

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії

проф. Рябухін Сергій Вікторович

Протокол №\_\_\_ засідання кафедри

від «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 р.

**Синтез нових похідних Граміцидину S**

Випускна кваліфікаційна робота магістра  
студента спеціальності 102 Хімія

ОП «Хемоінформатика»

**Главіна Антона Борисовича**

Науковий керівник від кафедри

Професор кафедри супрамолекулярної хімії

д.х.н., професор **Комаров Ігор Володимирович**

Робота виконана під керівництвом

к.х.н. **Харченка Сергія Григоровича**

Оцінка захисту роботи

---

Київ - 2023р

## Анотація

Антимікробні циклічні пептиди часто є дуже ефективним засобом для боротьби з різними бактеріальними інфекціями. Граміцидин S є одним із перших антибіотиків, які були відкриті та досліджені людиною та використовувався як лікарський засіб у часи Другої світової війни. Однак, цю сполуку перестали використовувати як антибіотик через токсичну дію на клітини крові. Нещодавні дослідження показують, що багато міметиків Граміцидину S здатні проявляти покращену біологічну активність та проявляють селективність щодо клітин мікробів відносно клітин крові. Це показує можливість отримання принципово нового сильного антибактеріального засобу на основі широко відомого циклічного пептиду.

**Ключові слова:** антимікробні циклічні пептиди, бактеріальні інфекції, міметики Граміцидину S

Antimicrobial cyclic peptides are often very effective against a variety of bacterial infections. Gramicidin S is one of the first antibiotics to be discovered and studied by humans and was used as a drug during World War II. However, this compound is not used now as an antibiotic due to its toxic effect on blood cells. Recent studies show that many Gramicidin S mimetics are able to exhibit improved biological activity and show selectivity for microbial cells over blood cells. This shows a possibility of obtaining a fundamentally new strong antibacterial agent based on the widely known cyclic peptide.

**Keywords:** antimicrobial cyclic peptides, bacterial infections, mimetics of Gramicidin S

## Зміст

<b>Вступ</b> .....	7
Розділ 1. Огляд літератури.....	8
1. Властивості циклічних пептидів.....	8
1.1 Загальна характеристика.....	8
1.2 Антибактеріальні властивості.....	11
1.3 Методи отримання циклічних пептидів.....	13
2. Загальна характеристика Граміцидину S.....	19
2.1 Властивості Граміцидину S.....	19
2.2 Механізм дії Граміцидину S.....	21
3. SAR міметиків Граміцидину S.....	23
3.1 Залежність активності пептиду від кількості залишків амінокислот у послідовності.....	23
3.2 Залежність активності від фізико-хімічних властивостей залишків амінокислот.....	25
3.3 Залежність активності від вторинної структури міметиків Граміцидину S.....	27
Розділ 2. Обговорення результатів.....	31
Розділ 3. Експериментальна частина.....	42
Висновки.....	51
Список використаних джерел.....	52
Додаток: Спектри ПМР сполук.....	55

## Умовні позначення

АМФ- аденозинмонофосфат

АТФ- аденозинтрифосфат

ВЕРХ- високо-ефективна рідинна хроматографія

MeOH- метанол

мМ- мілімоль/л

ммол- мілімоль

MTBE- метил третбутиловий етер

м.ч.- мільйонні частки

РСА- рентгеноструктурний аналіз

ЦП- циклічні пептиди

ПЕГ- поліетилен гліколь

ЯМР- ядерно-магнітний резонанс

Вос<sub>2</sub>O- дитретбутил дикарбонат

ВОР- бензотріазол-1-ілокситрис (диметиламіно) фосфоній  
гексафторфосфат

DCM- дихлорметан

Diox\*HCl- розчин соляної кислоти в діоксані

DIPEA- диізопропіл етил амін

DMF- диметилформамід

DMSO- диметилсульфосид

EtOAc- етилацетат

Fmoc-OSu- 9-Фторенілметоксикарбоніл-N-гідроксисукцинімід

НАТУ- 1-[Біс(диметиламіно)метилен]-1Н-1,2,3-тріазоло[4,5-*b*]піридинію  
3-оксид гексафторфосфат

НВТУ- 2-(1Н-бензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилуронію  
гексафторфосфат

Нех- гексан

HFIP- гексафтор ізопропанол

НОВt- гідроксибензатріазол

НОAt- 1-гідрокси 7-азабензатріазол

IC<sub>50</sub>- концентрація напівмаксимального інгібування

LCMS- рідинна хроматографія спряжена з мас-спектрометрією

Leu- лейцин

MSMS- тандемна мас-спектрометрія

NRPS- нерибосомальна пептидна синтетаза

Orn- орнітин

Phe- фенілаланін

Pro- пролін

РуВОР -бензотриазол-1-ілокситрипіролідінофосфоній гексафторфосфат

RCM- внутрішньомолекулярна реакція метатезису з утворенням циклу

SICLOPPS- роздільне кільцеве інтеїнове лігування пептидів та протеїнів

SPPS- твердофазний пептидний синтез

ТВТУ- 2-(1Н-бензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметиламіній тетрафторборат

TFA –трифторуксусна кислота

THF- тетрагідрофуран

Val- валін

ХІАР- X хромосома зв'язаний інгібітор апоптозу клітин

## Вступ

Циклічні пептиди (ЦП) - перспективний об'єкт дослідження для отримання нових лікарських засобів. Через свою структурну жорсткість та відносно великий розмір їх властивості сильно відрізняються від властивостей лінійних пептидів та малих молекул. Дослідження та розробка нових ефективних методів отримання ЦП – напрямок, який швидко розвивається протягом останніх років.

Отримання макроциклів пептидної та непептидної природи утруднене сукупністю побічних процесів та часто потребує ретельного підбору умов реакцій та реагентів. Для отримання певного макроциклу існує обмежена кількість успішних стратегій. Успіх при проведенні таких внутрішньомолекулярних реакцій сильно залежить від розміру циклу, стеричних перешкод, конформації молекули.

Структурна модифікація природніх ЦП впливає на їхню біологічну активність. При заміщенні залишків амінокислот їхніми біоізостерами, при додаванні чи відніманні певних амінокислотних залишків, при зміні кількості донорів, акцепторів водневих зв'язків чи при зміні жорсткості молекули біологічна активність сполуки також буде змінюватись певним чином. На прикладі Граміцидину S, який буде розглядатись у цій роботі, можна побачити, як зміни у амінокислотному складі можуть модулювати біологічну активність сполуки та міняти її біохімічні властивості.

Мета роботи: Синтез амінокислот для заміщення фенілаланіну природнього Граміцидину S. Отримання на їх основі моно-, дизаміщених міметиків та дослідження їх антибактеріальної активності

## Розділ 1. Огляд літератури

### 1. Властивості циклічних пептидів

#### 1.1 Загальна характеристика

Циклічні пептиди – клас сполук, які складаються з послідовності амінокислот та мають замкнену структуру. Вони знаходяться в певному інтервалі молекулярної маси між ‘малими молекулами’ та макромолекулами. Загалом в медичній хімії 90% лікарських засобів належать до так званих ‘малих молекул’, які є основним полем досліджень великих фармакологічних компаній. Малі молекули – сполуки з вагою менше 500 Да. Зазвичай біологічно активні ‘малі молекули’ задовольняють правилам Ліпінського. До макромолекул відносять речовини з молекулярною вагою більше 3000Да, це можуть бути протеїни, полісахариди, і ін.

Циклічні пептиди зазвичай складаються з 5-40 залишків амінокислот [1]. Через свою структурну жорсткість та стабільність всередині живих організмів, багато сполук цього типу є агоністами, антагоністами певних рецепторів. Було показано, що деякі ЦП здатні впливати на протеїн-протеїнову взаємодію [2], деякі активують чи інгібують певний біологічний процес, наприклад гормони окситоцин та вазопресин. Інший тип ЦП – мембранолітичні пептиди, сполуки, які здатні сильно взаємодіяти з мембраною клітини та впливати на її властивості. До таких пептидів можна віднести Граміцидин та Валіноміцин [3].

Циклічні пептиди можна поділити на природні та синтетичні аналоги (так звані пептидоміметики), отримані для специфічних досліджень залежності активності від структури сполуки.

Пептидні сполуки, які використовуються в медичній хімії, можна розділити на малі пептиди, середні пептиди та протеїни. Недоліком лінійних, малих пептидів є невідповідність правилам Ліпінського. Олігопептиди здатні швидко розщеплюватись під дією протеаз в організмі, швидко виводитись

нирками. Отже, середній час життя таких пептидів всередині організму часто не перевищує декілька хвилин. Тому основний шлях прийому пептидних ліків – це внутрішньом'язова або внутрішньовенна ін'єкція. Циклічні пептиди у цьому плані показують себе значно краще: ЦП мають меншу кількість донорів та акцепторів водневих зв'язків за рахунок внутрішньомолекулярного зв'язування. Також, вони мають меншу кількість зв'язків, здатних до обертання, що часто суттєво підвищує здатність проникати всередину клітин. Наприклад циклоспорин А має біологічну доступність 30-40% та за рахунок пасивної дифузії здатен проходити крізь стінку шлунка. Часто проблему низької стабільності вирішують приєднанням великих фрагментів ПЕГ чи зв'язуванням з протеїнами крові, що дозволяє підвищити час циркулювання пептиду у крові до декількох днів. Альтернативний підхід – зв'язати пептид з фрагментом, який здатен взаємодіяти з альбумінами крові (Рис. 1.1). Такий метод також значно підвищує час життя пептиду у крові людини [4].

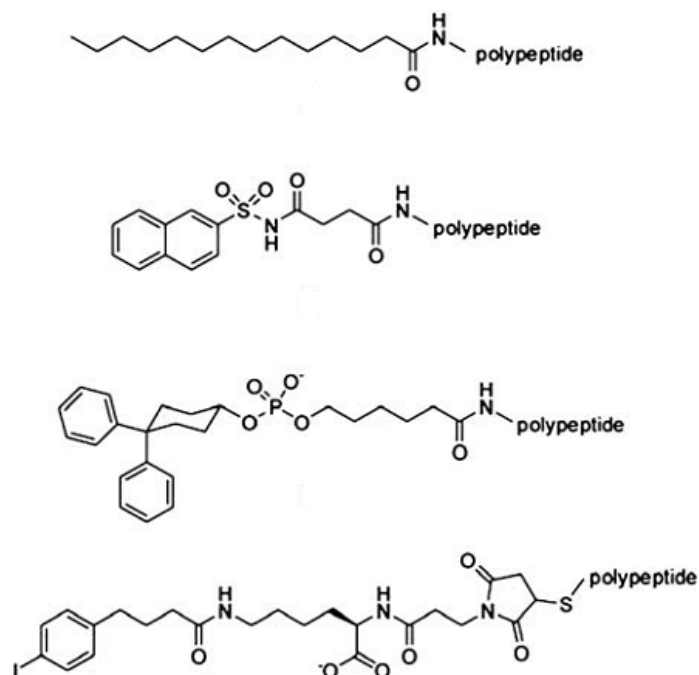


Рис.1.1 Структурні елементи, відповідальні за зв'язування з альбумінами

Природні циклічні пептиди відносяться до нерибосомальних пептидів та синтезуються в клітинах за допомогою нерибосомальних пептидних синтетаз

(NRPS), які складається з декількох доменів (Рис.1.2): аденілюючий, пептид-утримуючий, конденсуючий, тіоестеразний. Амінокислота аденілюється, при цьому витрачається одна молекула АТФ. Аденільована сполука зв'язується з тільним лінкером утримуючого домена, на якому нарощується лінійна послідовність пептиду. Лінійний пептид циклізується на тіоестеразному домені. Деякі бактерії здатні синтезувати нестандартні ЦП використовуючи допоміжні редуктазні домени, які відновлюють кислотний залишок. Після відновлення сполука циклізується за рахунок реакції відновного амінування при взаємодії альдегіду та аміну чи нуклеофільного заміщення при взаємодії фосфорильованого спирту з аміном [5].

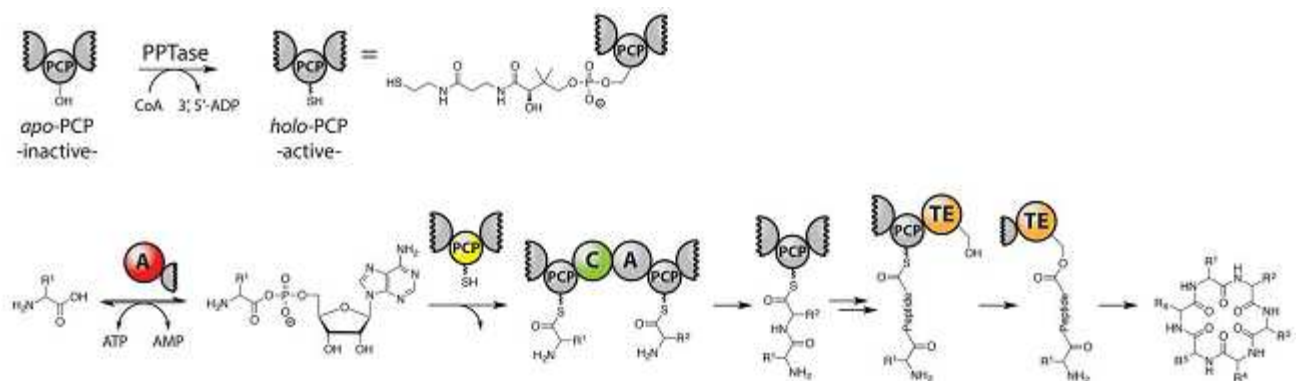


Рис.1.2 Механізм роботи нерибосомальної пептидної синтетази

Є три основні функції ЦП у живих організмах :

1. Боротьба з бактеріями та мікроорганізмами паразитами за рахунок впливу на їх механізми життєдіяльності чи руйнування їхньої клітинної мембрани
2. Виконання специфічних регуляторних функцій за рахунок дії на певні активні центри ферментів
3. Вплив на протеїн-протеїнову взаємодію у сигнальних шляхах ,при мітозі і інших біологічних процесах.

При регуляції протеїн-протеїнової взаємодії циклічні пептиди зв'язуються в алостеричних центрах . Приклад такого застосування ЦП, як регулятора протеїн-

протеїнної взаємодії є інгібування утворення амілоїдних агрегатів, які приводять до розвитку хвороби Альцгеймера. Для цього була отримана бібліотека ЦП. Отримані ЦП мали певну вторинну структуру, схожу на структуру мономерного  $\beta$ -амілоїду, що створювало можливість зв'язувати та блокувати мономери та запобігати збиранню амілоїдного агрегату [6].

## 1.2 Антибактеріальні властивості

Антимікробні ЦП різних організмів відрізняються за будовою та амінокислотним складом. Близькі види живих організмів синтезують різні антибактеріальні ЦП. Складні організми, такі як тварини, здатні синтезувати різні ЦП в тканинах свого організму. Велике різноманіття ЦП виникає через велике різноманіття шкідливих мікробів, які живуть в певному середовищі та здатні потрапити в організм еукаріотів [11].

Мембрани еукаріотів та прокаріотів відрізняються за фізичними властивостями та хімічним складом. Мембрана Грам позитивних бактерій утворена від'ємно зарядженими фосфоліпідами. Мембрана Грам негативних бактерій також складається з від'ємно заряджених фосфоліпідів, однак також зовнішня поверхня складається з полісахаридної плівки (Рис.1.3), між плівкою та мембраною знаходиться періплазма. Також, мембрана Грам негативних бактерій стабілізується за рахунок зв'язування з катіонами кальцію та магнію, при взаємодії з позитивно зарядженими пептидами мембрана додатково дестабілізується через заміщення катіонів металів [12]. На відміну від цього, мембрани клітин еукаріот незаряджені, вони складаються з нейтральних фосфоліпідів. Також вони містять холестерол, який робить їх більш міцними та запобігає проникненню ЦП всередину клітини.

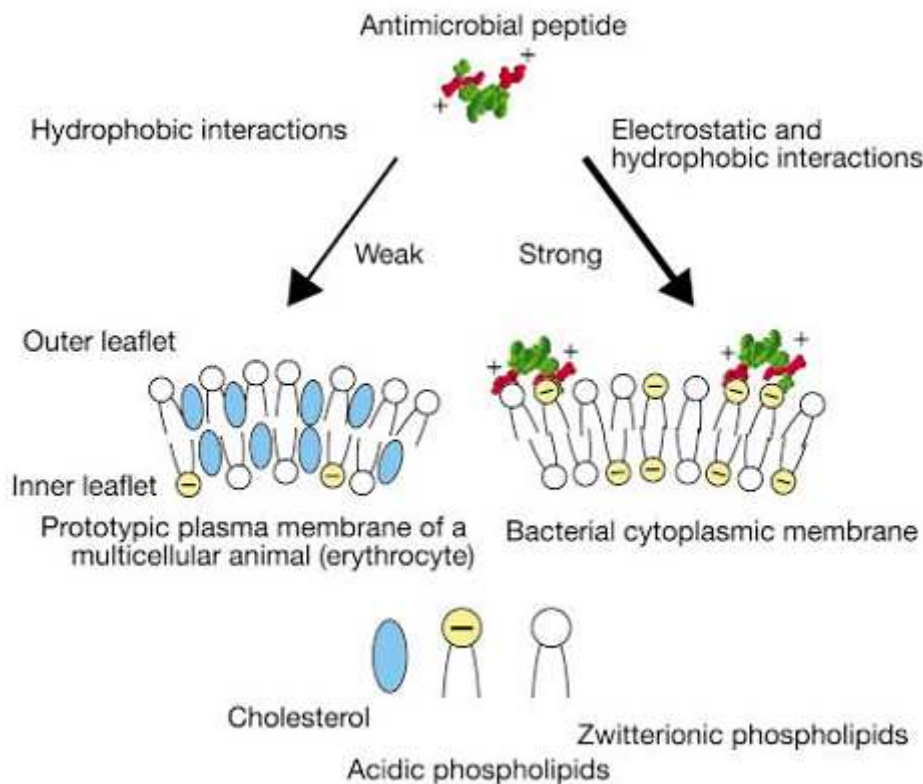


Рис. 1.3 Будова клітинних мембран еукаріот та прокаріот

Взаємодія антибактеріального ЦП з мембраною описується механізмом Шаї-Мацузакі-Хуанга[13], який полягає у координації пептиду на поверхні клітини за рахунок електростатичної взаємодії, розрихленні ліпідної структури та дифузії ЦП у середину мембрани. Мембранолітичні пептиди здатні утворювати специфічні йонні канали для калію чи кальцію, що впливає на механізми регуляції клітин бактерій та приводить до їх загибелі [14] через деполяризацію мембрани клітини, або витікання вмісту клітини у зовнішню середовище.

Різні бактерії використовують різні механізми резистентності до дії ЦП, наприклад *Porphyromonas gingivalis* здатна синтезувати специфічні травні протеази для руйнування ЦП. У грам негативних бактерій є специфічний індикаторний протеїн у періплазмі, PhoPQ. Цей протеїн відчуває зміну заряду мембрани, при зв'язуванні антимікробного ЦП, що приводить до активації, та початку синтезу 4-аміноарабінози та етанол аміну. Ці катіонні сполуки поступають на зовнішню мембрану та компенсують негативний заряд фосфоліпідів, що інгібує зв'язування ЦП на поверхні [15].

### 1.3 Методи отримання циклічних пептидів

Існують чотири можливі підходи до циклізації поліпептидів :

- Циклізація «голова до хвоста»
- Циклізація «бічний ланцюг до хвоста»
- Циклізація «бічний ланцюг до бічного ланцюга»
- Комплексний (Рис.1.4)

Фінальний макроцикл ,утворений тільки за рахунок пептидних зв'язків, називають гомодетичним. Якщо у ньому присутні інші типи зв'язки, наприклад дисульфідні або алкільні містки, то такі макроцикли називають гетеродетичними [16].

