе не препятствует ацилированию последней N-оксисукцинимидным эфиром карбоксильного компонента [20]. При этом, образования продукта присоединения пептида Arg-Gly-Asp по двум карбоксильным группам гемина не происходило, возможно, вследствие высокой пространственной затрудненности силилированного пептида. Непрореагировавший N-оксисукцинимидный эфир, по-видимому, омыляется при переводе вещества в водную фазу действием 0.1 М раствора карбоната натрия.

Исследование биологической активности пептидных конъюгатов гемина *in vitro*

Нами была исследована антибактериальная и вирулицидная активность синтезированных соединений **4**, **6** и **14** в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* 209P, *Enterococcus faecalis* BKM B-871, *Micrococcus luteus* BKM Ac-2230 и *Bacillus subtilis* BKM B-501 (табл. 1), а также вирулицидная активность в отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) (табл. 2).

Как видно из табл.1, присоединение остатка гемина к N-концевой аминогруппе [Ala⁵]-

индолицидина (соединение **6**) и к γ -аминогруппе орнитина, входящего в состав грамицидина S (соединение **4**), приводит к выра-

женному снижению антибактериальной активности соответствующих конъюгатов по сравнению с немодифицированными пептидами.

Таблица 1. Антибактериальная активность пептидных производных гемина.

Соединение	<i>Staphylococcus aureus</i> 209P		<i>Enterococcus faecalis</i> BKM B-871		<i>Micrococcus luteus</i> BKM Ac-2230		<i>Bacillus subtilis</i> PAO1	
	МИК, мкМ	МБК, мкМ	МИК, мкМ	МБК, мкМ	МИК, мкМ	МБК, мкМ	МИК, мкМ	МБК, мкМ
4	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
6	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
14	12.5	50	100	>200	50	200	12.5	25
Гемин	100	200	1000	>1000	12.5	25	12.5	50
Грамицидин S*	3.3	3.3	1.6	3.3	6.5	6.5	1.6	3.3
[Ala⁵]Ind**	6.0	***	-	-	-	-	-	-

* Данные [21], **Данные [14], *** Данные отсутствуют.

Таблица 2. Вирулицидная активность синтезированных соединений в отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2).

Исходный титр вируса 4.0 lg.

Соединение	10 ⁻⁴ М		10 ⁻⁵ М	
	0.5 ч	1 ч	0.5 ч	1 ч
4	4.0	2.0	4.0	3.0
6	4.0	4.0	4.0	4.0
14	4.0	4.0	4.0	4.0
Гемин	4.0	4.0	4.0	4.0

Известно, что активность грамицидина S в отношении бактерий крайне чувствительна к модификациям аминокислот остатка орнитина, которые, как правило, приводят к снижению антибактериальной активности [21], при этом данные о введении в молекулу грамицидина S остатков порфиринов в литературе отсутствуют. Падение антимикробной активности конъюгата гемина с [Ala⁵]-индолицидином **6**

может объясняться изменением конформации этого пептида в липидной мембране в результате присоединения гемина. С другой стороны, конъюгат гемина с коротким пептидом RGD продемонстрировал более высокую антибактериальную активность, нежели сам гемин, при отсутствии антимикробной активности у пептида RGD.

Как известно [23], некоторые производные гемина обладают вирулицидной активностью, поэтому нами было предпринято исследование активности синтезированных соединений в отношении вируса гриппа H3N2. В результате оказалось, что соединение **4** обладает выраженной вирулицидной активностью, хотя ни гемин, ни грамицидин S не обладают активностью в отношении вируса гриппа. В то же время, соединения **6** и **13** оказались неактивны в отношении вируса H3N2.

Таблица 3. Токсическая активность синтезированных соединений в отношении лейкоцитов и эритроцитов человека.

Соединение	Гибель лейкоцитов в присутствии вещества в концентрации 1 мМ, %	Гемолиз эритроцитов в присутствии вещества в концентрации 100 мкМ, %
4	14±2	2±2
6	6±0.3	0
13	8.6±0.4	4±0.2
Гемин	40±2	20±4
Грамицидин S	-*	100
[Ala⁵]Ind	-*	100**

* Данные отсутствуют

** Данные [14]

С целью изучения влияния присоединения остатка гемина на токсичность и гемолитическую активность АМП, нами было изучено действие полученных конъюгатов на лейкоциты и эритроциты человека. При этом оказалось, что все синтезированные конъюгаты демонстрируют значительно меньшую токсичность в отношении лейкоцитов, нежели входящие в их состав анти-

микробные пептиды и гемин (табл. 3).