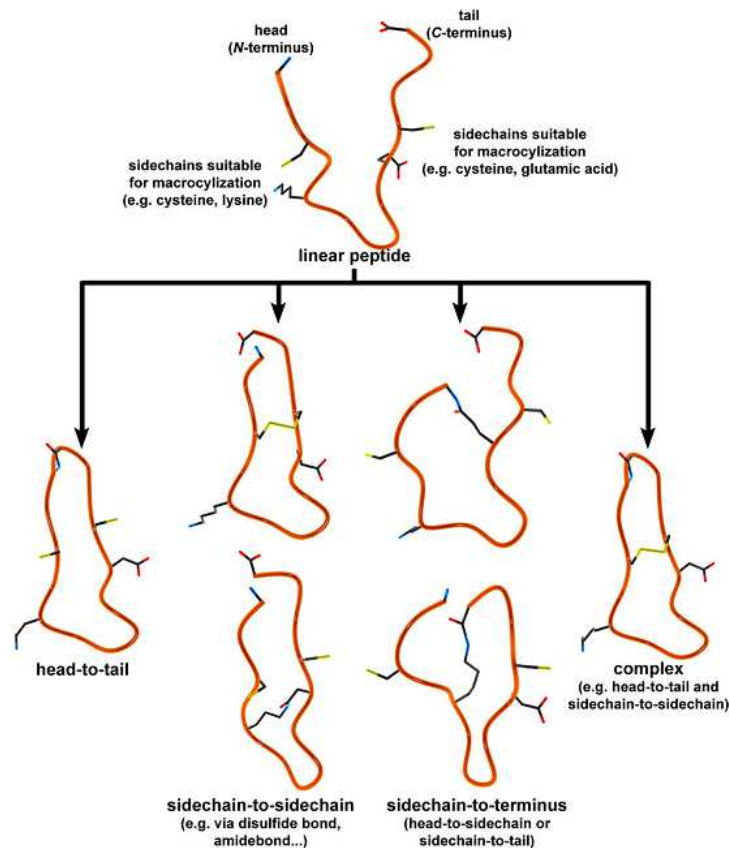


Рис.1.4 Можливі варіанти циклізації

Зазвичай різні варіанти циклізації проходять з різною чистотою та різними виходами. Наприклад, тотальний синтез Рікардину С включав циклізацію, де при виборі різних сайтів циклізації вихід реакції змінювався в межах 30-90 % (Рис.1.5).

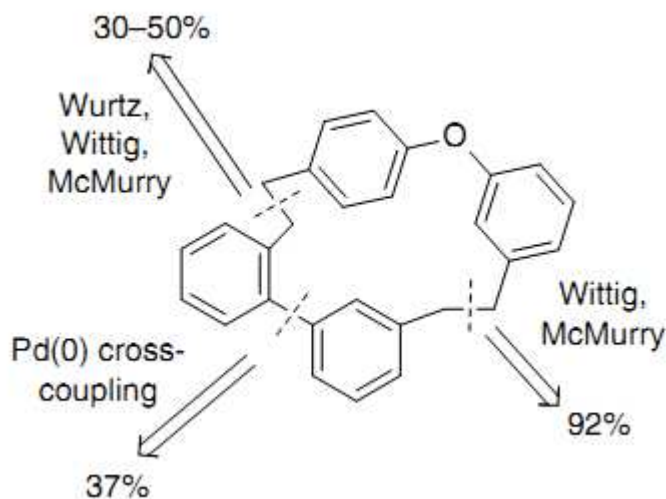


Рис.1.5 Циклізація Рікардину С

Для отримання ЦП можна використовувати велику кількість реакцій, однак найбільш розповсюдженими є реакція метатезису, реакція амідного каплінгу та клік реакції. Такі реакції зазвичай не потребують жорстких умов проведення, мають відносно велику швидкість, що дає можливість проводити їх при великому розведенні. Альтернативою великому розбавленню є проведення даних стадій на полімерній основі, наприклад з використанням тіобензильного лінкера (Рис.1.6), або використання реагентів, зв'язаних з полімером [17].

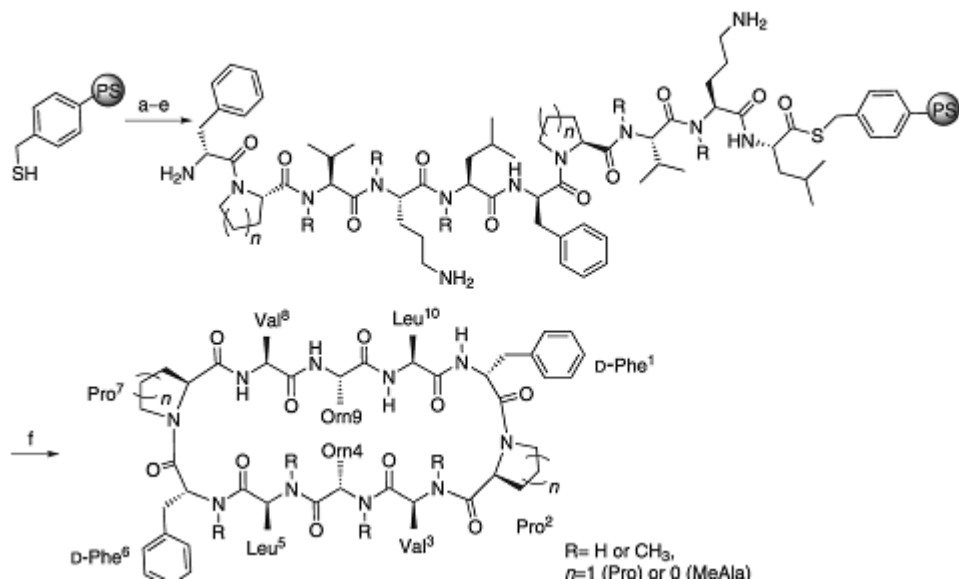


Рис.1.6 Циклізація на полімерній основі та зняття пептиду з полімеру

Також для утворення макроциклів можуть використовувують крос каплінги, внутрішньо молекулярне олефінування, алкілювання, приєднання по Міхаелю та інші реакції.

Пептидні макроцикли отримують зазвичай амідним каплінгом між кінцевою кислотою та кінцевим аміном. Для запобігання епімеризації кінцевої амінокислоти підбирають оптимальний конденсуючий реагент. Також намагаються уникати використання TBTU, NATU, HBTU як реагентів для циклізації через побічні процеси гідролізу активованого ефіру та гуанілювання N-кінцевого залишку. Найбільш розповсюджені реагенти для циклізацій - BOP, PyBOP з додаванням надлишку HOBT, HOAt для супресії епімеризації кінцевої кислоти. Вихід внутрішньомолекулярної циклізації залежить від положення утворюваного зв'язку, правильний вибір місця для циклізації може сприяти зближенню кінцевої аміно- та карбоксильної групи та полегшення реакції [18]. Наприклад, при циклізації пентапептиду (Рис.1.7) вибір різних положень циклізації приводить до різної ефективності циклізації. Часто найбільш вигідне положення знаходиться напроти залишків проліну, це забезпечує зручне положення кінцевих груп для циклізації та найбільшу стабілізацію необхідної конформації за рахунок водневих зв'язків. Розповсюджений варіант циклізації

ЦП через селективне утворення дисульфідних зв'язків використовуючи стратегію ортогонального захисту тіольних залишків. Наприклад, захисні групи ацетамідометильна (Acm) метокситритильна (Mmt) та трет-бутильна можуть селективно зніматись в присутності одна одної для утворення специфічних дисульфідних містків за допомогою окиснення н-хлорсукцинімідом, йодом [19]. Було показано, що за допомогою ортогонально захищених тіольних груп можна синтезувати комбінаторні бібліотеки біциклічних та трициклічних макроциклів [20]. Різноманіття сполук у таких бібліотеках виникає через ортогональний захист різних пар тіолів, різні положення SH груп та різні лінкери для утворення специфічних містків.

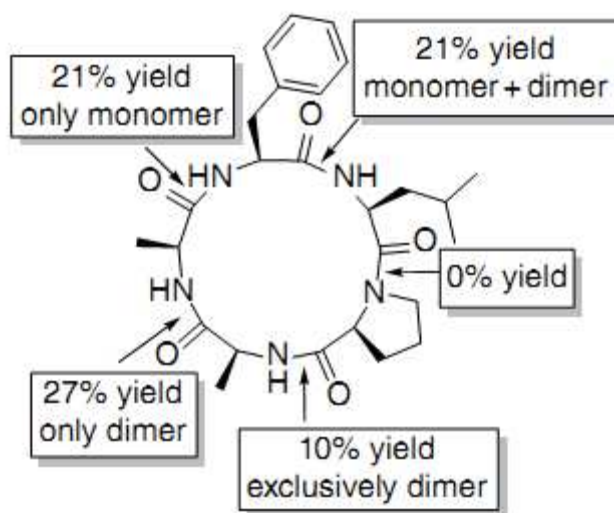


Рис.1.7 Різні сайти циклізації пептиду

Циклізація макромолекули на полімерній основі можна проводити, використовуючи стратегію поліортогонального захисту. Молекула з'єднується з полімером бічною поверхнею, лінійний пептид нарощується на кінцях молекули (Рис.1.8). Цільова сполука утворюється на полімері та потім селективно знімається з нього. Таким методом отримували багато тетра- та пентапептидів, які важко отримати в розчині через сильні стеричні перешкоди [21]. Такий підхід створює можливість отримання комбінаторних бібліотек циклічних пептидів за допомогою паралельного синтезу. Такі бібліотеки можуть повністю

бути отримані на полімері, та використані для високопродуктивного скринінгу, для аналізу отриманих пептидів зазвичай використовують MSMS.

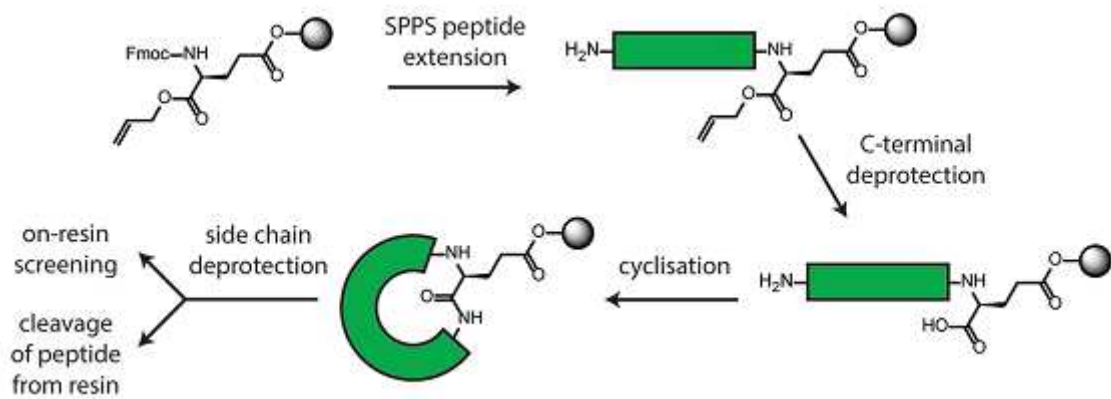


Рис1.8 Отримання макроциклу на полімері

На основі циклічних пептидів отримують генетично кодовані бібліотеки, такі як SICLOPPS[22]. Циклічні пептиди кодуються у специфічних плазмідах, які при потраплянні всередину клітини, транскрибуються та транлюються. Утворений поліпептид складається з двох частин: інтеїну та екстеїну. В клітині поліпептид розщеплюється, інтеїн вивільняється у навколишнє середовище, де перетворюється з утворенням ЦП (Рис.1.9). Цей метод можна розширити з використанням не протеїногенних амінокислот за допомогою ферменту флексізіму[23]. Флексізім здатен перетворювати тРНК, прикріплюючи до неї не протеїногенну амінокислоту або певний не амінокислотний фрагмент, замість протеїногенної амінокислоти. Це дозволяє отримувати будь які бібліотеки з циклічними пептидами, та визначати їх точну структуру після розшифровки вихідної плазмід.

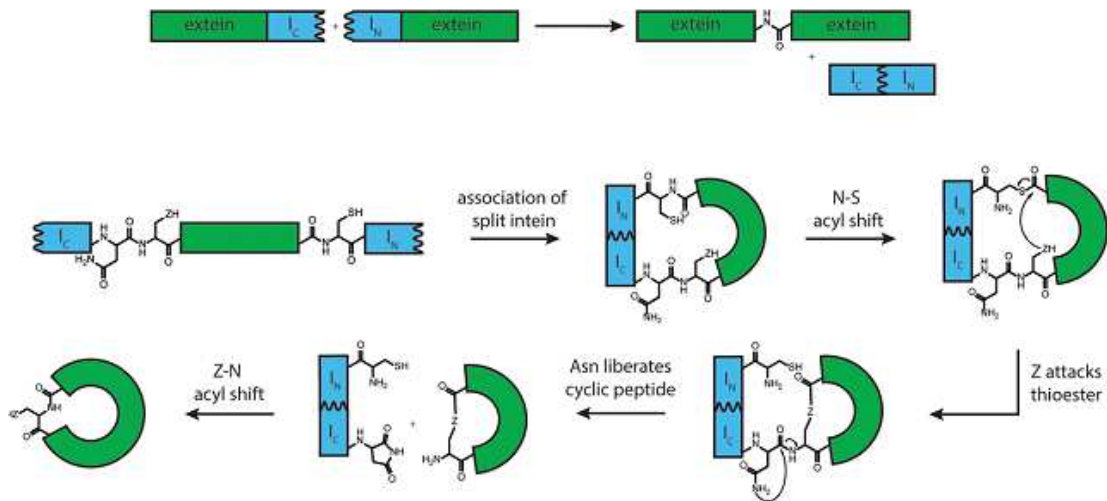


Рис.1.9 Отримання ЦП у методі SICLOPPS

Інший підхід до утворення пептидних макроциклів- це зв'язування пептиду за допомогою алкільних містків, отриманих реакцією RCM(Рис.1.10). Наприклад, синтез пептидів –інгібіторів фактору транскрипції NOTCH у ракових клітинах, де вторинна структура ЦП- альфа спіраль, була стабілізована за рахунок алкільних містків. Алкільні ланцюги полегшували проникнення пептиду в середину мембрани, збільшували резистентність ЦП до пептидаз та підвищували стабільність вторинної структури молекули у водному розчині[24]. Була отримана бібліотека подібних ЦП, в якій знайшли дві речовини- кандидати у лікарські засоби: ALRN-6924 та ALRN- 5281 .Визначені речовини проходили доклінічні дослідження для лікування ракових пухлин та дефіциту фактору росту [25].

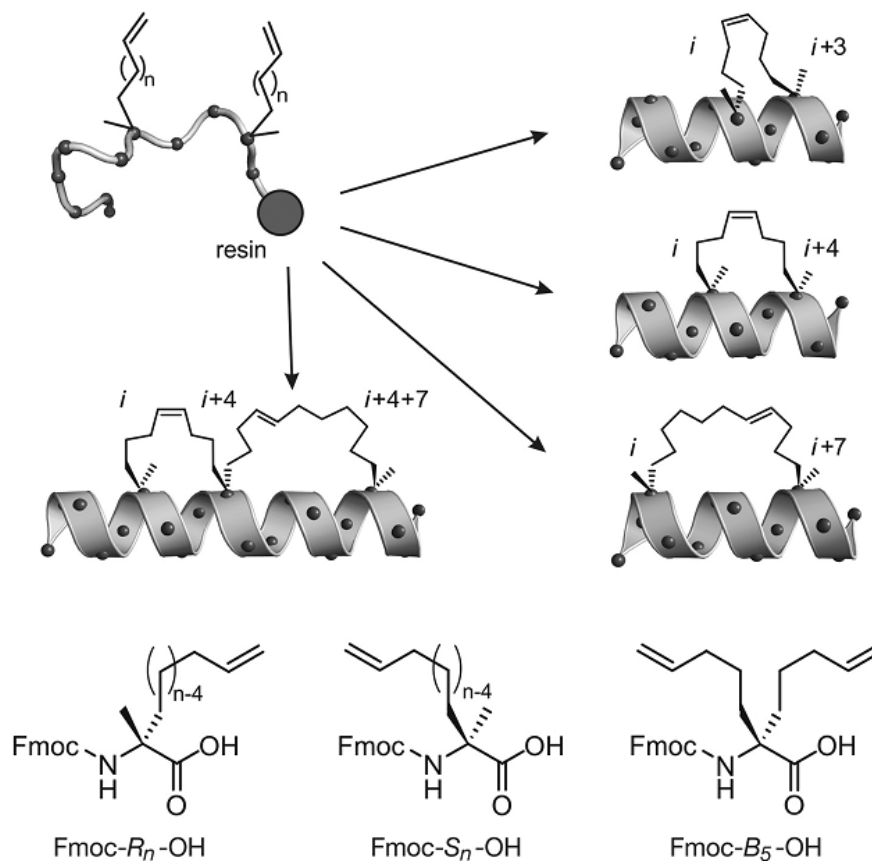


Рис.1.10 Стабілізовані алкільними містками пептиди

Альтернативний підхід - утворення макроциклів за рахунок клік реакцій - циклізації Хюсгена. Ця реакція може відбуватись у дуже м'яких умовах, навіть придатна до використання у біоортогональних умовах. При каталізі солями міді циклізація Хюсгена є регіоселективною. Триазол- біоізомер пептидного зв'язку, тому цей метод широко використовується в синтезі пептидних макроциклів [26]. Прикладом застосування таких сполук є отримання бібліотеки пептидних ДНК- кодованих макроциклів- інгібіторів XIAP ,а саме доменів VIR2 та VIR3[27]. Цей протеїн є мішенню для лікування деяких типів раку ,нейродегенеративних хвороб та аутоімунних захворювань оскільки він регулює механізми запрограмованої клітинної загибелі. При дослідженні цього протеїну було протестовано 16000 сполук для виявлення цільового інгібітора (Рис.1.11 зліва) та отримано спектр РСА інгібітору в активному центрі протеїну. При подальших дослідженнях вдалося виявити кращий інгібітор цільового протеїну, який був димерним продуктом циклізації одного з макроциклів бібліотеки(Рис.1.11 справа)

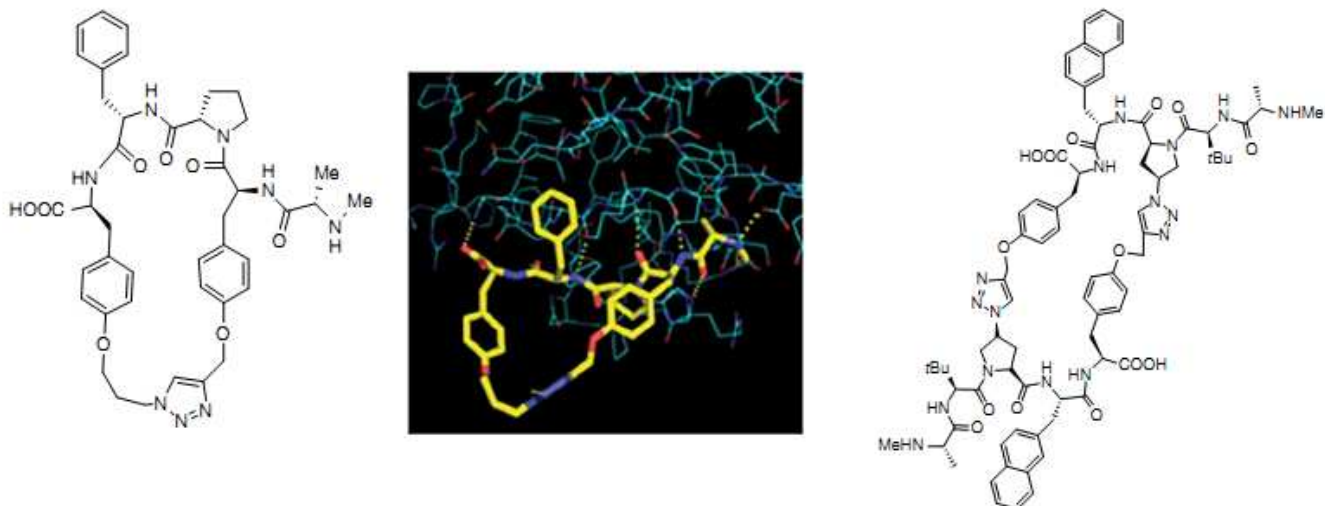


Рис.1.11 Знайдений інгібітор, РСА спектр та найбільш ефективний інгібітор

## 2. Загальна характеристика Граміцидину S

### 2.1 Властивості Граміцидину S

Граміцидин S був відкритий у 1942 році радянськими вченими Гаусом та Бражніковою, та використовувався як антибіотик для військових потреб під час Другої світової війни [33]. Граміцидин S відноситься до мембранолітичних пептидів. Результатом їх взаємодії з мембраною є утворення дірок у мембрані, що приводить до загибелі клітин бактерій. Граміцидин S активний щодо Грам негативних та Грам позитивних бактерій. Недоліком Граміцидину S є його здатність знищувати клітинну мембрану еритроцитів людини та ссавців. З мембраною еукаріотів Граміцидин S взаємодіє гірше оскільки мембрана еукаріот незаряджена. Також, в середині мембран еукаріот присутній холестерол [34], який підвищує щільність мембрани, взаємодіє з молекулами Граміцидину S та на дає їм проникати в середину мембрани.

У 1990ті роки було зроблено багато робіт з модифікації Граміцидину S для покращення його селективності та підсилення антибактеріальної активності . У 1996 році була доведена ефективність Граміцидину S щодо Грам негативний

бактерій[35] та грибів, що значно розширило коло його застосування. Зараз Граміцидин S використовують при лікуванні певних вушних інфекцій, інфекцій горла та інфекцій зубного кореня (Рис.2.1). При лікуванні інфекції зубного кореня [36] концентрація пептиду у 200 мкг/мл приводила до повного руйнування мембрани бактерії *E. faecalis*. Така мала доза не визиває великих проблем, пов'язаних з руйнуванням клітин крові.

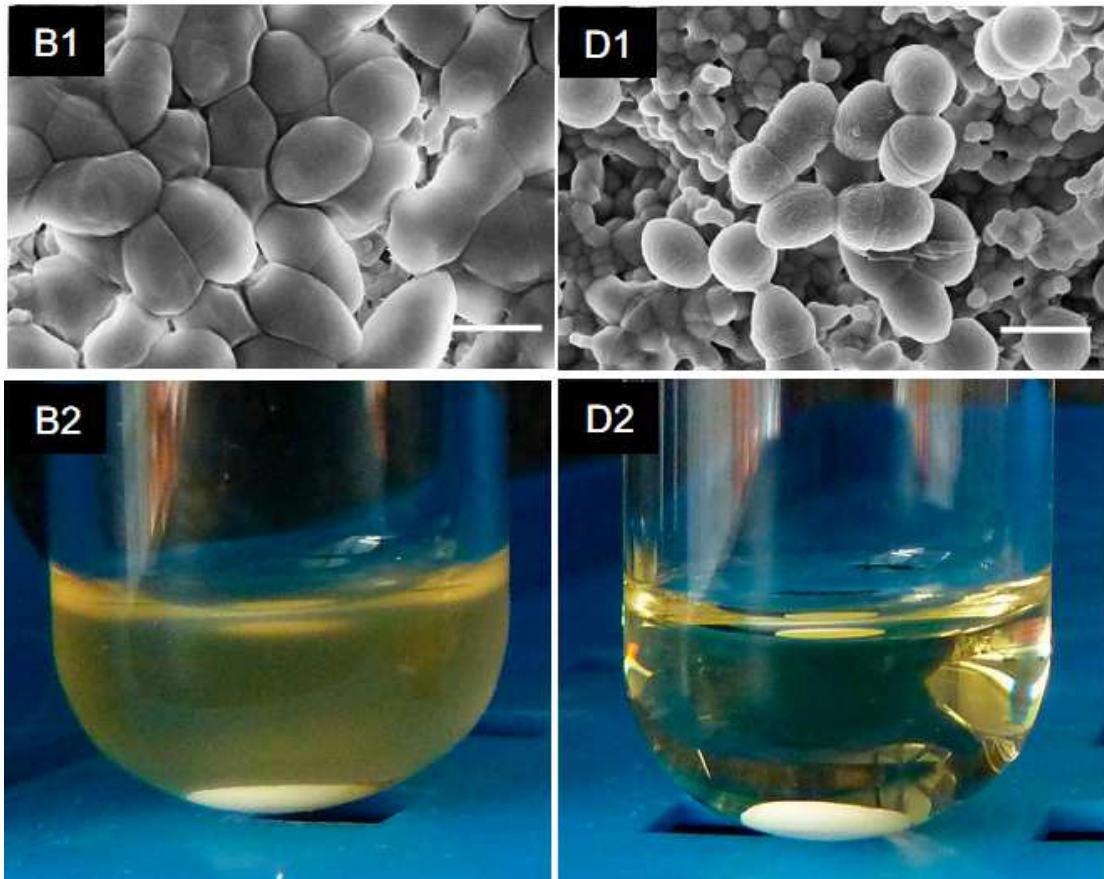


Рис.2.1 Мембрани бактерії, фотографія з електронного мікроскопа

Граміцидин S - декапептид з послідовністю  $(\text{Leu-Orn-Val-Pro-Phe})_2$ . Граміцидин S має жорстку вторинну структуру бета –шпильки, яку стабілізують чотири внутрішньомолекулярні водневі зв'язки(Рис.2.2), з віссю симетрії  $C_2$ .

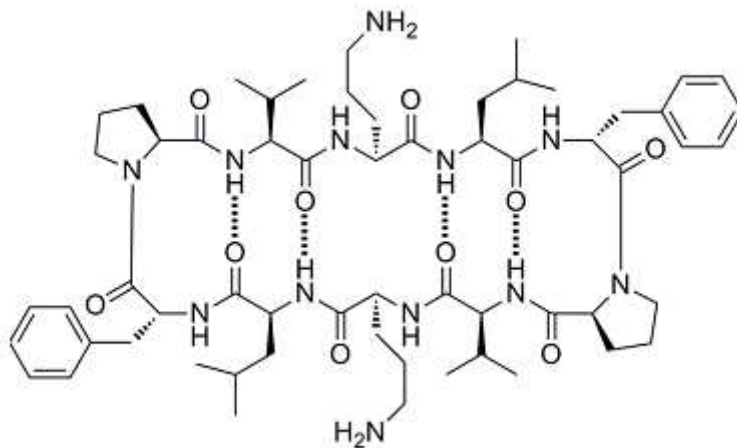


Рис.2.2 Вторинна структура Граміцидину S

Особливістю вторинної структури Граміцидину S є те, що гідрофільні радикали залишків орнітину та гідрофобні радикали валіну та лейцину знаходяться по різні сторони відносно площини поверхні Граміцидину S, що робить молекулу амфіфільною.

Перевагою Граміцидину S та мембранолітичних ЦП є те, що бактеріям важко швидко виробити певний механізм резистентності до дії цих сполук. Якщо ЦП діє на трансмембранні протеїни, то, за рахунок мутацій, бактерія може стати резистентною до його дії досить швидко. У випадку Граміцидину S, для того, щоб боротись з ним можливі два підходи

- Розщеплювати пептид на зовнішній поверхні мембрани
- Не давати йому координуватись та накопичуватись на поверхні бактерії

Ці переваги роблять Граміцидин S дуже перспективною мішенню для модифікацій для покращення селективності та біологічної активності.

### 3.2 Механізм дії Граміцидину S

Для прояву антимікробної та антибактеріальної активності молекулою Граміцидину S необхідні основні центри, гідрофобні залишки, ароматичні залишки та загальні амфіфільні властивості сполуки.

Ароматичність у місцях повороту бета-шпильки дуже важлива для того, щоб Граміцидин S показував максимальну біологічну активність. Ліпофільність необхідна для гарного проникнення молекули у мембрану та для вільної дифузії в середині мембрани, яка приводить до утворення дірок у ній. Для початкового зв'язування Граміцидину S на поверхні мембрани молекулі необхідні позитивно заряджені функції, такі як катіони алкіл амонію, бо поверхня прокариот негативно заряджена. Так, як мембрана еукаріот незаряджена, швидке зв'язування Граміцидину S з поверхнею бактерії за рахунок електростатичної взаємодії приводить до селективної мембранолітичної дії Граміцидину S на прокариотичні клітини. Амфифільні властивості молекули залежить від жорсткості вторинної структури пептиду тому що від цього залежить чіткість розділення гідروفобних/гідрофільних залишків у просторі .

Грамідидин S руйнує мембрану клітин бактерій, утворюючи в ній пори, що приводить до вивільнення вмісту клітини у навколишнє середовище. У 90тих було припущення, що Граміцидин S, як Граміцидин A, всередині мембрани утворює специфічну структуру, схожу на іонний канал, яка впливає на трансфер іонів між клітиною та навколишнім середовищем [37]. Вільний трансфер іонів приводить до порушення механізмів регулювання клітини, однак дослідження показали, що Граміцидин S таких структур у мембрані не утворює.

При взаємодії з мембраною Граміцидин S утворює олігомерні структури, які формують пору в мембрані. Це було показано за допомогою дослідження міметиків Граміцидину S мічених залишками  $^{19}\text{F}$  та  $^{15}\text{N}$  (Рис.2.3). Міметики досліджували методом твердофазного ЯМР [38], за допомогою якого вдалося визначити, що при малих концентраціях пептиду він розміщується на поверхні паралельно мембрані. При великих концентраціях (1 молекула пептиду: 10 молекул фосфоліпиду) утворюються олігомерні структури за рахунок міжмолекулярних водневих зв'язки між залишками Orn-Pro. Формування комплексів з Граміцидину S свідчить про важливість міжмолекулярної взаємодії для прояву найбільшого терапевтичного ефекту молекули .

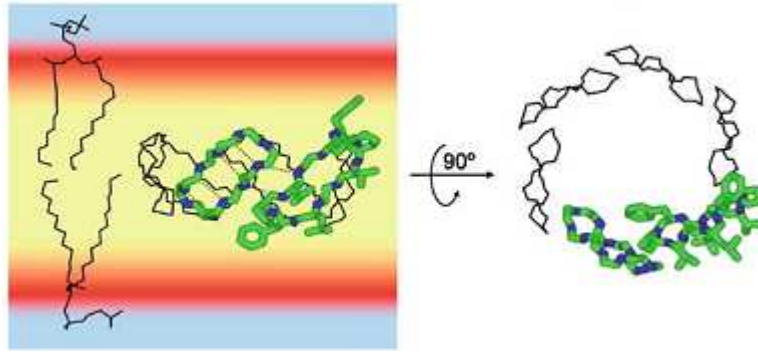


Рис.2.3 Взаємодія Граміцидинів S в середині мембрани

При взаємодії Граміцидину S з мембраною може мінятися положення певних периферійних мембранних протеїнів[39], що приводить до порушення функцій клітини. Для дослідження цього використовували флуоресцентно мічені протеїни та досліджували їх перегруповання на поверхні клітини. Наприклад, протеїни MinD та DivIVA (білки, необхідні для правильного формування поверхні поділу при діленні клітини), функціонування яких залежить від мембранного потенціалу, зазвичай вільно рухаються по клітинній мембрані. При дії Граміцидину S на клітину вони починають збиратись у одному місці, що сильно зменшує їх функціонал. Також фосфоліпід синтетаза PlsX та фермент MurG, який бере участь у синтезі пептидоглікану, втрачають свої позиції на мембрані та не можуть нормально забезпечувати оновлення клітинної оболонки бактерій [40].

### 3. SAR міметиків Граміцидину S

#### 3.1 Залежність активності пептиду від кількості амінокислот у послідовності

Зміна кількості амінокислот, які входять в склад лінійної послідовності Граміцидину S, суттєво змінює селективність та активність сполуки. У 1996 році було синтезовано серію пептидів - аналогів Граміцидину S з різною кількістю амінокислот від 6 до 14 [41]. Дослідження показали, що пептиди, які містили менше 8 амінокислотних залишків виявились неактивними до клітинних

мембран бактерій та еукаріот. Пептиди, які склались з 12 амінокислотних залишків, не утворювали чіткої вторинної структури, як у природнього Граміцидину S, тому основним об'єктом дослідження стали пептиди з 14 амінокислот. Пептид, який включав у себе лінійну послідовність Граміцидину S з додаванням залишку Orn та Leu не проявляв біологічної активності проти Грам позитивних бактерій, через сильну координацію з тейхоєвими кислотами, та Грам негативних бактерій, через зв'язування з ліпополісахаридами, однак руйнував клітини еритроцитів. Зміна конфігурації одного залишку орнітину приводить до переорієнтації (Рис.3.1) амінокислотних радикалів у просторі та зменшення гідрофільності/гідрофобності сполуки. Через цей ефект, міметик мав терапевтичний індекс у 16 - 32 рази кращий ніж природній Граміцидин S [42].

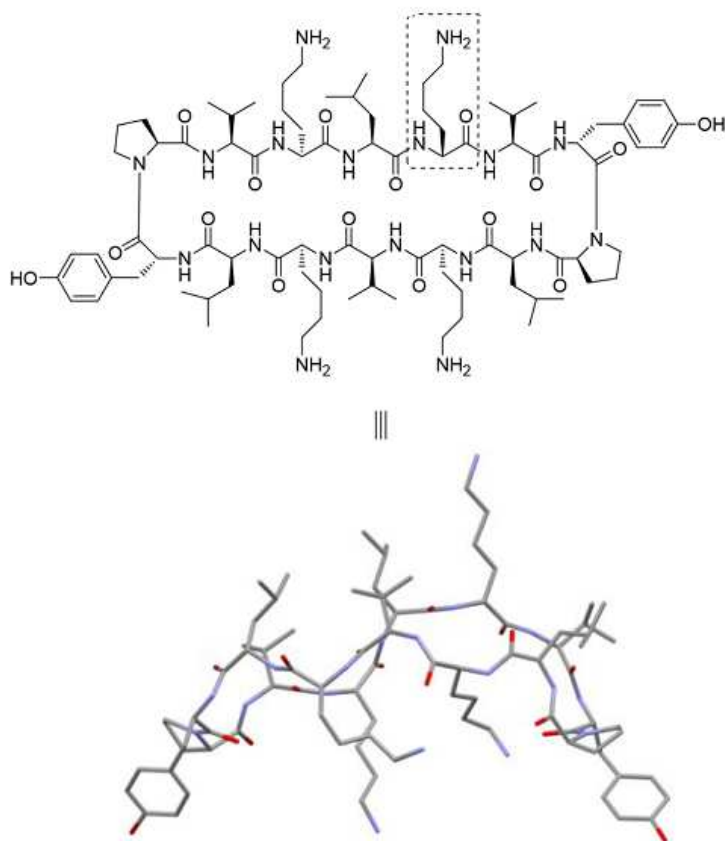


Рис.3.1 Структура міметика з 14 амінокислот

Отримання міметика Граміцидину S з необхідними амфіфільними властивостями можливе за рахунок варіювання кількості амінокислот гідрофільної/гідрофобної природи та заміна природніх амінокислот неприродніми з іншими фізико-хімічними властивостями[43]. Наприклад,

міметики з 14 амінокислот, які містили у складі 6 залишків Orn та адамантильну амінокислоту замість Val чи Leu мали покращений у 4-8 разів терапевтичний індекс.

### 3.2 Залежність активності від фізико-хімічних властивостей амінокислот

При модифікації лінійної частини бета-шпильки для збереження та покращення терапевтичного індексу та антибактеріальної активності необхідно зберігати баланс гідрофобних та гідрофільних амінокислот. Наприклад, при заміні всіх залишків лінійної частини на орнітин, пептид перестає проявляти гемолітичну активність взагалі, однак в той же час його дія на Грам позитивні, Грам негативні бактерії сильно зменшується. Амфіфільність міметику Граміцидину S зазвичай кількісно оцінюють по часу виходу сполуки з ВЕРХ колонки в певних умовах.

Для дослідження впливу фізико-хімічних властивостей амінокислот на біологічну активність була отримана серія аналогів Граміцидину S (Рис.3.2) де неполярні залишки Val та Leu були замінені на залишки адамантильної амінокислоти[44]. Отримані сполуки мали різні показники біологічної активності. Пептид з 2 залишками адамантану та 4 залишками орнітину мав як гарні показники біологічної активності, так і високий терапевтичний індекс(Табл.3.1).

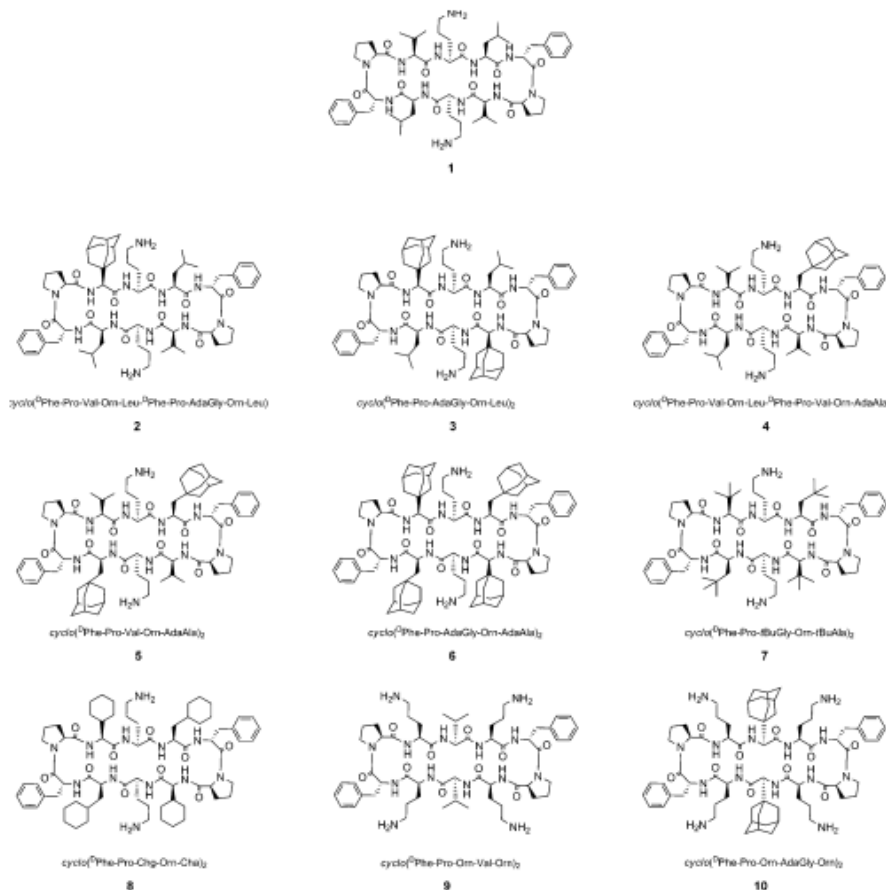


Рис.3.2 Міметики Граміцидину S з адамантильною амінокислотою

Compound	Gram <sup>+</sup> <i>S. aureus</i>	Gram <sup>+</sup> <i>S. ep. idermidis</i>	Gram <sup>+</sup> <i>E. faecalis</i>	Gram <sup>+</sup> <i>B. cereus</i>	Gram <sup>-</sup> <i>E. coli</i>	Gram <sup>-</sup> <i>P. aeruginosa</i>	Gram <sup>-</sup> <i>P. mirabilis</i>	Gram <sup>-</sup> <i>E. cloacae</i>	Gram <sup>-</sup> <i>K. pneumoniae</i>	MRSA-NT 1110019811H- T014-PVL <sub>4</sub>	MRSA-NT NE33-T034- PVL <sub>1</sub>	MRSA-NT NE29-T034- PVL <sub>1</sub>	MRSA-Clonal2BR USA300- 1110101146 PVL <sub>4</sub>
<b>GS</b>	8	4	8	8	32	64	>64	64	32	8		16	8
<b>2</b>	8	4	8	8	>64	>64	>64	>64	>64				
<b>3</b>	16	16	16	16	64	64	>64	>64	>64				
<b>4</b>	8	4-8	8	4	>64	>64	>64	>64	>64				
<b>5</b>	>64	16	16	64	>64	>64	>64	>64	>64				
<b>6</b>	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64				
<b>7</b>	4	4	4	4	64	32	>64	>64	>64	8		8	8
<b>8</b>	16	16	32	16	>64	>64	>64	>64	>64				
<b>9</b>	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64		>64	>64
<b>10</b>	8	4	8	8	8	16	>64	8	16	8		8	8

Табл.3.1 Данні біологічної активності та терапевтичний індекс міметиків Граміцидину S

Також були досліджені міметики Граміцидину S алкільовані по пептидному NH [45]. Вони не могли утворювати жорстку вторинну структуру через відсутність водневих зв'язків в порожнині ЦП. Дослідження гемолітичної активності та антимікробної активності показали, що метилювання бічних пептидних NH (Рис.3.3) приводить до руйнування бета-шпильки та зміни просторової орієнтації бічних радикалів один відносно одного. Молекула втрачає свою амфифільність через змішування гідрофільних та гідрофобних радикалів, що приводить до значного зменшення гемолітичної активності. Дані

тестувань показали, що руйнування бета- шпильки може також відбуватись через метилювання NH у бета-повороті. Такі сполуки також мають суттєво покращений терапевтичний індекс.