Выводы

Исходя из вышеизложенного, нами был сделан вывод о том, что конъюгация АМП с геминном приводит к изменению профиля биологической активности АМП. Так, конъюгат гемина с пептидом RGD продемонстрировал заметную антимикробную активность, не-

свойственную этому пептиду и заметно превосходящую антимикробную активность гемина; модификация грамицидина S гемином привела к появлению выраженной вирулицидной активности полученного конъюгата, при том, что данный вид активности для грамицидина S не описан. В то же время, модификация гемином АМП приводит к радикальному снижению токсичности в отношении лейкоцитов. Таким образом, для поиска высокоэффективных и нетоксичных биоцидных агентов представляется целесообразным дальнейший синтез и исследование АМП, модифицированных гемином.

Экспериментальная часть

В работе использовались аминокислоты и их производные L-ряда фирмы «Bachem» (Германия), «Reanal» (Венгрия), грамицидин S (Красфарма, Россия), DIC, трифторукусная кислота, NOBT, 1,2-этандитиол, Et₃N, 4-метилпиперидин, (Fluka, Германия), этилхлорформиат, Вос₂O, BSA, Pd/C (Sigma, Германия). В качестве носителей для пептидного синтеза применялся 4-(2',4'-диметоксифенилфлуоренил)метоксикарбониламинометил)феноксамидный (Ринк-амидный) полимер, сшитый дивинилбензолом (1%) (Iris Biotech, Германия), содержащий 0.1 ммоль/г активных аминогрупп.

Все растворители безводные, за исключением тех, которые использовались для экстракции из водных растворов. Индивидуальность полученных соединений проверяли методом ТСХ на пластинах Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) в системах: хлороформ-метанол-аммиак, 5:3:0.5 (1), хлороформ – метанол, 9:1 (2), хлороформ – метанол, 4:1 (3), метанол – уксусная кислота – вода, 4:1:1 (4). Хроматограммы проявляли хлортолидиновым реактивом, нингидрином или УФ-светом.

Масс-спектры высокого разрешения получали на время-пролетном масс-спектрометре «Ultraflex» («Bruker», Германия) методом матричной лазерно-десорбционной ионизации (TOF MALDI), в качестве матрицы использовалась 2,5-дигидроксibenзойная кислота.

ИК-спектры регистрировали на Фурье-спектрометре «Magna 750» («Nicolet», США).

Электронные спектры регистрировали на спектрофотометре «Jasco» модель UV/VS 7800 (Япония).

Аналитическую ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Gilson 305 (Gilson, Франция) в условиях: колонка Luna 5u (4.6 x 250 мм), обращенная фаза C5, средний диаметр пор сорбента 5 мкм (Phenomenex, США) в градиенте ацетонитрила в 0.1% раствора TFA в воде от 30 до 50%, 1%/мин, скорость потока 0.5 мл/мин, детекция при 220 нм (5). Препаративную ВЭЖХ осуществляли в условиях: колонка Luna 10u (25 x 250 мм), обращенная фаза C5, средний диаметр пор сорбента 10 мкм (Phenomenex, США)

в градиенте ацетонитрила в 0.1% растворе TFA в воде от 30 до 50%, 1%/мин, скорость потока 8 мл/мин, детекция при 254 нм (6).

Исследования антибактериальной активности ПГ, а также влияния ПГ на лейкоциты и эритроциты человека проводились в ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Изучение вирулицидной активности ПГ проводилось в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

6(7)-Моно-N-окси-5-норборнен-2,3-дикарбоксиимидный эфир протогемина IX (2). К раствору 0.35 г (0.54 ммоль) протогемина IX в 4.5 мл DMF прибавляли 0.1 г (0.54 ммоль) N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксиимида. К раствору при охлаждении до -10°C и перемешивании прибавляли по каплям в течение 6 ч раствор 0.11 г (0.54 ммоль) дициклогексилкарбодиимида (DCC) в 2 мл DMF. Реакционную смесь оставляли на 16 ч при 0°C, затем перемешивали 3 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок дициклогексилмочевины (DCU) отделяли фильтрованием. Продукт трижды промывали диэтиловым эфиром. В осадке получали смесь соединений с R_f(осн, моно-норборненовый эфир протогемина IX) 0.3, R_f(минор, протогемин IX) 0.1, R_f(следов., бис-норборненовый эфир протогемина IX) 0.65 (1).

6(7)-Моно-[цикло-(Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val)₂]-протогемин (IX) (4). К раствору 50 мг (0.077 ммоль) гемина 3 в 0.5 мл сухого DMF прибавляли 1 мл пиридина и 25.3 мг (0.116 ммоль) Вос₂O и перемешивали 15 мин при комнатной температуре. Одновременно к суспензии 93.5 мг (0.077 ммоль) дихлоргидрата грамицидина S (1) в 0.5 мл DMF прибавляли 22 мкл (0.154 ммоль) триэтиламина и перемешивали 2 мин.

К полученному смешанному ангидриду гемина прибавляли раствор аминоксвободного грамицидина S и перемешивали 3 ч. Растворитель удаляли в вакууме при температуре 30°C. Остаток растворяли в хлороформе. Остаток очищали на колонке (30x2 см) с силикагелем Kieselgel 60 (Merck, Германия), элюировали смесью CHCl₃-MeOH, 12:1. Выход 36 мг (27%). Масс-спектр, m/z: 1757.5 [M]⁺ (вычислено 1757.2). Электронный спектр, CHCl₃-MeOH (4:1), λ_{max}, нм, (ε·10⁻³): 400.0 (92.2), 492 (1.06), 600 (0.60). ИК-спектр, таблетка KBr, ν, см⁻¹: 1738 (СО сл.эф.), 1645 (амид I), 1527 (амид II).

[Ala⁵]-Индолицидин (5) Синтез осуществляли, исходя из 250 мг Ринк-амидного полимера с содержанием аминогрупп 0.1 ммоль/г. Методика присоединения первой аминокислоты к Ринк-амидному полимеру аналогична методике присоединения последующих аминокислот.

Для наращивания пептидной цепи использовали следующие операции для каждого

синтетического цикла (присоединения одной аминокислоты):

1. Инкубация пептидил-полимера с 20% 4-метилпиперидином в DMF - 2×10 мин.

2. Промывка DMF - 8×2 мин.

3. Конденсация с 10 экв. (по отношению к количеству активных аминогрупп на полимере) Fmoc-аминокислоты в присутствии 0.001 экв. индикатора бромфенолового синего, 12 экв. HOBT и 10 экв. DIC.

4. Промывка DMF 5×1 мин.

Объем одной промывки 2 мл/100 мг полимера.

Содержание непрореагировавших аминогрупп контролировали визуально по окрашиванию pH-зависимого индикатора бромфенолового синего, который при уменьшении pH среды меняет окраску с синей на желтую.

При отщеплении пептида от Ринк-амидного полимера на С-конце образуется амид. Отщепление от полимера с одновременным деблокированием боковых функциональных групп проводили смесью TFA-H₂O-EDT, 95:2.5:2.5. Суспензию перемешивали в течение 2 ч. Раствор пептида в TFA отфильтровывали от полимера. Продукт осаждали охлажденным диэтиловым эфиром (из расчета 10-12-ти-кратного избытка эфира по объему), отфильтровывали и промывали дважды эфиром для отделения остатков скэвенджеров и побочных продуктов деблокирования. После этого пептид лиофилизировали из смеси H₂O-*t*-BuOH, 1:5. Пептид выделяли методом офВЭЖХ в условиях (6). Выход 12 мг (75% в расчете на исходную аминокислоту на полимере). Масс-спектр, *m/z*: 1849.17 [M]⁺ (вычислено 1849.52). ВЭЖХ (5): индивидуальный пик, время удерживания 15.5 мин.

6(7)-Моно-[Ala⁵]Ind-протогемин (IX) (6). К 0.006 г (0.0028 ммоль) [Ala⁵]Ind **5** приливали 0.32 мл (0.0028 ммоль) 6(7)-моно-N-окси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимидного эфира протогемина IX (**2**) в DMF, прибавляли 1.2 мкл (0.0084 ммоль) Et₃N до pH 7.5 и перемешивали 24 ч. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ в системе (3). Из реакционной смеси прибавлением 3 мл диэтилового эфира осаждали целевой продукт с примесями гемина и ONb-эфира гемина (*R_f* 0.2, 0.4 и 0.8 (3) соответственно). Раствор декантировали. К осадку приливали 3 мл MeOH, выпавший темно-коричневый осадок гемина и ONb-эфира гемина отделяли центрифугированием. Супернатант отделяли, растворитель удаляли в вакууме. Твердый остаток, содержащий целевое вещество и гемин, растворяли в бутаноле и промывали 0.5 N раствором HCl, насыщенным раствором NaCl и трижды водой. Органический слой фильтровали, растворитель удаляли в вакууме. Выход 6.4 мг (80.2%). *R_f* 0.2 (3). Электронный спектр, MeOH, λ_{max}, нм (ε×10⁻³,

M⁻¹cm⁻¹): 400.6 (19.9), 493.4 (2.15), 599.0 (1.06). Масс-спектр, *m/z*: 2447.46 [M]⁺ (вычислено 2446.5). ИК-спектр, таблетка KBr, ν, см⁻¹: 1634 (амид I), 1565 (амид II).