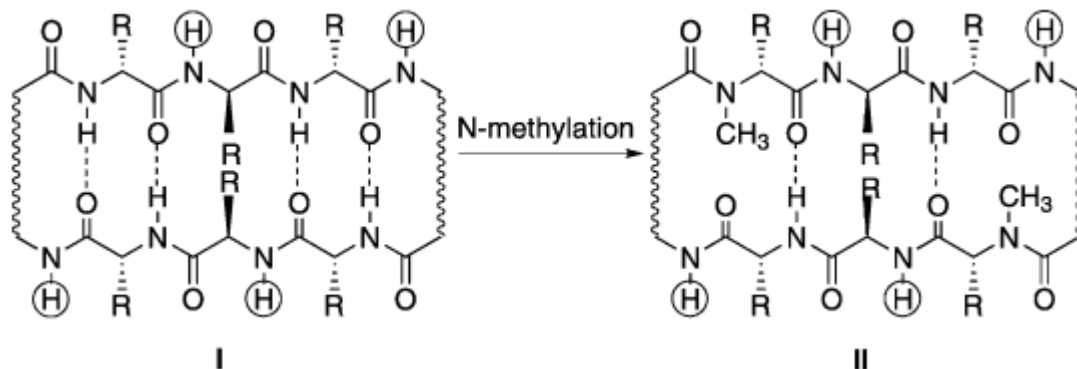


Рис.3.3 Міметики Граміцидину S метильовані по NH

### 3.3 Залежність активності від вторинної структури міметиків Граміцидину S

Модифікація дипептидного фрагменту Phe-Pro- дуже перспективна область для досліджень, оскільки навіть малі модифікації часто приводять до суттєвих змін антимікробної активності пептиду. Слід відмітити дві стратегії внесення змін в бета -поворот:

- Заміщення одної, двох амінокислот на їх аналоги
- Вирізання дипептиду та вставка на його місце іншого структурно жорсткого фрагменту

Заміщення залишку фенілаланіну на тирозин показало негативний результат, дані похідні суттєво відрізнялись з точки зору біологічної активності в негативну сторону[46]. Однак арильовані тирозини, арильовані триазольні та імідазольні, похідні мали суттєво покращену біологічну активність, що свідчить про важливість саме гідрофобних амінокислотних радикалів в даному місці молекули. Порівняння імідазольних та триазольних міметиків показали вплив рKa гетероциклу на біологічну активність ЦП [47]. Імідазольні міметики

(Рис.3.4) проявляють більшу активність через більший позитивний заряд на ЦП та відповідно кращу взаємодію з поверхнею бактерії.

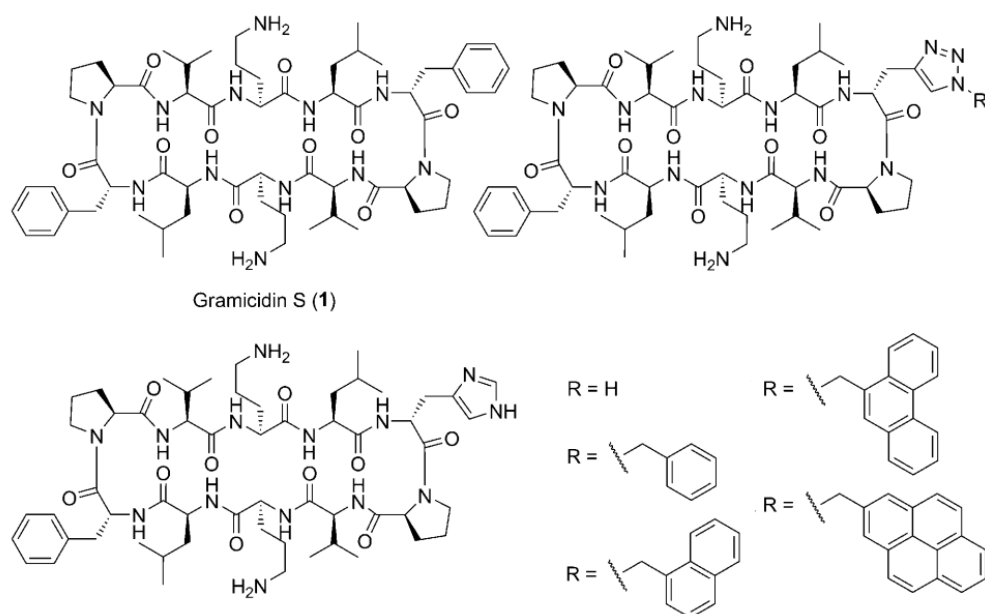


Рис.3.4 Імідазольні та триазольні міметики Граміцидину S

На іншій серії міметиків Граміцидину S було показано вплив  $\pi$ -катионної взаємодії між амінокислотними радикалами на біологічну активність. Фрагменти тетрагідро ізохінолінової амінокислоти, яка заміщує фенілаланін[48], взаємодіє з сусіднім орнітином, що приводить до утворення більш жорсткої вторинної структури та кращого проникнення пептиду в середину мембрани(Рис.3.5). З точки зору термодинаміки, при потраплянні в середину мембрани  $\pi$ -катионна взаємодія руйнується. В мембранах прокариотів виникають зв'язки з зарядженими фосфоліпідами, що компенсує енергетичні втрати при руйнуванні внутрішньомолекулярних зв'язків. При взаємодії ЦП з мембраною еукаріотів ці енергетичні втрати не компенсовані, відповідно проникнення в середину не вигідне. Це приводить до селективного проникнення міметиків Граміцидину S в мембрану прокариот.

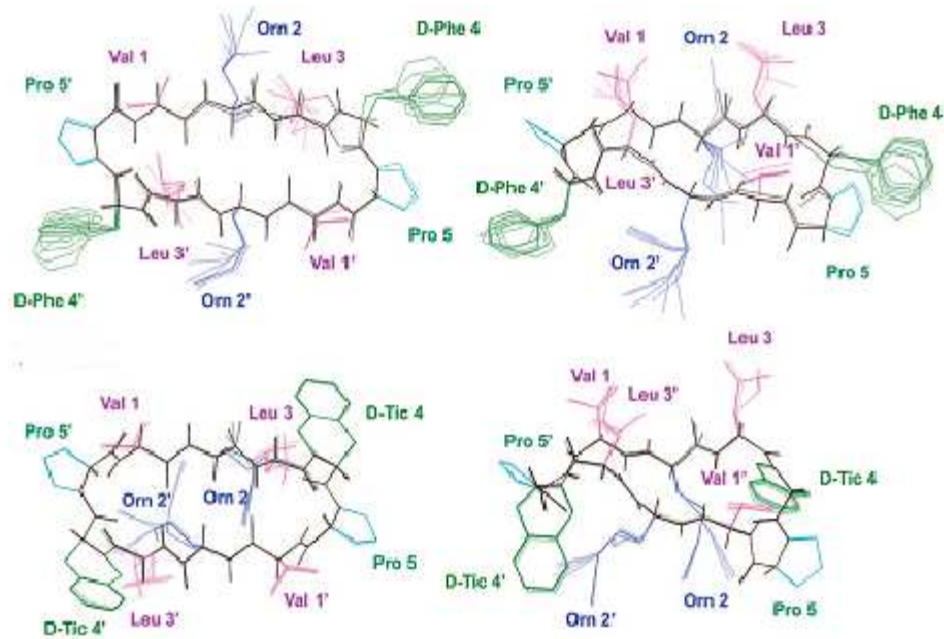


Рис.3.5 Виникнення  $\pi$ -катіонної взаємодії між сусідніми амінокислотними радикалами

У роботах було показано [49], що модифікація залишків проліну також може привести до покращення фармакодинамічних характеристик молекули. Були отримані міметики Граміцидину S модифіковані 4-аміно проліном[50] замість проліну. Крім них, були отримані ацильовані похідні, де аміно група 4-аміно проліну була ацильована залишками фенілаланіну чи лізину. Результати дослідження показали, що ацильовані похідні проявляли значно меншу гемолітичну дію та МІК на рівні природнього Граміцидину S.

Другий метод- заміна дипептиду Phe-Pro на ділянці бета повороту ЦП. Для того, щоб міметик мав сильну біологічну активність необхідно, щоб новий фрагмент мав гідрофобні властивості, був конформаційно жорстким та містив ароматичні радикали у складі. Наприклад, заміщення фрагменту Phe-Pro на О-бензил тетрагідропіранову амінокислоту збільшує терапевтичний індекс у 2-8 раз через зменшення амфіфільності сполуки[51]. Пізніше, були отримані міметики Граміцидину S де дипептид Phe-Pro був заміщений на амінокислоти на основі пентоз, які проявляли більшу біологічну активність ніж природній Граміцидин S тільки при алкілюванні спиртових залишків бензильними, діфенільними чи нафтильними фрагментами. Отже, присутність ароматичного

залишку у бета- повороті пептиду дуже важлива для прояву антибактеріальних властивостей. Тому аналоги Граміцидину S , модифіковані індолізининовим(Рис.3.6) та тіо- індолізининовим фрагментом[52] проявляли значно меншу антибактеріальну активність відносно міметиків з ароматичним фрагментом , однак, водночас, суттєво меншу гемолітичну дію. У роботі варіювали різні кетони для отримання різних, за фізико-хімічними властивостями, ацетальних залишків, що давало змогу впливати на властивості міметиків.

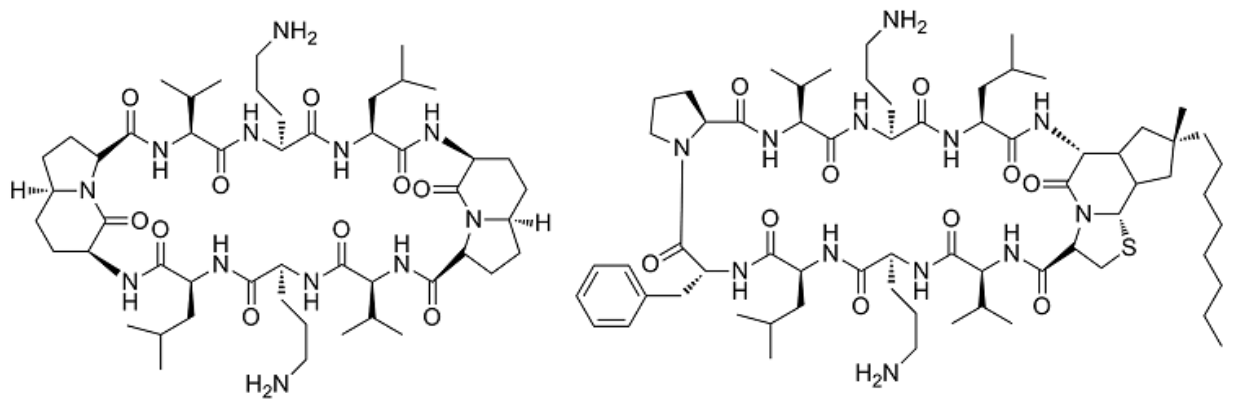


Рис.3.6 Індолізининові та тіо-індолізининові міметики Граміцидину S

## Розділ 2. Обговорення результатів

У даній дипломній роботі був проведений синтез аміноксилот- біоізостерів фенілаланіну. На основі деяких з них були отримані моно-, дизаміщені міметики Граміцидину S. Для одного міметіку, де бензильний залишок фенілаланіну був заміщений на [1,1,1] біциклопентан, був проведений тест на біологічну активність та цитотоксичність, який показав що аналог має активність на рівні природнього Граміцидину S.

Були обрані такі цільові Fmoc амінокислоти (Рис 1):

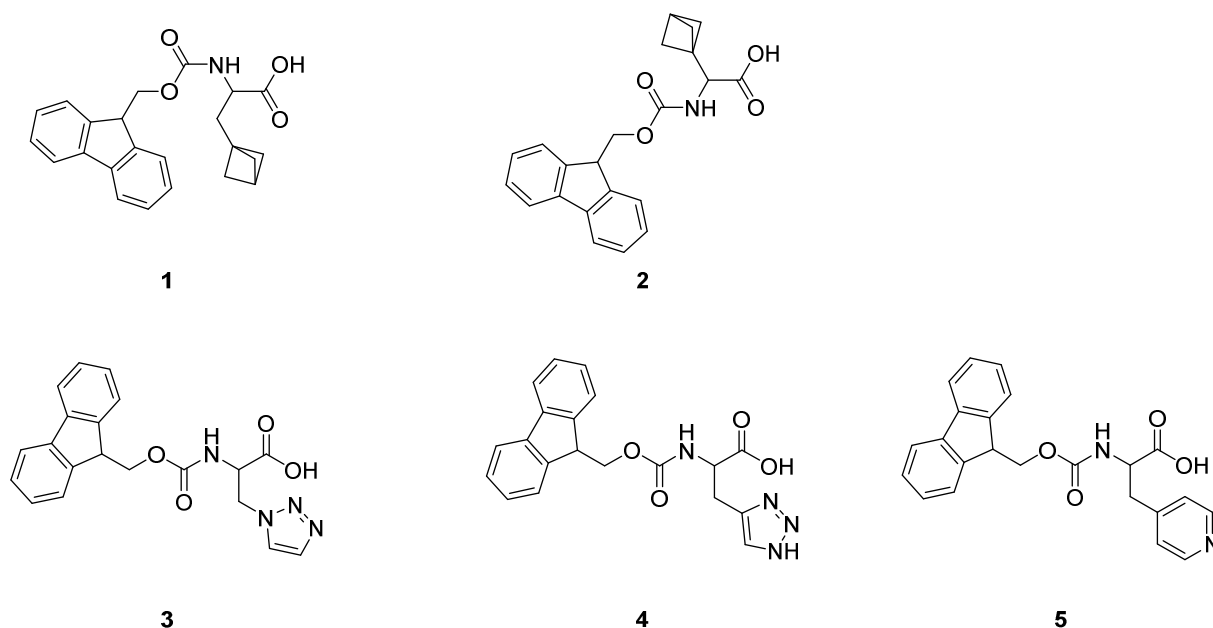


Рис. 1 Цільові амінокислоти

Для досліджень були отримані обидва енантіомери, оскільки, як було описано в теоретичній частині, обернення конфігурації певних амінокислот у аналогах Граміцидину S часто приводила до кардинальних змін біологічної активності сполук.

Сполука **2** (обидва енантіомери) були надані групою Сергія Кохана для отримання на їх основі міметиків Граміцидину S. Для отримання амінокислоти **1** була використана реакція [1,1,1] пропелану з метиловим естером NBoc йод аланіну. Отримана речовина вводилась у реакцію відновного дегалогенування,

після перетворення функціональних груп отримували цільову речовину (Схема 1).

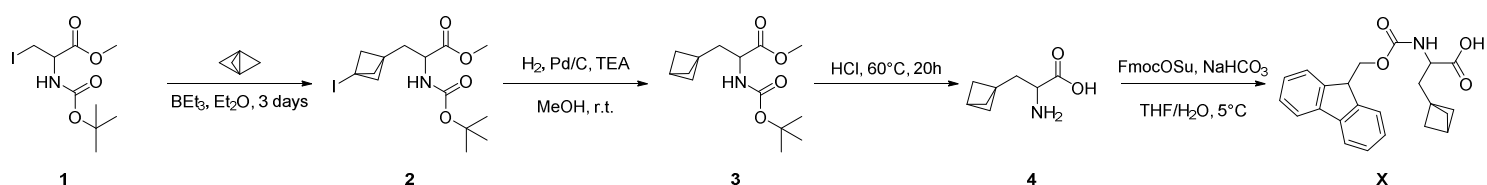


Схема 1 Синтез амінокислоти **1** ( у схемі позначена літерою **X**)

Обидва енантіомери комерційно доступні у відносно великій кількості, розчин [1,1,1] пропелану в ефірі отримували при взаємодії 1,1-дибром-2,2-хлорметилциклопропану з метиллітієм після дистиляції при пониженому тиску в колбу, температура у якій не перевищувала  $-60^{\circ}\text{C}$ . Реакцію дегалогенування проводили в актоклаві при тиску водню 5 атмосфер у присутності паладію(0) та триетиламіну як основи, що давало кількісний вихід та відсутність побічних продуктів реакції.

Сполуку **3** отримували через діазотрансфер та циклізацію Хюсгена з комерційно доступної моно-Вос похідної діамінокислоти (Схема 2).

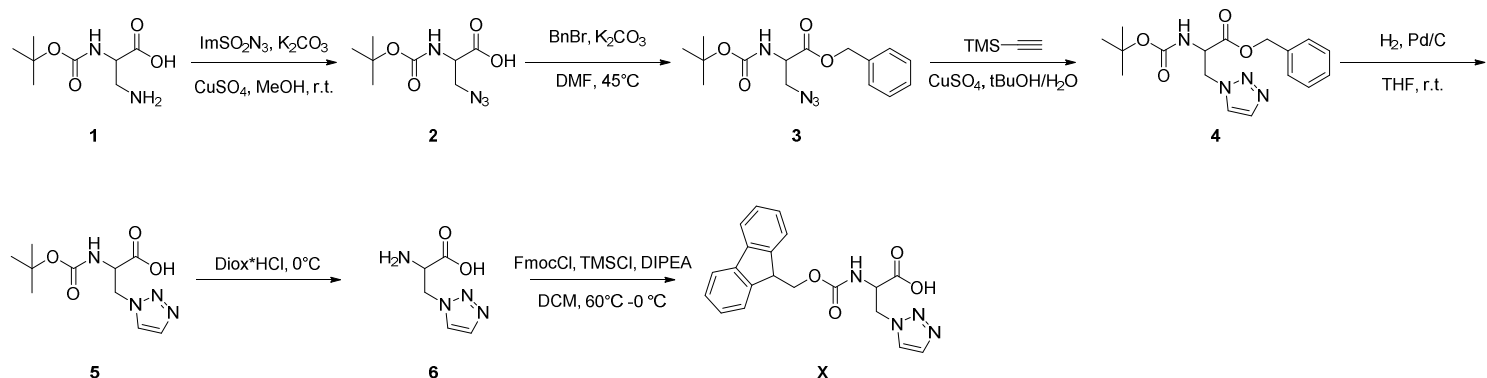


Схема 2 Синтез амінокислоти **3** (у схемі позначена літерою **X**)

Для отримання амінокислот **4** також була використана реакція [3+2] циклоприєднання. Для циклізації використовували триметалсиліл азид та мідний каталіз (Схема 3).

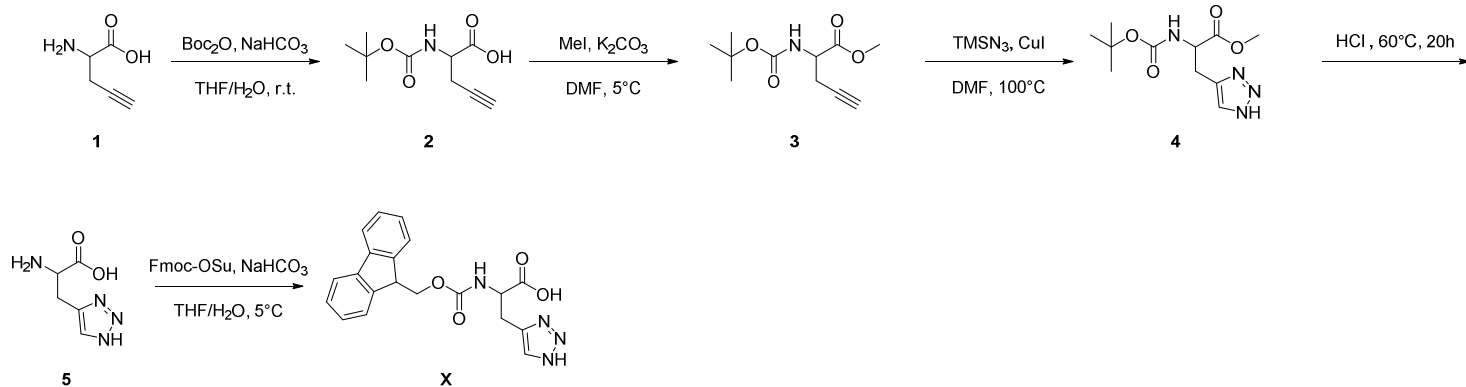


Схема 3 Синтез амінокислоти **4** (у схемі позначено літерою **X**)

Енантіомерно чисті амінокислоти **5** отримували за допомогою ензиматичного розщеплення рацемату ацильованої амінокислоти. Рацемат ацильованої амінокислоти отримували алкілюванням етилового естеру дифеніліміноглїцину (Схема 4).

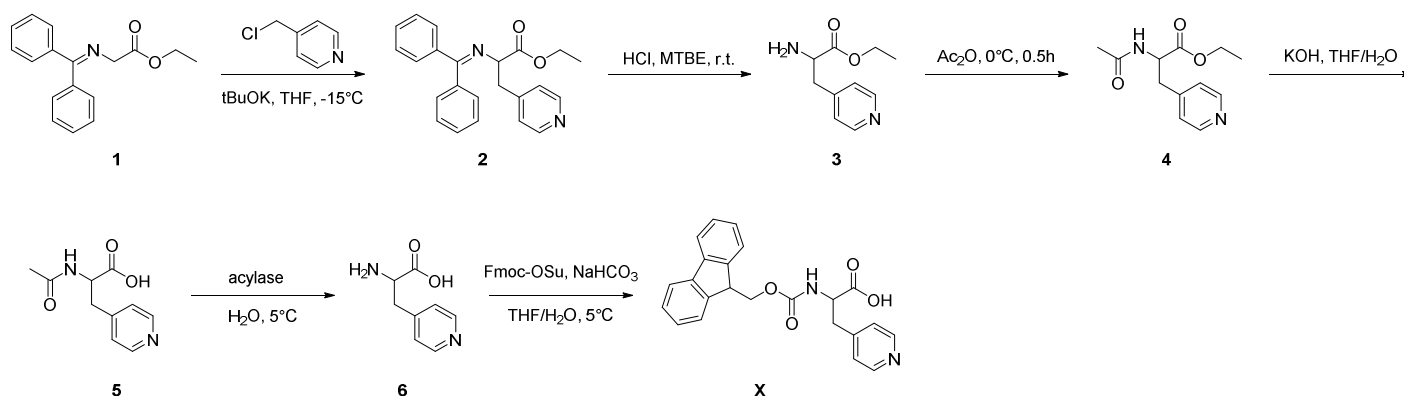


Схема 4 Синтез амінокислоти **5** (у схемі обозначено **X**)

Для отримання міметиків використовували технологію твердофазного пептидного синтезу (SPPS). Послідовність нарощували, починаючи з залишку лейцину, таким чином залишки проліну знаходились посередині послідовності, що запобігало агломерації пептиду та полегшувало циклізацію лінійного прекурсорю. Циклізували пептид у розведеному розчині DMF (C~ 1mM). Отриманий продукт чистили за допомогою ВЕРХ до зняття захистів та після, якщо це було необхідно.

Для отримання міметиків Граміцидину **S** була обрана полістиренова резина з 2-хлоротритилхлоридним лінкером. Такий лінкер дозволяв приєднувати

перший залишок амінокислоти у найбільш м'яких умовах та знімати лінійний пептид із збереженням Boc захисту. Для зняття захисту використовували розчин піпірдину у DMF, проходження реакції контролювали тестом Кайзера чи п-хлоранільним тестом на вторинні аміни при знятті Fmoc з проліну. Іноді, коли тести були неінформативні, з проби резини знімали лінійний пептид за стандартною методикою та аналізували за допомогою LCMS. Для каплінгу використовували надлишок активованих ефірів амінокислот, для отримання активованих ефірів використовували HATU. Для зняття лінійного пептиду використовували суміш HFIP:CHCl<sub>3</sub> (Схема 5).

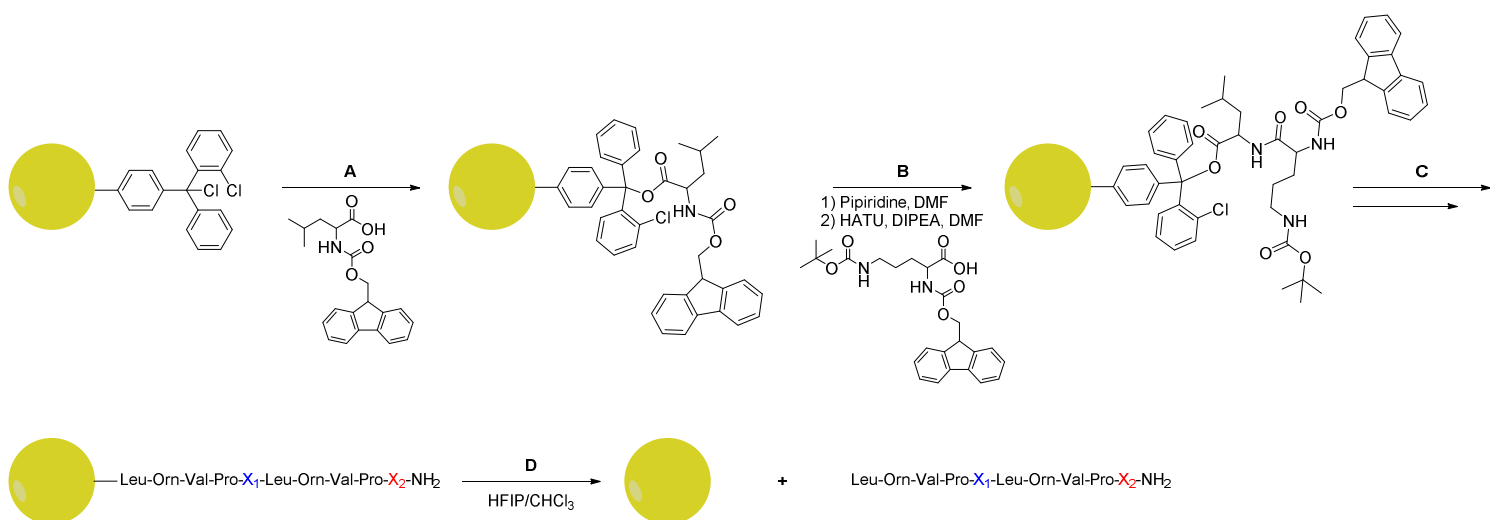


Схема 5 Отримання лінійної послідовності (X<sub>1</sub>- фенілаланін або синтетична амінокислота, X<sub>2</sub>- синтетична амінокислота)

Для циклізації пептиду брали суміш PyBOP/HOBt, як основу використовували DIPEA. Лінійний прекурсор додавали повільно у вигляді розчину в DMF до реакційної суміші. Після упарювання реакційної суміші залишок ліофілізували з розчину в суміші ацетонітрил/вода та чистили за допомогою ВЕРХ градієнтною сумішшю ацетонітрил/вода/TFA. З захищеного пептиду знімали Boc захисти сумішшю TFA/DCM при 0°C.

При спробі наростити лінійну послідовність з енантіомерів синтетичної амінокислоти **3** утворювалась велика кількість домішок та мало цільової речовини через конкурентну реакцію міжмолекулярного ацилювання по NH

тріазольного кільця, тому було вирішено при подальших дослідженнях замінити її на бензильне похідне по NH тріазолу для запобіганню побічних реакцій. З Fmoc амінокислотами **5** виникла проблема виходів на останніх стадіях через гідрофільність похідних піридину, через що поки на її основі похідні Граміцидину S на її основі не отримували. R енантіомер сполуки **2** використали для отримання монозаміщеного міметіку Граміцидину S. Також був одержаний природний Граміцидин S для порівняння біологічної активності (Схема 6).

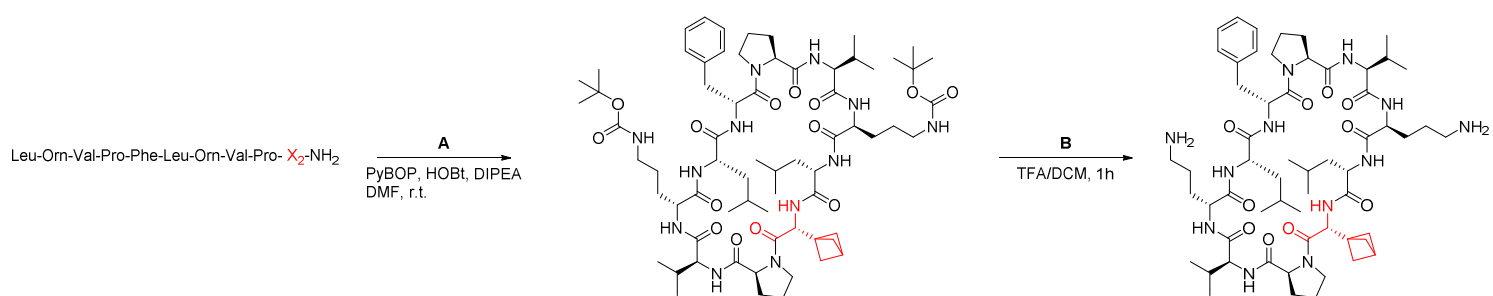


Схема 6 Отримання міметіку з амінокислоти **2**

Речовини аналізували за допомогою LCMS. Як було показано у бакалаврській дипломній роботі, лінійні прекурсори були отримані з гарною чистотою та виходом. Для лінійного природнього Граміцидину S (Рис. 1) та для його міметіку (Рис. 2) були отримані LCMS, де цільові речовини були мажорним продуктом.

MaxPeak: 91.38%  
Ret\_Time: 6.698 min

#	Time	Area%
1	6.698	91.38
2	7.538	8.62

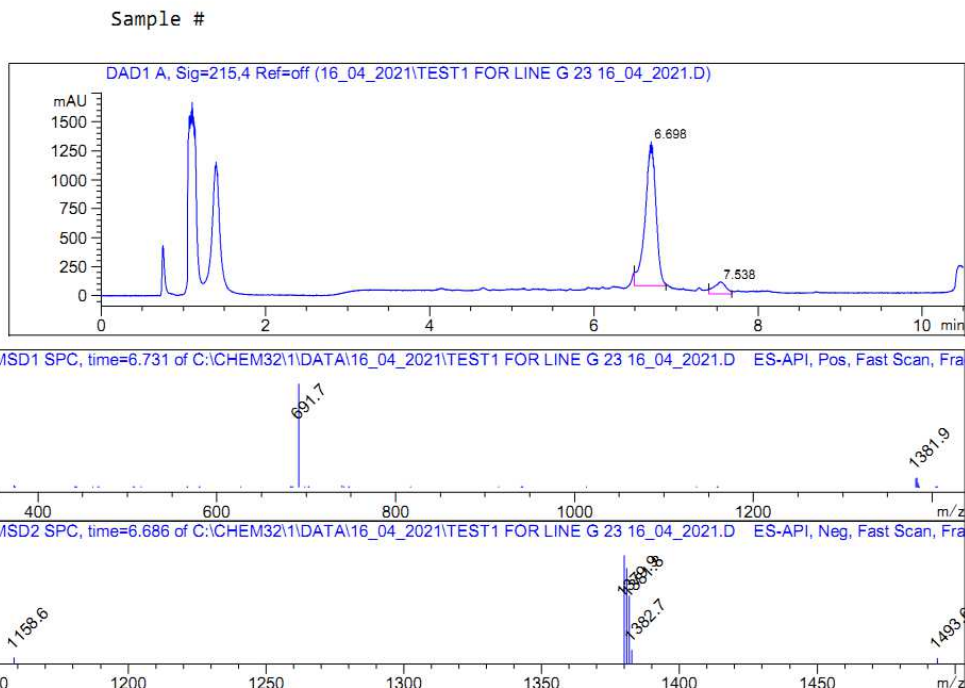


Рис. 1 Лінійної природній Граміцидин S( світиться разом з катіоном натрію)

MaxPeak: 100.00%  
Ret\_Time: 6.938 min

#	Time	Area%
1	6.938	100.00

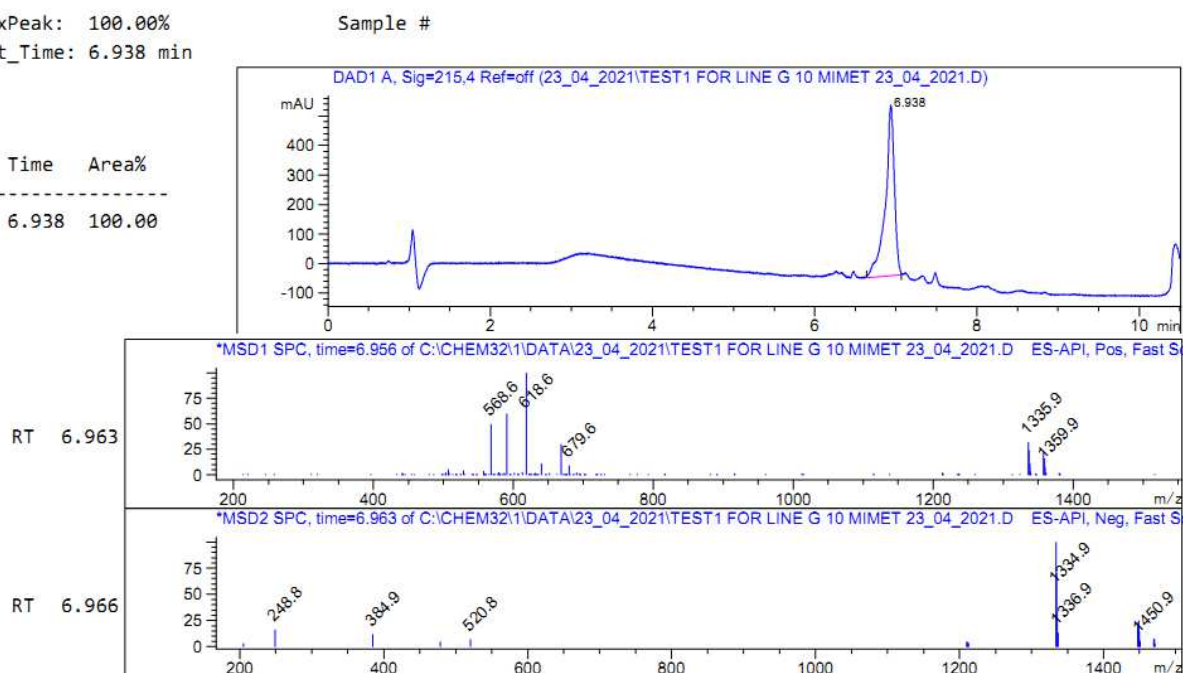


Рис. 2 Лінійний міметик Граміцидину S

Після циклізації ,очистки та зняття захистів отримали природній(Рис. 3)  
Граміцидин S та його міметик(Рис. 4) у виглядїй солей амінів та TFA.

MaxPeak: 100.00%  
Ret\_Time: 4.872 min

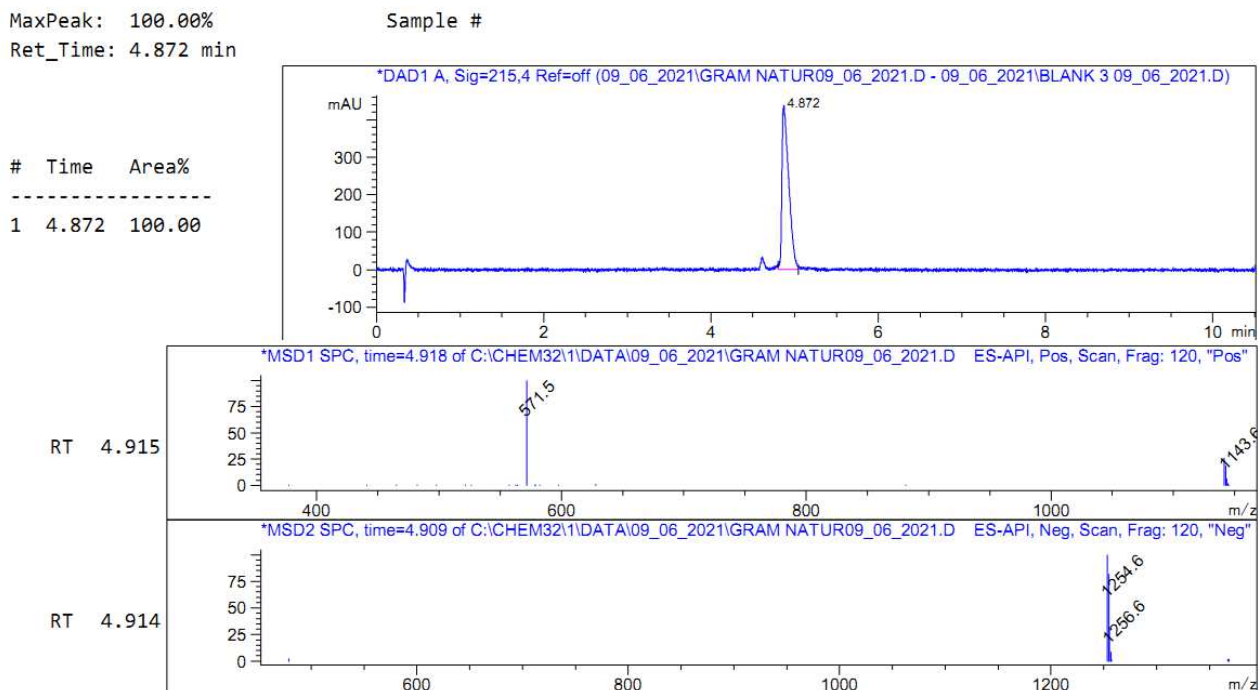


Рис. 3 Природній Граміцидин S

MaxPeak: 100.00%  
Ret\_Time: 4.867 min

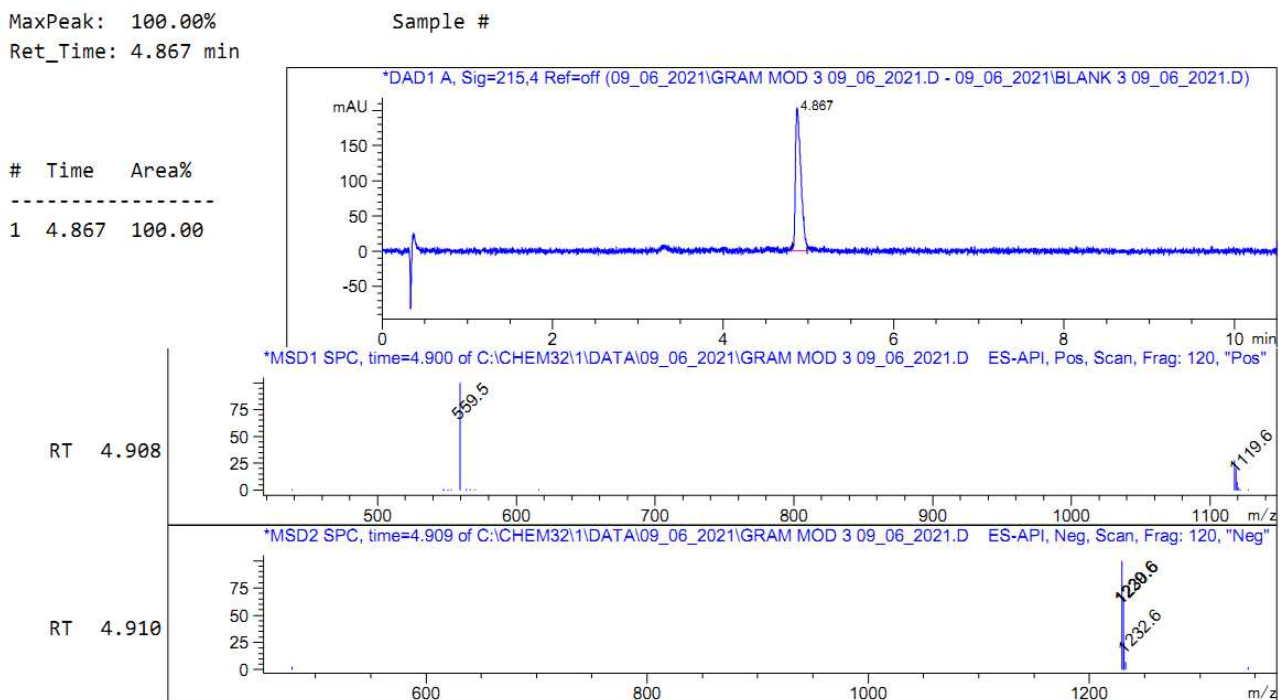


Рис. 4 Міметик Граміцидину S

Для отриманих ЦП провели тести на біологічну активність. Дану частину роботи була виконано у компанії VIENTA Катериною Горбатов. Тести показали, що мембранолітичний ефект обидвох сполук приблизно однаковий.

Дослідження проводили на клітинній лінії MDA-MB-231 (епітеліальні клітини раку молочної залози) за допомогою барвника Hoechst33342, який флуоресцює синім кольором та здатен проникати крізь клітинні мембрани, та барвника пропідій йодида, який здатен інтеркалювати у молекули ДНК та флуоресцювати червоним кольором. Однак, пропідій йодид не може проходити крізь клітинну мембрану, тому він забарвлює ядра клітин тільки тоді, коли клітинна мембрана пошкоджена (Рис. 5).