H-Arg-Gly-Asp·CH₃COOH·CF₃COOH (11)

а) Трибензилоксикарбонил-аргинил-глицин (8). Смесь 0.043 г (0.573 ммоль) глицина, 0.4 мл (1.6 ммоль) бис-(O,N-триметилсилил)ацетамида (BSA) в 1 мл безводного хлористого метилена интенсивно перемешивали без доступа воздуха при 40°C до полного растворения глицина. Одновременно к раствору 0.3 г (0.52 ммоль) Z-Arg(Z)₂-OH и 80 мкл (0.6 ммоль) триэтиламина в 2 мл безводного хлористого метилена, охлажденному до -15°C, прибавляли 55 мкл (0.57 ммоль) этилхлорформиата и смесь перемешивали при -15°C в течение 15 мин. К образовавшемуся смешанному ангидриду прибавляли полученный ранее бис-(триметилсилил)глицин, и реакционную смесь перемешивали при -15°C 1.5 ч. Растворитель удаляли в вакууме. Остаток растворяли в этилацетате, промывали 10% водным раствором лимонной кислоты и водой. Органический слой сушили сульфатом натрия и этилацетат удаляли в вакууме. Выход 0.224 г (78%). *R_f* 0.25 (1). Масс-спектр, *m/z*: 634.8 [M]⁺ (вычислено 633.2). ИК-спектр, таблетка KBr, ν, см⁻¹: 1637 (амид I), 1540 (амид II), 1747 (COOH). Элементный анализ: найдено, %: C 60.48; H 5.56; N 10.67, вычислено, %: C 60.66; H 5.57; N 11.05. ¹H-ЯМР-спектр (DMSO-*d*₆), δ, м.д.: 1.42-1.53 (4H, м, β-CH₂, Arg, ε-CH₂, Arg), 2.42 (2H, п, J=4.5 Гц, γ-CH₂, Arg), 3.80 (2H, с, CH₂, Gly), 3.97 (1H, т, J=6 Гц, α-CH, Arg), 4.92 (2H, с, α-CH₂, Cbz), 4.96 (2H, с, α-CH₂, Z), 5.14 (2H, с, α-CH₂, Z), 7.24 (15H, м, аром. Z).

б) Трибензилоксикарбонил-аргинил-глицил-ди-(O-трет-бутил)-аспарагиновая кислота (9). К раствору 0.2 г (0.32 ммоль) N^α-трибензилоксикарбонил-аргинил-глицина в 1 мл безводного хлороформа прибавляли при -10°C 45 мкл (0.32 ммоль) триэтиламина и 30 мкл (0.32 ммоль) этилхлорформиата. Через 15 мин в реакционную смесь вносили 90 мг (0.32 ммоль) гидрохлорида ди-(O-трет-бутил)-аспарагиновой кислоты в 1 мл DMF, содержащего 45 мкл (0.32 ммоль) триэтиламина. Смесь перемешивали 2 ч. Осадок солей удаляли фильтрованием, растворитель удаляли в вакууме. Остаток растворяли в этилацетате и промывали водой. Органический слой сушили сульфатом натрия, этилацетат удаляли в вакууме, продукт кристаллизовали из смеси этилацетат-петролейный эфир, 1:1. Выход 0.27 г (98%). *R_f* 0.8 (2). Масс-спектр, *m/z*: 879.4 [M]⁺ (вычислено 879.9). ИК-спектр, таблетка KBr, ν, см⁻¹: 1644 (амид I), 1539 (амид II), 1722 (CO сл. эфир). Элементный анализ: найдено, %: C 60.55; H 6.58; N 8.85, вычислено, %: C 61.38; H 6.56; N 9.26. ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃), δ, м.д.: 1.34 (9H,

с, трет-бутил), 1.37 (9H, с, трет-бутил), 1.64–1.71 (4H, м, β -CH₂, Arg, ϵ -CH₂, Arg), 2.69 (2H, д, J=5.4 Гц, β -CH₂, Asp), 3.43 (2H, п, J=4.5 Гц, γ -CH₂, Arg), 3.95 (1H, т, J=7.2 Гц, α -CH, Asp), 4.56 (1H, т, J=8.1 Гц, α -CH, Arg), 5.04 (2H, с, α -CH₂, Z), 5.11 (2H, с, α -CH₂, Z), 5.16 (2H, с, α -CH₂, Z), 6.24 (2H, с, CH₂, Gly), 7.3 (15H, м, аром. Z).