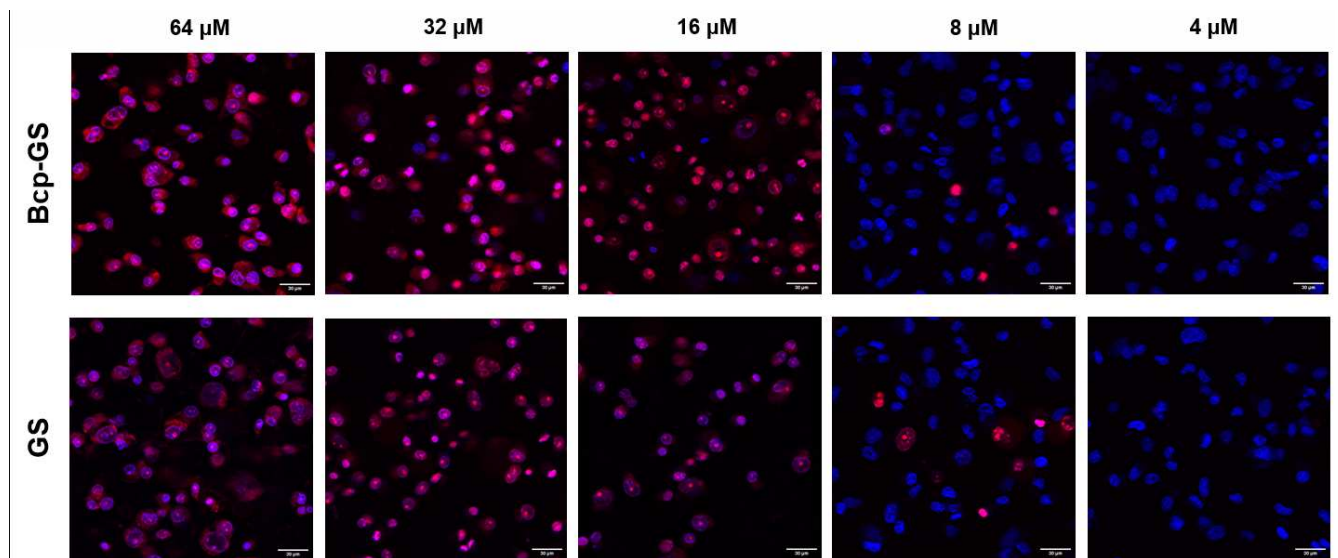
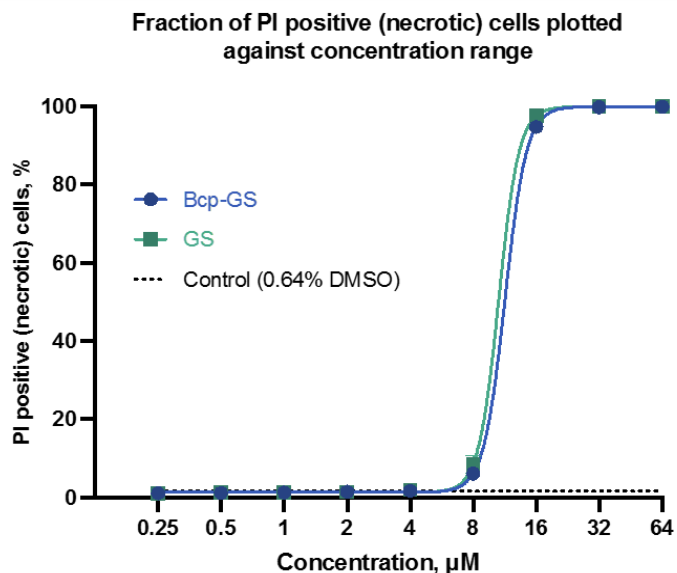


Рис.5 Фотографії у мікроскоп флуоресценції клітин про різних концентраціях ЦП

Після побудови кривої залежності відсотку клітин із зруйнованою мембраною біло отримано  $IC_{50}$  для природного Граміцидину S та його міметіку (Рис. 6). Отримані значення показали, що мембранолітичний ефект у природного Граміцидину S та його міметіку не сильно відрізняється.



Absolute IC <sub>50</sub> , μM	Bcp-GS	GS
Mean	11.35	10.60
SD	0.14	0.32

Рис. 6 Розрахунок IC<sub>50</sub> для цільових сполук

Паралельно були отримані R,R- та S,S-дизаміщені похідні Граміцидину S з амінокислот **1,3**. Ці сполуки були обрані для дослідження впливу заміни радикану фенілу на більш ліпофільний ([1,1,1] біциклопентан) та більш гідрофільний (триазол) залишки (Рис. 7).

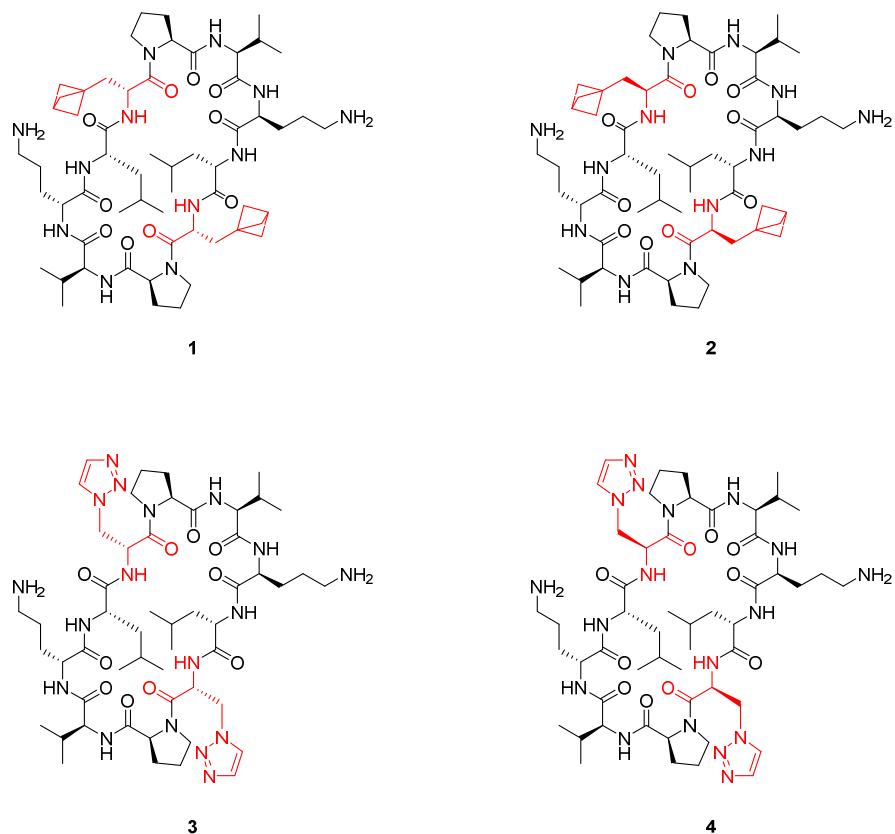


Рис.7 Дизаміщенні міметики Граміцидину S

Цільові сполуки також отримували за допомогою SPPS на полістиреновій резині з 2-хлоротритил хлоридним лінкером. Нажаль, під час ацилювання проліну неприродними амінокислотами було виявлено утворення побічних продуктів, які сильно впливали на чистоту кінцевої лінійної послідовності (Рис. 8,9). Чистота лінійної послідовності впливала на вихід та чистоту сполуки після циклізації, вдалося отримати тільки досить малу кількість фінальних речовин (Рис.10,11).

MaxPeak: 26.89%  
Ret\_Time: 6.725 min

#	Time	Area%
1	6.044	18.24
2	6.725	26.89
3	7.402	21.85
4	7.889	14.41
5	8.070	18.61

Sample #

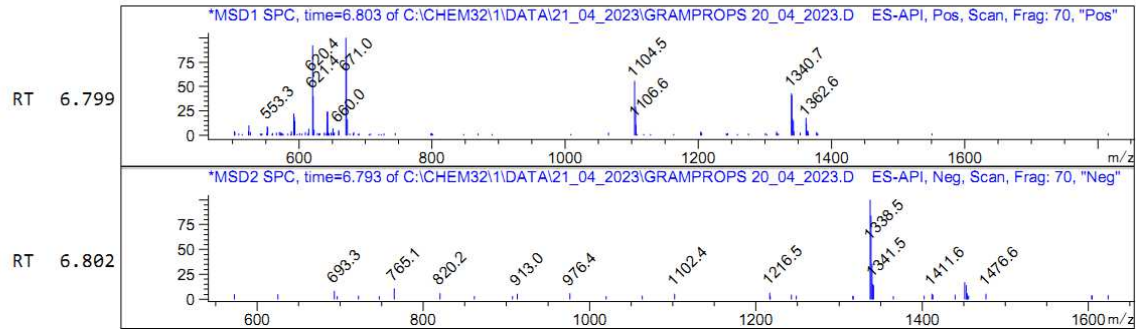
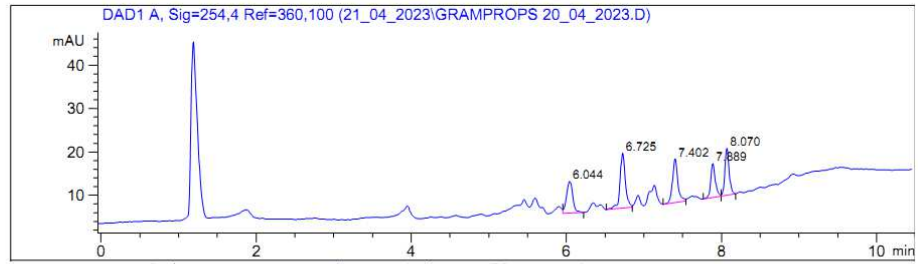


Рис.8 Лінійний пептид дизаміщений амінокислотою 1

MaxPeak: 64.23%  
Ret\_Time: 8.125 min

#	Time	Area%
1	5.944	21.09
2	7.110	14.69
3	8.125	64.23

Sample #

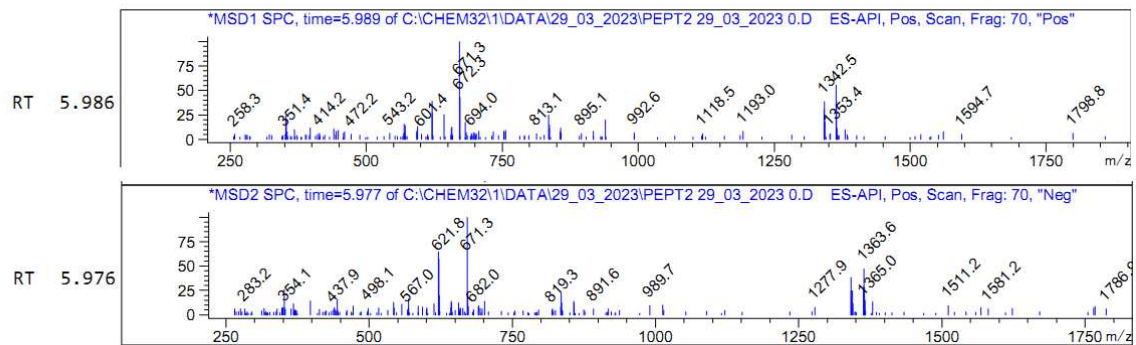
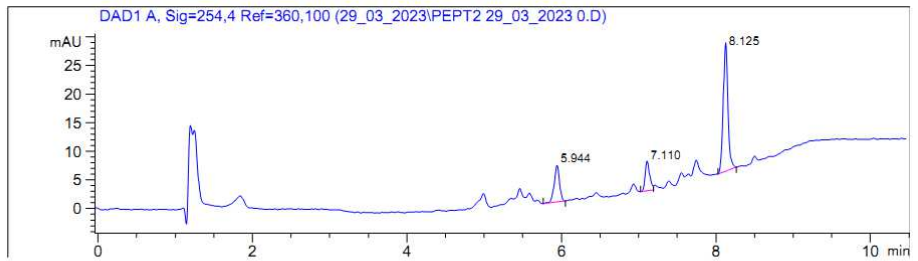


Рис.9 Лінійний пептид дизаміщений амінокислотою 3

MaxPeak: 100.00%  
Ret\_Time: 6.007 min

#	Time	Area%
1	6.007	100.00

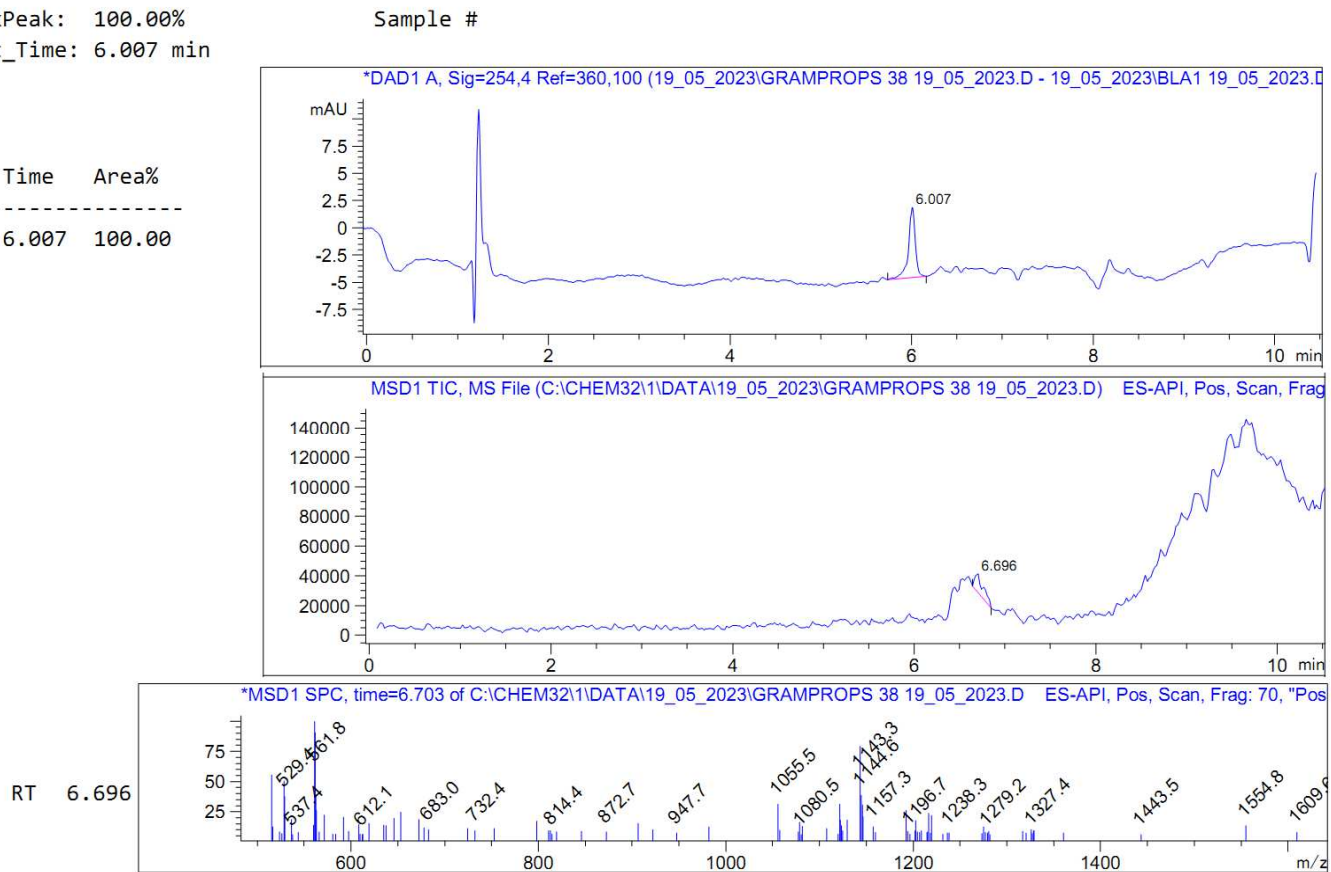


Рис. 10 Міметик Граміцидину S дизаміщений амінокислотою 1

MaxPeak: 100.00%  
Ret\_Time: 5.543 min

#	Time	Area%
1	5.543	100.00

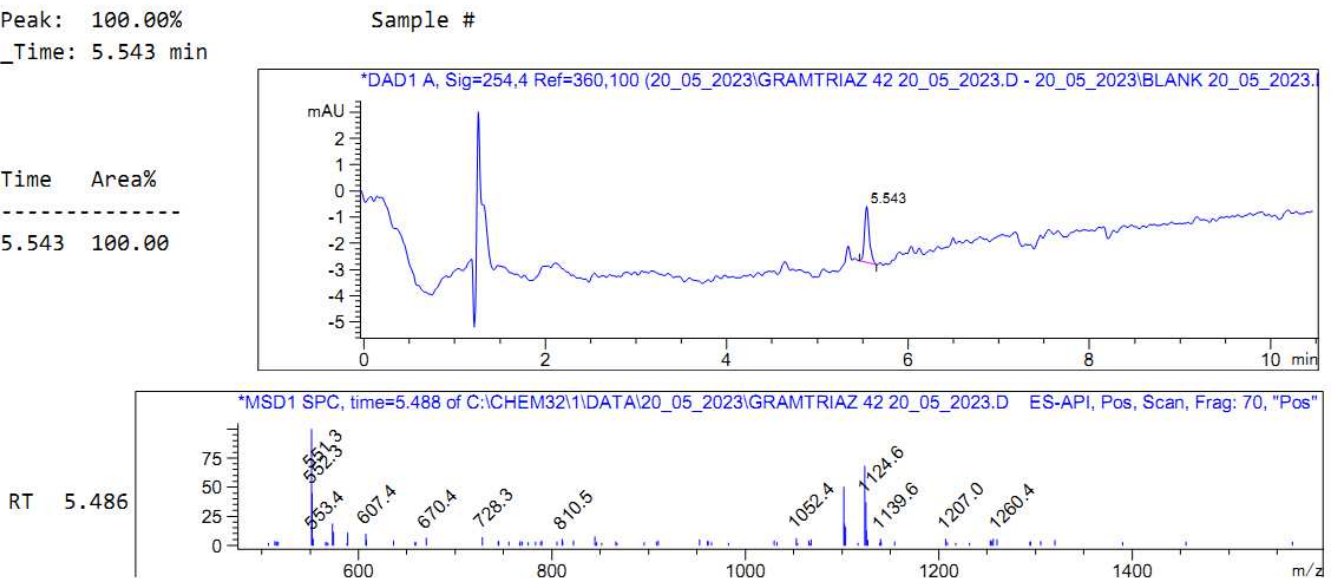


Рис. 11 Міметик Граміцидину S дизаміщений амінокислотою 3

### Розділ 3. Експериментальна частина

Методи нарощування пептидної послідовності ,аналізу проміжних результатів та зняття пептиду з резини були взяті з книги W. C. Chan, P. D. White «Fmoc solid phase peptide synthesis».