в) Деблокирование боковых функций трипептида Arg-Gly-Asp

1) Удаление трет-бутильных защитных групп остатка аспарагиновой кислоты

К 0.2 г (0.23 ммоль) пептида **9** приливали 2 мл смеси TFA-H₂O, 95:5. Раствор перемешивали 4 ч. Продукт осаждали 10-ти-кратным избытком охлажденного безводного диэтилового эфира, отфильтровывали и промывали дважды эфиром. Выход 0.17 г (98%). R_f 0.4 (2).

2) Удаление N^α-N^G-Z-защитных групп остатка аргинина

К 0.15 г (0.2 ммоль) трибензилокси-карбонил-Arg-Gly-Asp приливали 8 мл смеси метанол-уксусная кислота-вода, 6:1:1. К раствору прибавляли 0.1 г 20% палладия на активированном угле и гидрировали при комнатной температуре 1 ч, контролируя ход реакции ТСХ в системе (4). После окончания реакции катализатор отфильтровывали, промывали водой, растворитель удаляли в вакууме при 40°C. Выход 0.06 г (87%). R_f 0.4 (4). Масс-спектр, m/z: 347.0 [M]⁺ (вычислено 347.6). ВЭЖХ (5): время удерживания 6.83 мин.

6(7)-Бис-N-оксисукцинимидный эфир протогемина IX (13). К раствору 0.5 г (0.77 ммоль) протогемина IX (**2**) в 10 мл DMF прибавляли 0.444 г (3.85 ммоль) N-гидроксисукцинимид и 0.79 г (3.85 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°C, затем 16 ч при комнатной температуре. При этом продукт частично выпадал в осадок. Осадок, содержащий продукт и DCU отделяли фильтрованием, продукт экстрагировали из осадка 8 мл DMSO. Фильтрат и экстракт объединяли и концентрировали в вакууме до объема 5 мл, выпавший осадок DCU отделяли фильтрованием, после чего продукт осаждали 40 мл диэтилового эфира. Осадок отделяли центрифугированием и промывали диэтиловым эфиром 3×40 мл, после чего высушивали в эксикаторе. Выход 0.554 г (85%). R_f 0.6 (2). ИК-спектр, таблетка KBr, ν, см⁻¹: 1735 (СО сл.эф.). Масс-спектр, m/z: 810.4 [M]⁺ (вычислено 810.9).

6(7)-Моно-(Arg-Gly-Asp)-протогемин (IX) (14). К суспензии 0.02 г (0.038 ммоль) H-Arg-Gly-Asp·CH₃COOH·CF₃COOH в 0.5 мл DMF добавляли 5 мкл (0.038 ммоль) триэтиламина и перемешивали 2 мин. Затем добавляли 62 мкл (0.251 ммоль) BSA и перемешивали при комнатной температуре 30 мин. В реакционную смесь вносили 0.032 г (0.038 ммоль) 6,7-бис-N-оксисукцинимидного эфира протогемина IX (**13**) и реакционную смесь перемешивали 6 ч.

Растворитель удаляли в вакууме, осадок растворяли в метаноле для десилилирования карбоксильных групп трипептида, затем разбавляли 0.1 М раствором карбоната натрия и отфильтровывали выпадающий осадок, фильтрат подкисляли соляной кислотой до нейтральной реакции и экстрагировали целевой продукт этилацетатом. Выход 0.02 г (62%). Масс-спектр, m/z: 981.3 [M]⁺ (вычислено 981.8). Электронный спектр, CHCl₃-MeOH, 4:1, λ_{max}, нм (ε·10⁻³): 403.0 (86.2), 485 (2.03), 608 (0.42). ИК-спектр, таблетка KBr, ν, см⁻¹: 1741 (СО сл.эф.), 1646 (амид I), 1525 (амид II).

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Для определения антимикробной активности веществ были использованы штаммы *Bacillus subtilis* ВКМ В-501, *Staphylococcus aureus* 209Р, *Enterococcus faecalis* ВКМ В-871, *Micrococcus luteus* ВКМ Ас-2230 (получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН). Бактерии выращивали в жидкой среде МН при 37°C, 100% влажности и перемешивании. Для тестирования использовали культуру в экспоненциальной фазе роста. Суспензию бактерий разбавляли средой МН до 5×10⁴–1×10⁵ КОЕ/мл и переносили в стерильный 96-луночный планшет по 100 мкл на лунку. Затем к клеткам добавляли исследуемые соединения, растворенные в воде или в DMSO и делали серийные двукратные разведения этих соединений в лунках планшета. Максимальная концентрация веществ в серии составляла 10⁻⁴ М, минимальная – 1.6×10⁻⁶ М. Исследование антибактериальной активности выполняли в 3 повторах для каждого соединения, а результат усредняли. Ингибирование роста бактерий оценивали через 20 ч инкубации клеток с веществами по оптической плотности, измеряемой в каждой лунке при длине волны 595 нм. За минимальную ингибирующую концентрацию принимали то наибольшее разведение, при котором оптическое поглощение культуры не увеличивалось за период инкубации.

Определение минимальной бактерицидной концентрации (МБК). Для определения МБК среду из лунок, в которых концентрация исследуемого соединения равнялась МИК, МИК×2 и МИК×4, переносили на чашки Петри с агаризованной средой МН (15 г/л агара) и равномерно растирали по площади чашек стерильными шпателями. Чашки инкубировали 2 сут. МБК определяли как наименьшую концентрацию исследуемого соединения, при которой не наблюдается роста колоний.

Исследование цитотоксической активности в отношении лейкоцитов человека. Суммарную фракцию лейкоцитов выделяли из крови человека методом свободной седимен-

тации, для чего использовали свежееотобранную венозную кровь здорового донора. Концентрацию лейкоцитов и эритроцитов в суспензии определяли подсчетом в камере Горяева, после чего суспензию доводили средой RPMI-1640 (без фенолового красного, с добавлением 10% фетальной телячьей сывотки и 20 мМ L-глутамина, далее – полная среда) до концентрации лейкоцитов $(1.0 \pm 0.1) \times 10^6$ клеток/мл. При этом концентрация эритроцитов в используемой для измерений суспензии клеток крови не превышала 30% от концентрации лейкоцитов. Клетки инкубировали с исследуемыми соединениями 3 ч (37°C , 5% CO_2 , 100% влажность). Гибель лейкоцитов оценивали при помощи флуоресцентной микроскопии. Для выявления мертвых и живых клеток использовали окрашивание йодистым пропидием (проникает только в ядра мертвых клеток) и Hoechst 33342 (окрашивает все ядра). Клетки инкубировали в планшетах 15 мин одновременно с йодистым пропидием и Hoechst 33342 (37°C , 5% CO_2), а затем планшеты помещали под микроскоп для анализа. Долю погибших клеток определяли по флуоресцентным изображениям клеток в синей (Hoechst 33342) и красной (йодистый пропидий) областях спектра, полученным при помощи флуоресцентного микроскопа Axio Observer (Zeiss, Германия) с 10× объективом («Plan-Neofluar» 10×/0.3). С помощью цифровой фотокамеры регистрировали три типа изображений клеток: а) в проходящем белом свете; б) флуоресцентное изображение в синей области спектра с ультрафиолетовым возбуждением; в) флуоресцентное изображение в красной области спектра с возбуждением зеленым светом. Фотографировали не менее 4 полей зрения на лунку в разных ее областях. Результат анализа усредняли по 1000-1500 клеток для каждой концентрации исследуемых соединений.

Методика определения гемолитической активности. Для определения гемолитической активности соединений кровь (100 мкл) отбирали из пальца здорового донора в пробирку, содержащую 0.9 мл среды RPMI-1640 (без фенолового красного) и гепарин (10 ед/мл). Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при $200 \times g$ и переносили в 10 мл полной среды. Плотность эритроцитов в суспензии определяли подсчетом в камере Горяева с помощью микроскопа «Микмед-2» (ЛОМО, Россия) и разбавляли полной средой до $(2 \pm 0.2) \times 10^7$ клеток/мл.

Методом последовательных разведений с шагом в 2 раза готовили серии растворов соединений в полной среде (максимальная концентрация 200 мкМ, минимальная – 1.6 мкМ, объем 75 мкл). К приготовленным растворам быстро добавляли 75 мкл суспензии эритроцитов с плотностью $(2 \pm 0.2) \times 10^7$ клеток/мл.