#### Приєднання першої Fmoc захищеної амінокислоти до резини

- В реакторі для твердофазного синтезу змішали 2-хлоротритил хлоридну смолу (1.4 г ,1 - 1.8 ммол/г) та DCM (20 мл.), перемішували 30 хв, фільтрувати DCM.
- Додали розчин Fmoc-Leu (1.3 г) та DIPEA (1.25 мл) у DCM (8 мл). Мішали 30 хвилин при r.t. та фільтрували. Процедуру повторили двічі .
- Смолу мили DMF (2x 5 мл).
- Додали суміш DCM/MeOH/DIPEA (8 мл 16:4:1), перемішували 15 хвилин, фільтрували .Процедуру повторили двічі.
- Промили смолу DMF (3x 5 мл)
- Додали 20% розчин піпіридину у DMF (15 мл), мішали 15 хвилин, відфільтрували ,додали таку ж кількість розчину піпіридину у DMF, перемішували 10 хвилин, відфільтрували, знову додали таку ж кількість розчину, перемішували 5 хвилин, відфільтрували.
- Мили смолу DMF (5 мл) 6- 10 разів, фільтрували
- Провели тест Кайзера на пробі резини ( при нагрівання резини з тестовою сумішшю частинки резини забарвлювались у синій колір) або п-хлоранільний тест при знятті Fmoc з проліну( при змішуванні з тестовою сумішшю частинки резини забарвлювались у синій колір). У випадку негативного результату тесту з проби резини знімали пептид та аналізували за допомогою LCMS

**Отримання активованого ефіру Fmoc амінокислоти, ацилювання амінокислотної послідовності на резині**

- У скляну колбу помістили Fmoc-амінокислоту (5 екв. Для природніх та 2-3 екв. Для синтетичних) та HATU (10 екв.)
- Додали мінімальний об'єм DMF до повного розчинення. Додали DIPEA (10 екв.)
- Додали розчин до резини з цільовою послідовністю амінокислот після зняття Fmoc
- Мішали 30 хвилин, фільтрували. Процедуру повторили двічі
- На пробі резини проводили тест Кайзера, п-хлоранільний тест чи аналіз LCMS в залежності від отриманого результату

### **Зняття лінійного пептиду зі смоли**

- Додати до резини у реактор для твердофазного синтезу суміш HFIP:CHCl<sub>3</sub> (6 мл, 1:3) мішати 2 години. Процедуру повторити двічі
- Відфільтрувати резину, промити чистим HFIP та DCM
- Об'єднати фільтрат, упарити, розчинити у суміші ацетонітрил/ вода, ліофілізувати

### **Циклізація лінійного пептиду**

- Дегазувати DMF (180 мл), додати до нього PyBOP (0.6 г), HOBT (0.15 г) та DIPEA (0.6 мл). До отриманої суміші повільно прикапати розчин лінійного пептиду (0.3 г) у DMF (2 мл). Перемішувати реакційну суміш протягом 36 годин
- Упарити DMF, розчинити у суміші ацетонітрил/вода, ліофілізувати
- Чистити градієнтною сумішшю ацетонітрил/вода /TFA на ВЕРХ

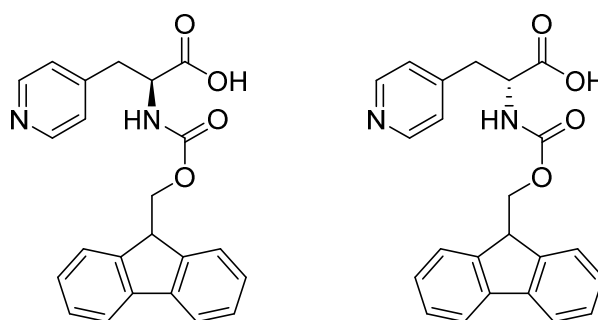
### **Методика для зняття захисних груп з циклічного пептиду**

- Розчинити пептид (50 мг) у DCM (1 мл) та охолодити до 0°C.
- Додати TFA (1 мл) та залишити на 1 годину.
- Упарити суміш, розчинити у суміші ацетонітрил/вода, ліофілізувати
- Чистити градієнтною сумішшю ацетонітрил/вода/TFA на ВЕРХ

Спектри ЯМР  $^1\text{H}$  записані при стандартних умовах на спектрометрах Bruker 600MHz . Як розчинники використовували DMSO  $d_6$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ . Для проведення реакцій використовували абсолютні розчинники. LCMS отримані на приборі , Agilent Technologies 1200 Series методом електронного удару.

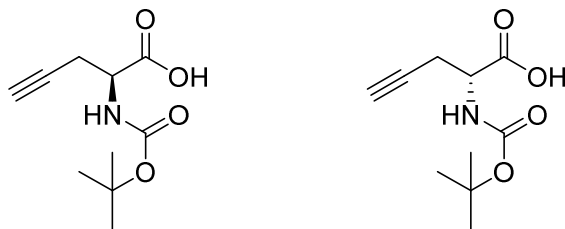
Синтез амінокислоти **3** було повністю описано у бакалаврській роботі. Синтез амінокислоти **5** також був описаний до стадії Fmoc захисту амінокислоти.

S та R 2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)-3-(піридин-4-іл)пропанова кислота



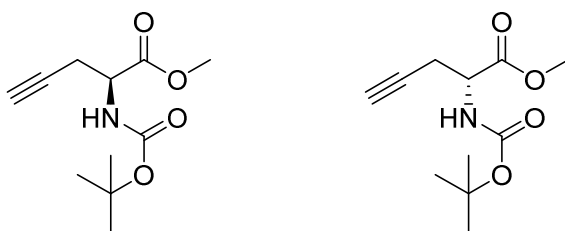
Гідрохлорид S- 2-аміно-3-(піридин-4-іл)пропанової кислоти (2 г, 10 ммол) розчинили у суміші THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (40 мл, 1:1) та охолодили до  $5^\circ\text{C}$ . До суміші повільно додали  $\text{NaHCO}_3$  (4 г, 47.3 ммол) та Fmoc-OSu (5 г, 14.8 ммол). Реакційну суміш перемішували ніч ,потім THF упарили. Воду мили MTBE (4x 10 мл), потім підкислили сухою лимонною кислотою до pH 5 та екстрагували а EtOAc (4x 15 мл). Органічну фазу промили водою (6x 2 мл) ,сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ,упарили, отримали 0.6 г (Вихід 15.5%), коричневий порошок:  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, DMSO  $d_6$ ),  $\delta$ : 2.56 (s,1H ,CH-CH $_2$ -O-C(O)-NH), 2.87 (m,1H ,NHFmoc-CH-CH $_2$ ), 3.08 (m,1H , NHFmoc-CH-CH $_2$ ), 4.2 (m,3H , CH-CH $_2$ -O-C(O)-NH, NHFmoc-CH-CH $_2$ ), 7.38-7.86 (m,11H, Py, Fmoc), 8.43 (d, 2H, Py ), MS (LCMS) 389 ( $\text{MH}^+$ ).

S та R 2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пент-4-інова кислота



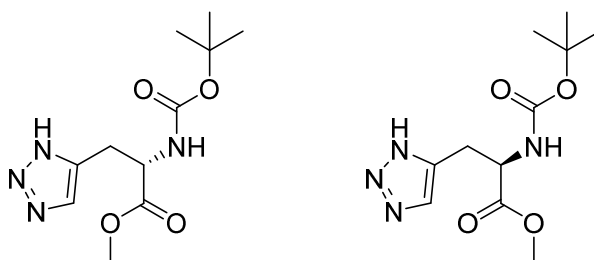
(R)-2-амінопент-4-інова кислоту (1.5 г, 13 ммол) розчинили у воді (15 мл) та додали  $\text{NaHCO}_3$  (1.33 г, 16 ммол). До суміші прикапали розчин  $\text{Voc}_2\text{O}$  (3.4 мл, 14.3 ммол) у THF (8 мл) та перемішували ніч. THF упарили, воду промили MTBE (2x 5 мл), підкислили  $\text{NaHSO}_4$  та екстрагували у DCM (3x 15 мл). Органічну фазу сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упарили, отримали 2.5 г (Вихід 88%), безбарвне масло:  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 1.43 (s, 9H, tBu), 2.05 (s, 1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 2.75 (m, 2H,  $\text{NHVoc-CH-CH}_2$ ), 4.47 (m, 1H,  $\text{NHVoc-CH-CH}_2$ ), 5.37 (s, 1H, NH), 9.4 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), MS (LCMS) 157 ( $\text{MH}^+$ -tBu).

#### S та R метил -2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пент-4-іноат



R 2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пент-4-інову кислоту (2.5 г, 11.7 ммол) розчинили у DMF (13 мл) та охолодили до  $5^\circ\text{C}$ . До суміші додали  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.62 г, 11.7 ммол) та вимішали 15 хвилин, потім додали метил йодид (0.75 мл, 12 ммол). Після 5 годин перемішування при  $10^\circ\text{C}$  додали другу порцію метил йодиду (0.75 мл, 12 ммол) т залишили на ніч. DMF упарили, залишок розчинили у суміші EtOAc (30 мл) та води (5 мл), воду промили EtOAc (2x 5 мл), об'єднану органічну фракцію мили водою (4x 3 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упарили, отримали 2.5 г (Вихід 94%), жовтувате масло:  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMCO d}_6$ ),  $\delta$ : 1.37 (s, 9H, tBu), 2.56 (m, 2H,  $\text{NHVoc-CH-CH}_2$ ), 2.87 (s, 1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3.62 (s, 3H,  $\text{O-CH}_3$ ), 4.13 (m, 1H,  $\text{NHVoc-CH-CH}_2$ ), 7.3 (d, 1H, NH), MS (LCMS) 171 ( $\text{MH}^+$ -tBu).

S та R метил-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-(1H-1,2,3-тріазол-5-іл)пропаноат



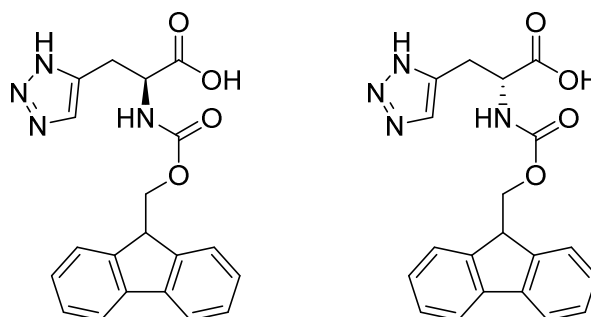
R метил -2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пент-4-іноат (2.5 г, 11 ммол) розчинили у суміші DMF/MeOH (11 мл, 10:1). Через отриманий розчин барбатували аргон протягом 0.5 хвилини, потім додали триметилсиліл азид (2.2 мл, 16.5 ммол) та CuI (60 мг, 0.55 ммол). Отриману суміш закрили герметично кришкою та гріли 100°C ніч. Розчин упарили, додали етилацетат (50 мл) та воду (10 мл) та фільтрували. Отриманий розчин розділили, органічну фазу промили насиченим розчином NaCl (2x 3 мл) сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упарили, сушили на високому вакуумі, отримали 2.77 г (Вихід 93%), жовтувате масло: <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, DMSO d<sub>6</sub>), δ: 1.34 (s, 9H, tBu), 2.97- 3.05 (ddd, 2H, NH<sub>Boc</sub>-CH-CH<sub>2</sub>), 3.61 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 4.25 (m, 1H, NH<sub>Boc</sub>-CH-CH<sub>2</sub>), 7.28 (s, 1H, Triaz), 7.55 (s, 1H, Triaz-NH), MS (LCMS) 214 (MH<sup>+</sup> -tBu).

S та R 2-аміно-3-(1H-1,2,3-тріазол-5-іл)пропанова кислота



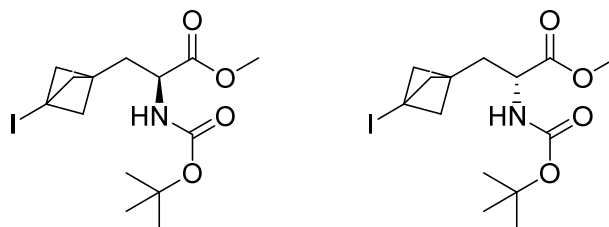
До R метил-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-((1H-1,2,3-тріазол-5-іл)пропаноат (2.77 г, 10.26 ммол) додали перегнану HCl (30 мл, 20%) та гріли 60°C 24 години. Отриманий водний розчин промили DCM (3x 8 мл) та упарили, сушили на високому вакуумі над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, отримали 1.3 г у вигляді гідрохлориду (Вихід 66%), білі кристали: <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, DMSO d<sub>6</sub>), δ: 3.24 (m, 2H, NH<sub>Boc</sub>-CH-CH<sub>2</sub>), 4.18 (m, 1H, NH<sub>Boc</sub>-CH-CH<sub>2</sub>), 7.72 (s, 1H, Triaz), 8.48 (s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), MS (LCMS) 171 (MH<sup>+</sup>).

S та R 2-((((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)-3-(1H-1,2,3-тріазол-5-іл)пропанова кислота



Гідрохлорид R 2-аміно-3-(1H-1,2,3-тріазол-5-іл)пропанової кислоти (1.3 г, 6.75 ммол) розчинили у суміші THF/H<sub>2</sub>O (26 мл, 1:1) та охолодили до 5°C. До суміші повільно додали NaHCO<sub>3</sub> (1.4 г, 16.87 ммол) та Fmoc-OSu (3.15 г, 9.36 ммол). Реакційну суміш перемішували ніч, потім THF упарили. Воду мили MTBE (4x 6 мл), потім підкислили NaHSO<sub>4</sub> та відфільтрували. Осад мили водою на фільтрі та сушили на високому вакуумі над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, отримали 1.6 г (Вихід 59%), коричневі кристали: <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, DMSO d<sub>6</sub>), δ: 1.53 (s, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O-C(O)-NH), 3 (m, 1H, NHFmoc-CH-CH<sub>2</sub>), 3.13 (m, 1H, NHFmoc-CH-CH<sub>2</sub>), 4.22 (m, 3H, CH-CH<sub>2</sub>-O-C(O)-NH, NHFmoc-CH-CH<sub>2</sub>), 7.17-7.86 (m, 11H, Fmoc, Triaz), MS (LCMS) 380 (MH<sup>+</sup>).

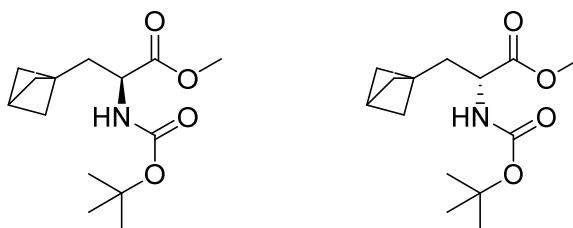
S та R метил 2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-(3-йодобіцикло[1.1.1]пентан-1-іл)пропаноат



1,1 дибром, 2,2 дихлорметил циклопропан (9 г, 30.6 ммол) розчини в диетиловому етері, охолодили до -60°C та прикапали розчин 1.6M метиллітію в диетиловому етері (21 мл, 33.6 ммол) при цій температурі під потоком аргону. Після додавання метил літію реакційну суміш перемішували при -60°C 1 годину,

потім дали нагрітись до 0°C та перемішували ще годину. Реакційну суміш переганяли у темряві ,при тиску 4-5 мбар у охолоджену до -80°C колбу з метил (R)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-йодопропаноатом (3 г, 9.1 ммол) . Після перегонки до розчину додали розчин 1М триетилборану у гексані (2 мл, 2 ммол), через розчин барбатували аргон ,закрили герметично кришкою та давали вимішатись 3 доби. Розчинник упарили, залишок перетерли з холодною сумішшю Нех/EtOAc (9:1) та сфільтрували, отримали 2.4 г (Вихід 66%), білі кристали: : <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>), δ: 1.44 (s,9H ,tBu), 1.85 (dd,1H ,NHВос-CH-CH<sub>2</sub>), 2.1 (dd,1H ,NHВос-CH-CH<sub>2</sub>), 2.24 (s,6H ,(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 3.73 (s,3H ,O-CH<sub>3</sub>), 4.28 (m,1H , NHВос-CH-CH<sub>2</sub>), 5 (s,1H ,NH), MS (LCMS) 397 (MН<sup>+</sup>).

S та R метил 3-(біцикло[1.1.1]пентан-1-іл)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пропаноат



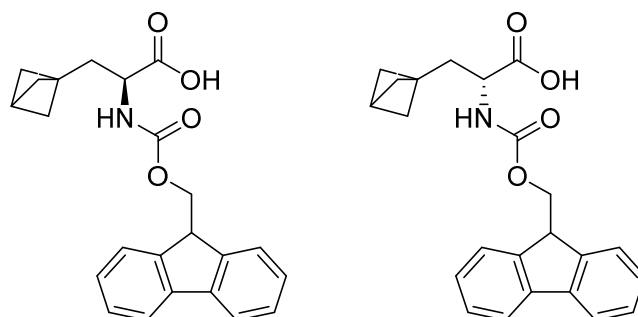
R метил 2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-(3-йодобіцикло[1.1.1]пентан-1-іл)пропаноат (2.4 г, 6 ммол) розчинили у метанолі (25 мл) ,додали триетиламін (1.67 мл, 18 ммол) та Pd/C (50 мг, 10%). Реакційну суміш перемішували у автоклаві під тиском водню (5 бар) ніч. Суспензію фільтрували, розчин упарили та додали EtOAc (50 мл). Отриману органічну фазу мили водою (3x 5 мл) сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ,упарили, отримали 1.3 г (Вихід 80%), жовте масло: <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>), δ: 1.44 (s,9H ,tBu), 1.72 (s,6H ,(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 1.79 (dd,1H ,NHВос-CH-CH<sub>2</sub>), 1.94 (dd,1H ,NHВос-CH-CH<sub>2</sub>), 2.44 (s,1H ,CH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 3.72 (s,3H ,O-CH<sub>3</sub>), 4.3 (m,1H , NHВос-CH-CH<sub>2</sub>), 4.92 (s,1H ,NH), MS (LCMS) 213 (MН<sup>+</sup> -tBu).

S та R 2-аміно-3-(біцикло[1.1.1]пентан-1-іл)пропанова кислота



До **R** метил 3-(біцикло[1.1.1]пентан-1-іл)-2-((трет бутоксикарбоніл) аміно)пропаноату (1.3 г, 4.8 ммол) додали перегнану HCl (20 мл, 20%) та гріли 60°C 24 години. Отриманий водний розчин мили DCM (3x 5 мл) та упарили, сушили на високому вакуумі над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, отримали 0.83 г у вигляді гідрохлориду (Вихід 90%), білі кристали: <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, DMSO d<sub>6</sub>), δ: 1.73 (s, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 1.95 (m, 2H, NH<sub>2</sub>oc-CH-CH<sub>2</sub>), 2.42 (s, 1H, CH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 3.76 (m, 1H, NH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>), 8.33 (s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), MS (LCMS) 156 (MН<sup>+</sup>).

**S** та **R** 2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)-3-(біцикло[1.1.1]пентан-1-іл)пропанова кислота



Гідрохлорид **R** 2-аміно-3-(біцикло[1.1.1]пентан-1-іл)пропанової кислоти (0.83 г, 4.3 ммол) розчинили у суміші THF/H<sub>2</sub>O (16 мл, 1:1) та охолодили до 5°C. До суміші повільно додали NaHCO<sub>3</sub> (1.1 г, 12.9 ммол) та Fmoc-OSu (1.9 г, 5.6 ммол). Реакційну суміш перемішували ніч, потім THF упарили. Воду мили MTBE (4x 3 мл), потім підкислили NaHSO<sub>4</sub> та екстрагували а EtOAc (4x 15 мл). Органічну фазу промили водою (3x 2 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упарили, залишок чистили за допомогою флеш хроматографії (MTBE/Hex, 1:1), отримали 1.1 г (Вихід 67%), рожеві кристали: <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>), δ: 1.24 (s, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O-C(O)-NH), 1.71 (s, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 1.83 (dd, 1H, NHFmoc-CH-CH<sub>2</sub>), 2 (dd, 1H

,NHFmoc-CH-CH<sub>2</sub>), 2.44 (s,1H ,CH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 4.21 (tr,1H , NHFmoc-CH-CH<sub>2</sub>), 4.38 (m,2H ,CH-CH<sub>2</sub>-O-C(O)-NH), 5.15 (d,1H ,NH), 7.29-7.73 (m,8H ,Fmoc), MS (LCMS) 378 (MH<sup>+</sup>).

## Висновки

1. Було отримано декілька амінокислот- білізостерів фенілаланіну. Заміна бензольного кільця на триазольне збільшує полярність та гідрофільність сполуки, заміщення на [1,1,1] біциклопентановий залишок збільшує ліпофільність сполуки. Дані амінокислоти синтезувались для отримання міметиків Граміцидину S на їх основі та для регулювання фізико-хімічних властивостей Граміцидину S.
2. Був отриманий та охарактеризований монозаміщений [1,1,1] біциклопентановий міметик Граміцидину S. Був досліджений мембранолітичний ефект міметика Граміцидину S у порівнянні з природним ЦП і виявлено, що обидва пептиди мають однаково високу активність.
3. Були синтезовані дизаміщені міметики Граміцидину S з заміщенням бензольного радикалу фенілаланіну на триазольний та [1,1,1] біциклопентильний. Для заміщення були використані обидва енантіомери синтетичних амінокислот для дослідження ефекту зміни конфігурації у бета-повороті ЦП на біологічну активність сполуки.