Все образцы (кроме положительного контроля) инкубировали в течение 3 ч при температуре 37°C , 5% CO_2 , 100% влажности и перемешивании со скоростью 150 об/мин. Затем все образцы центрифугировали в течение 5 мин при $2700 \times g$. В лунки 96-луночного планшета переносили по 130 мкл супернатанта из каждого образца. После чего с помощью фотометрического анализатора «Униплан» (Пикон, Россия) измеряли оптическую плотность в лунках планшета на длине волны 414 нм. Выход гемоглобина (ВГ) рассчитывали в процентах по оптической плотности (А) на длине волны 414 нм, используя формулу:

$$\text{ВГ} = [(A_{\text{эв}} - A_3) - (A_{\text{в}} - A_{\text{с}})] \times 100 / (A_{100} - A_3)$$

где $A_{\text{эв}}$ – поглощение супернатанта с эритроцитами после инкубации с исследуемым веществом в изучаемой концентрации, A_3 – поглощение супернатанта эритроцитов до добавления исследуемого соединения, $A_{\text{в}}$ – поглощение исследуемого вещества в изучаемой концентрации в среде, $A_{\text{с}}$ – поглощение среды, A_{100} – поглощение супернатанта образца с лизированными на 100% эритроцитами. Доля вышедшего гемоглобина равна доле лизированных эритроцитов при условии, что лизис происходит полностью, то есть при лизисе из эритроцита выходит весь содержащийся в нем гемоглобин.

Исследование гемолитической активности выполняли в 2 повторах для каждого соединения, а результат усредняли.

Исследование вирулицидного действия на интактные вирионы вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Вирусосодержащую жидкость с титром вируса 4.0 lg инкубировали при комнатной температуре в присутствии и в отсутствие препаратов. Экспозицию вируса гриппа с препаратами проводили в течение часа. Вирусосодержащий материал инкубировали в присутствии препарата в исследуемой концентрации и определяли величину снижения инфекционного титра вируса по сравнению с контролем – вирусом, инкубируемым в тех же условиях, но без препарата. Инфекционный титр вируса определяли путем заражения культур клеток. Перед инфицированием клетки дважды промывали средой Eagle без сыворотки для снижения неспецифической реакции. Инфицирование проводили 10-кратными разведениями проб вирусов с препаратами и без них на среде Eagle с добавлением трипсина (TPCK treated, Sigma). Адсорбцию вирусов проводили в течение 40-60 мин при 37°C . Несорбированный вирус удаляли 3-х-кратной промывкой средой Eagle без сыворотки. Контроли вирусов и клеток культивировали в клетках среде Eagle. Далее планшеты инкубировали в термостате в течение 48-72 ч при 37°C . Учет результатов проводили по определению гемагглютинирующей активности вируса гриппа

па в надосадочной жидкости в реакции гемагглютинации с человеческими эритроцитами 0 (1) группы.

Авторы благодарят сотрудников ИБХ РАН д.б.н. Феофанова В.А. за помощь в проведении

биоиспытаний и н.с. Егорову Н.С. за помощь в проведении твердофазного синтеза пептида [Ala]-индолицидина.

Работа выполнена при поддержке АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» 2.1.1/2889.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Giuliani, A. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics / A. Giuliani, G. Pirri, S. F. Nicoletto // *Centr. Europ. J. Biol.* – 2007. – Vol. 2, № 1. – P. 1–33.
2. Melo, M. N. Omiganan pentahydrochloride in the front line of clinical applications of antimicrobial peptides / M. N. Melo, D. Dugourd, M. A. Castanho // *Recent Patents Anti-Infect. Drug Disc.* – 2006. – Vol. 1, № 2. – P. 201–207.
3. Jenssen, H. Peptide antimicrobial agents / H. Jenssen, P. Hamill, R. E. W. Hancock // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2006. – Vol. 19, № 3. – P. 491–511.
4. Yeaman, M. R. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance / M.R. Yeaman, N. Y. Yount // *Pharmacol. Rev.* – 2003. – Vol. 55, № 1. – P. 27–55.
5. Powers, J.-P. S. The relationship between peptide structure and antibacterial activity / J.-P. S. Powers, R. E. W. Hancock // *Peptides.* – 2003. – Vol. 24. – P. 1681–1691.
6. Chemical modifications of short antimicrobial peptides from insects and vertebrates to fight multi-drug resistant bacteria / D. Knappe, A. Nimptsch, A. Jr. Kolobov [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2009. – Vol. 611. – P. 395–396.
7. Wessolowski, A. Antimicrobial activity of arginine- and tryptophan-rich hexapeptides: the effects of aromatic clusters, D-amino acid substitution and cyclization / A. Wessolowski, M. Bienert, M. Dathe // *J. Pept. Res.* – 2004. – Vol. 64. – P. 159–169.
8. Cyclization increases the antimicrobial activity and selectivity of arginine- and tryptophan-containing hexapeptides / M. Dathe, H. Nikolenko, J. Klose [et al.] // *Biochemistry.* – 2004. – Vol. 43, № 28. – P. 9140–9150.
9. Characterization of hemin antibacterial action on *Staphylococcus aureus* / Y. Nitzan, H. Ladan, S. Gozansky, Z. Malik // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1987. – Vol. 48, № 3. – P. 401–406.
10. Синтез и структурно-функциональные исследования в ряду искусственных нуклеаз на основе конъюгатов гемина с пептидными фрагментами фактора дифференцировки клеток HLDF / Г. А. Желтухина, Т. Н. Лобанова, В. Е. Небольсин, М. О. Галлямов, С. М. Драницына, И. А. Костянян // *Биоорг. химия.* – 2006. – Т. 32, № 2. – С. 198–210.
11. Пат. 2238950 РФ, МПК⁷ C07K14/805, C07D487/22, A61K31/40, A61K38/41, A61P31/18. Производные гемина и их фармацевтически приемлемые соли, способ получения, применение и фармацевтическая композиция / Р. П. Евстигнеева, Г. А. Желтухина, Т. В. Зарубина, В. Е. Небольсин, Д. Н. Носик, Н. Н. Носик; заявитель и патентообладатель Небольсин Владимир Евгеньевич. - № 2002111028/04; заявл. 25.04.2002; опубл. 27.10.2004, бюл. 35 – 23 с.
12. Kastin, A. J. Handbook of biologically active peptides / A. J. Kastin // London: Elsevier, Academic Press, 2006. – 576 p.
13. The novel fibronectin binding motif and key residues of micobacteria / N. Naito, N. Ohara, S. Matsumoto, T. Yamada // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 2905–2909.
14. Взаимосвязь структура–активность в ряду аналогов антибактериального пептида индолицидина. I. Синтез и биологическая активность аналогов с увеличенной амфипатичностью и повышенным общим положительным зарядом молекулы / М. П. Смирнова, В. М. Шпень, Ю. В. Тяготин, Н. И. Колодкин // *Биоорг. химия.* – 2004. – Т. 30, № 5. – С. 458–465.
15. Synthesis and biological evaluation of gramicidin S dimers / G. M. Grotenbreg, M. D. Witte, P. A. V. van Hooff [et al.] // *Org. Biomol. Chem.* – 2005. – Vol. 3. – P. 233–238.
16. Пат. GB2207922A, Великобритания, МПК⁷ C07K5/08; A61K37/02; C07K5/08; C07K99:00. Tripeptides with pharmacological properties / Brunetti B., Prada M.; заявитель и патентообладатель ELLEM IND FARMACEUTICA - № 8818447; заявл. 4.04.1987; опубл. 15.02.1989, бюл. 14 – 48 с.
17. Дж. Гринштейн. Химия аминокислот и пептидов, пер. с англ. / Дж. Гринштейн, М. Виниц – М.: Мир, 1965. – 586 с.
18. Optimized conventional synthesis of “RGD” and “RGDS” peptides and their sarcosine mimics as integrin GP IIb/IIIa anta-gonists / M. Abo-Ghaila, S. Abd El-Rahman, A. El-Kafrawy, A. Kalomuch // *Amino Acids.* – 2003. – Vol. 24. – P. 405–411.
19. Birkofer, L. Di Und Tripeptide und ihre Verwendung zu Peptidsynthesen / L. Birkofer, A. Ritter, P. Neuhausen // *Liebigs Ann.Chem.* – 1962. – Vol. 659. – P. 190–199.
20. Применение реакции силилирования в синтезе пептидов на основе α-лизина / Е. П. Крысин, В. Н. Карельский, А. А. Антонов, Э. Д. Глинка // *Химия природ. соединений.* – 1978. – Т. 4. – С. 482–485.
21. Rambhav, G. N. Gramicidin-S: Structure–activity relationship / G. N. Rambhav, S. Rambhav // *J. Biosci.* – 1985. – Vol. 7, № 3 & 4. – P. 323–329.
22. β-Turn modified gramicidin S analogues containing arylated sugar amino acids display antimicrobial and hemolytic activity comparable to the natural product / G. M. Grotenbreg, A. E. M. Buizert, A. L. Llamas-Saiz [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128. – P. 7559–7565.
23. Synthetic hemine-derivatives as virulicide agents and a base for their rational designing / G. A. Zheltukhina, N. N. Nossik, S. L. Zheltukhin, V. E. Nebolsin // *J. Porphyrins and Phthalocyanines.* – 2008. – Vol. 12. – P. 793.