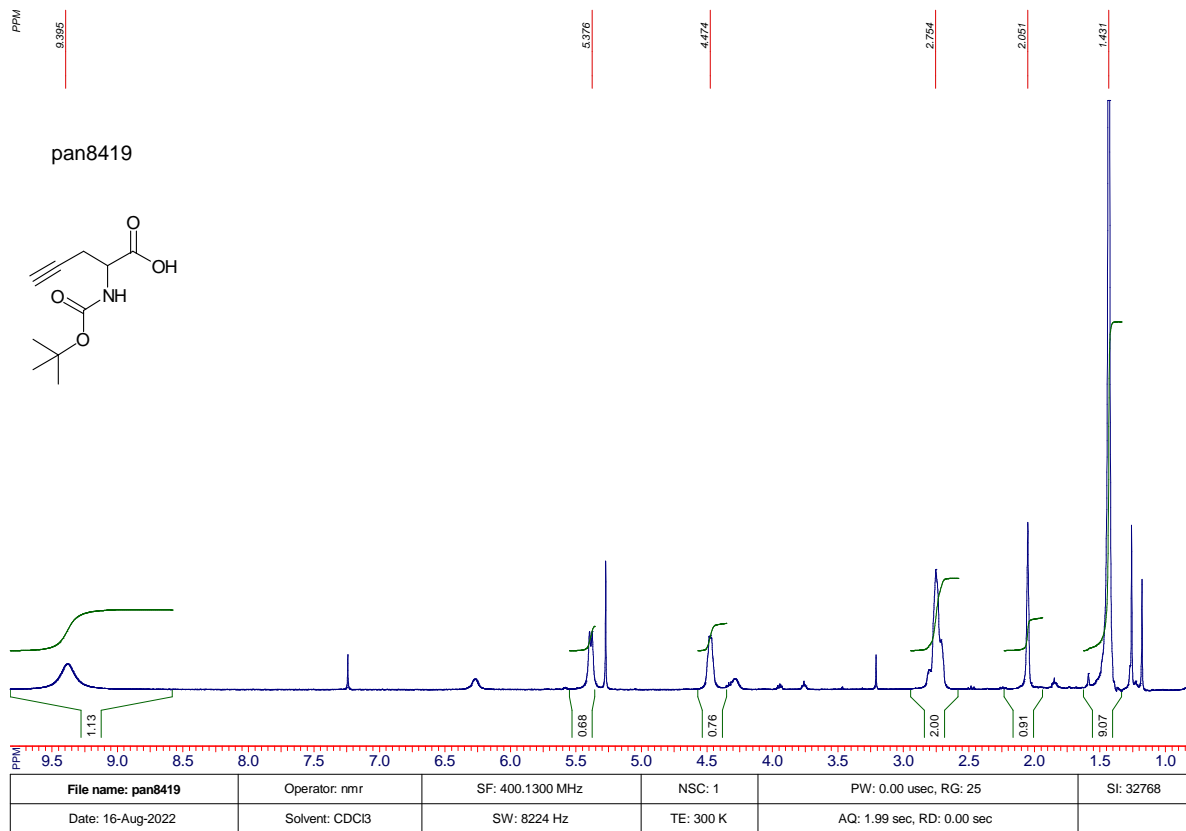
- 1 Alternative binding proteins: Biological activity and therapeutic potential of cystine-knot miniproteins Harald Kolmar FEBS Journal 275 (2008) 2684–2690
- 2 The future of peptide-based drugs David J Craik , David P Fairlie Chem Biol Drug Des . 2013 Jan;81(1):136-47.
- 3 How Valinomycin Ionophores Enter and Transport K<sup>+</sup> across Model Lipid Bilayer Membranes ZhangFei Su, XueQin Ran, J. Jay Leitch : Langmuir 2019, 35, 16935–16943
- 4 L. Pollaro and C. heinis, Strategies to prolong the plasma residence time of peptide drugs, MedChemComm, 2010, 1, 319.
- 5 Staphylococcus aureus nonribosomal peptide secondary metabolites regulate virulence Morgan A Wyatt , Wenliang Wang, Christelle M Roux, Science . 2010 Jul 16;329(5989):294-6.
- 6 P. n. Cheng, C. liu, M. Zhao, d. eisenberg and J. S. nowick, Nat. Chem., 2012, 4, 927
- 11 M Simmaco , G Mignogna, D Barra Biopolymers 1998;47(6):435-50.
- 12 Zasloff, M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms. Nature 2002, 415 (6870), 389–395.
- 13 Matsuzaki, K. Why and how are peptide±lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. Biochim. Biophys. Acta 1462, 1±10 (1999).
- 14 Katsu, T.; Imamura, T.; Komagoe, K.; Masuda, K.; Mizushima, T. Simultaneous Measurements of K<sup>+</sup> and Calcein Release from Liposomes and the Determination of Pore Size Formed in a Membrane. Anal. Sci. 2007, 23 (5), 517–522.
- 15 Gunn, J. S., Ryan, S. S., Van Velkinburgh, J. C., Ernst, R. K. & Miller, S. I. . Infect. Immun. 68, 6139±6146 (2000).
- 16 Dong Wan Lee, Beom Seok Kim Plant Pathol J. 2015 Mar; 31(1): 1–11.
- 17 Cherkupally, P.; Ramesh, S.; de la Torre, B. G.; Govender, T.; Kruger, H. G.; Albericio, F. Immobilized Coupling Reagents: Synthesis of Amides/Peptides. ACS Comb. Sci. 2014, 16(11), 579–601.
- 18 Schmidt, U.; Langner, J. Cyclotrapeptides and Cyclopentapeptides: Occurrence and Synthesis. J. Pept. Res. 1997, 49, 67–73.
- 19 Postma, T. M.; Albericio, F. N-Chlorosuccinimide, an Efficient Reagent for On-Resin Disulfide Formation in Solid-Phase Peptide Synthesis. Org. Lett. 2013, 15, 616–619.
- 20 Cyclization of peptides with two chemical bridges affords large scaffold diversities Sangram S. Kale, Camille Villequey, Nature Chemistry volume 10, pages715–723 (2018)
- 21 (Chemical biology series 6) Jesko Koehnke
- 22 A. tavassoli and s. J. Benkovic, Nat. Protoc., 2007, 2, 1126–1133.
- 23 Y. Goto, t. Katoh and H. suga, Nat. Protoc., 2011, 6, 779–790
- 24 . e. Moellering, M. Cornejo, T. n. davis, C. del Bianco, J. C. aster, S. C. Blacklow, a. l. Kung, d. G. Gilliland, G. l. verdine and J. e. Bradner, Nature, 2009, 462, 182.
- 25 P. M. Cromm, J. Spiegel and T. n. Grossmann, ACS Chem. Biol., 2015, 10, 1362
- 26 Marsault, Eric Peterson, Mark L Practical medicinal chemistry with
- 27 Seigal, B. A.; Connors, W. H.; Fraley, A.; Borzilleri, R. The Discovery of Macrocyclic XIAP Antagonists from a DNA-Programmed Chemistry Library, and Their Optimization to Give Lead Compounds with In Vivo Antitumor Activity. J. Med. Chem. 2015, 58, 2855–2861.

- 
- 33 Gall YM, Konashev MB (2001). "The discovery of Gramicidin S: the intellectual transformation of G.F. Gause from biologist to researcher of antibiotics and on its meaning for the fate of Russian genetics". *History and Philosophy of the Life Sciences*. 23 (1): 137–50
- 34 Pal, S.; Ghosh, U.; Ampapathi, R. S.; Chakraborty, T. K. Recent Studies on Gramicidin S Analog Structure and Antimicrobial Activity. *Top. Heterocycl. Chem.* 2015, 49, 159–202
- 35 Kondejewski, L. H.; Farmer, S. W.; Wishart, D. S.; Hancock, R. E. W.; Hodges, R. S. Gramicidin S Is Active against Both Gram- Positive and Gram-Negative Bacteria. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1996, 47 (6), 460–466.
- 36 Berditsch, M.; Lux, H.; Babii, O.; Afonin, S.; Ulrich, A. S. Therapeutic Potential of Gramicidin S in the Treatment of Root Canal Infections. *Pharmaceuticals* 2016, 9 (3), 56.
- 37 Kevin Lum, Helgi I. Ingólfsson Exchange of Gramicidin between Lipid Bilayers: Implications for the Mechanism of Channel Formation *Biophys J.* 2017 Oct 17; 113(8): 1757–1767.
- 38 Afonin, S.; Durr, U. H. N.; Wadhvani, P.; Salgado, J.; Ulrich, A. S. Solid State NMR Structure Analysis of the Antimicrobial Peptide Gramicidin S in Lipid Membranes: Concentration-Dependent Realignment and Self-Assembly as a  $\beta$ -Barrel. *Top. Curr. Chem.* 2008, 273, 139–154.
- 39 Wenzel, M.; Rautenbach, M.; Vosloo, J. A.; Siersma, T.; Aisenbrey, C. H. M.; Zaitseva, E.; Laubscher, W. E.; van Rensburg, W.; Behrends, J. C.; Bechinger, B.; Hamoen, L. W. The Multifaceted Antibacterial Mechanisms of the Pioneering Peptide Antibiotics Tyrocidine and Gramicidin S. *mBio* 2018, 9 (5), No. e00802-18
- 40 Müller A, Wenzel M, Strahl H, Grein F, Saaki TNV, Kohl B, Siersma T, Bandow JE, Sahl H-G, Schneider T, Hamoen LW. 2016. Daptomycin inhibits bacterial cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E7077–E7086.
- 41 Kondejewski, L. H.; Farmer, S. W.; Wishart, D. S.; Kay, C. M.; Hancock, R. E. W.; Hodges, R. S. Modulation of Structure and Antibacterial and Hemolytic Activity by Ring Size in Cyclic Gramicidin S Analogs. *J. Biol. Chem.* 1996, 271 (41), 25261–25268
- 42 Kondejewski, L. H.; Jelokhani-Niaraki, M.; Farmer, S. W.; Lix, B.; Kay, C. M.; Sykes, B. D.; Hancock, R. E. W.; Hodges, R. S. Dissociation of Antimicrobial and Hemolytic Activities in Cyclic Peptide Diastereomers by Systematic Alterations in Amphipathicity. *J. Biol. Chem.* 1999, 274 (19), 13181–13192.
- 43 Knijnenburg, A. D.; Kapoerchan, V. V.; Spalburg, E.; de Neeling, A. J.; Mars-Groenendijk, R. H.; Noort, D.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Overhand, M. Tuning Hydrophobicity of Highly Cationic Tetradecameric Gramicidin S Analogues Using Adamantane Amino Acids. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18 (23), 8403–8409
- 44 Knijnenburg, A. D.; Kapoerchan, V. V.; Spalburg, E.; de Neeling, A. J.; Mars-Groenendijk, R. H.; Noort, D.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Overhand, M. Tuning Hydrophobicity of Highly Cationic Tetradecameric Gramicidin S Analogues Using Adamantane Amino Acids. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18 (23), 8403–8409.

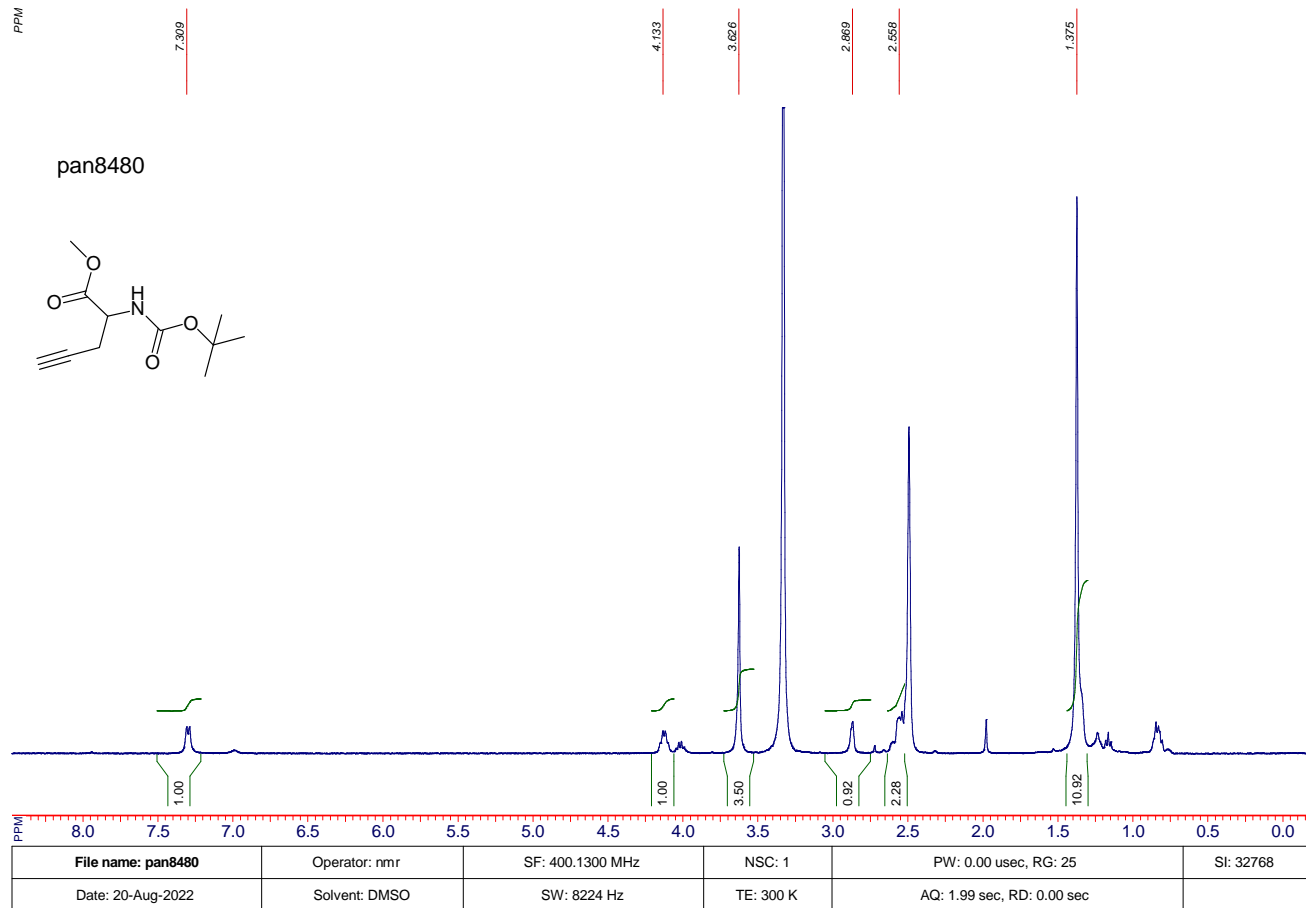
- 
- 45 Li, Y.; Bionda, N.; Yongye, A.; Geer, P.; Stawikowski, M.; Cudic, P.; Martinez, K.; Houghten, R. A. Dissociation of Antimicrobial and Hemolytic Activities of Gramicidin S through N-Methylation Modification. *ChemMedChem* 2013, 8 (11), 1865–1872.
- 46 Kondejewski, L. H.; Farmer, S. W.; Wishart, D. S.; Hancock, R. E. W.; Hodges, R. S. Gramicidin S Is Active against Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1996, 47 (6), 460–466.
- 47 van der Knaap, M.; Lageveen, L. T.; Busscher, H. J.; Mars-Groenendijk, R.; Noort, D.; Otero, J. M.; Llamas-Saiz, A. L.; van Raaij, M. J.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Overhand, M. Evaluation of Readily Accessible Azoles as Mimics of the Aromatic Ring of D-Phenylalanine in the Turn Region of Gramicidin S. *ChemMedChem* 2011, 6 (5), 840–847
- 48 Solanas, C.; de la Torre, B. G.; Fernandez-Reyes, M.; Santiveri, C. M.; Jimenez, M. A.; Rivas, L.; Jimenez, A. I.; Andreu, D.; Cativiela, C. Therapeutic Index of Gramicidin S Is Strongly Modulated by D-Phenylalanine Analogues at the  $\beta$ -Turn. *J. Med. Chem.* 2009, 52 (3), 664–674
- 49 Tamaki, M.; Fujinuma, K.; Harada, T.; Takanashi, K.; Shindo, M.; Kimura, M.; Uchida, Y. Fatty Acyl-Gramicidin S Derivatives with Both High Antibiotic Activity and Low Hemolytic Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22 (1), 106–109.
- 50 Kawai, M.; Yamamura, H.; Tanaka, R.; Umemoto, H.; Ohmizo, C.; Higuchi, S.; Katsu, T. Proline Residue-Modified Polycationic Analogs of Gramicidin S with High Antibacterial Activity against Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria and Low Hemolytic Activity\*: Polycationic Gramicidin S Analogs. *J. Pept. Res.* 2005, 65 (1), 98–104.
- 51 Knijnenburg, A. D.; Spalburg, E.; de Neeling, A. J.; Mars-Groenendijk, R. H.; Noort, D.; Grotenbreg, G. M.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Overhand, M. Ring-Extended Gramicidin S Analogs Containing Cis  $\delta$ -Sugar Amino Acid Turn Mimetics with Varying Ring Size. *Helv. Chim. Acta* 2012, 95 (12), 2544–2561.
- 52 Priem, C.; Wuttke, A.; Berditsch, M.; Ulrich, A. S.; Geyer, A. Scaling the Amphiphilic Character and Antimicrobial Activity of Gramicidin S by Dihydroxylation or Ketal Formation. *J. Org. Chem.* 2017, 82 (23), 12366–12376

## Додаток: Спектри ПМР сполук

### R 2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пент-4-інова кислота



### R метил -2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пент-4-іноат



Метил-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-(1H-1,2,3-тріазол-5-іл)пропаноат

PPM

7.562

7.287

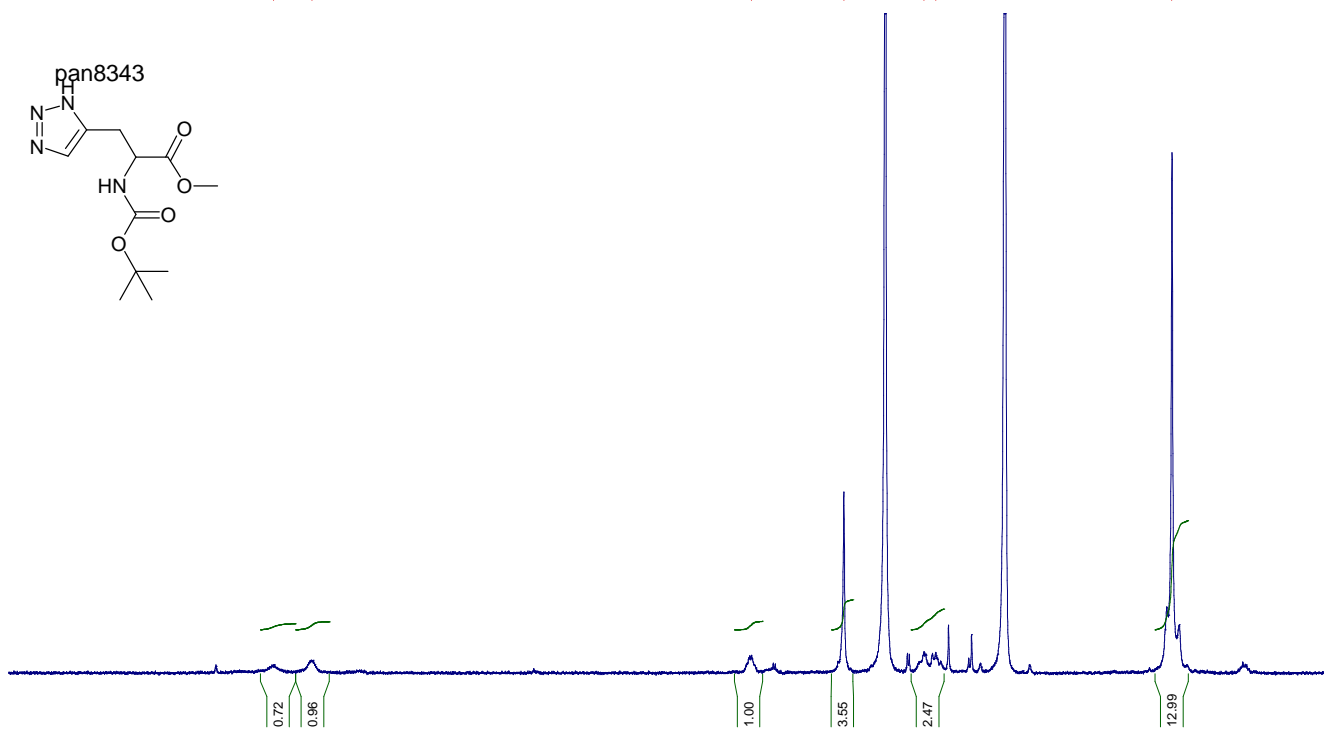
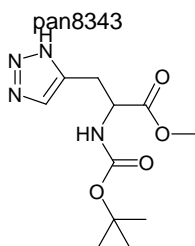
4.251

3.611

3.068

2.977

1.345



File name: pan8343	Operator: nmr	SF: 400.1300 MHz	NSC: 1	PW: 0.00 usec, RG: 25	SI: 32768
Date: 04-Aug-2022	Solvent: DMSO	SW: 8224 Hz	TE: 300 K	AQ: 1.99 sec, RD: 0.00 sec	Parameter file, TOPSPINVersion 2.1

## R 2-аміно-3-(1H-1,2,3-тріазол-5-іл)пропанова кислота

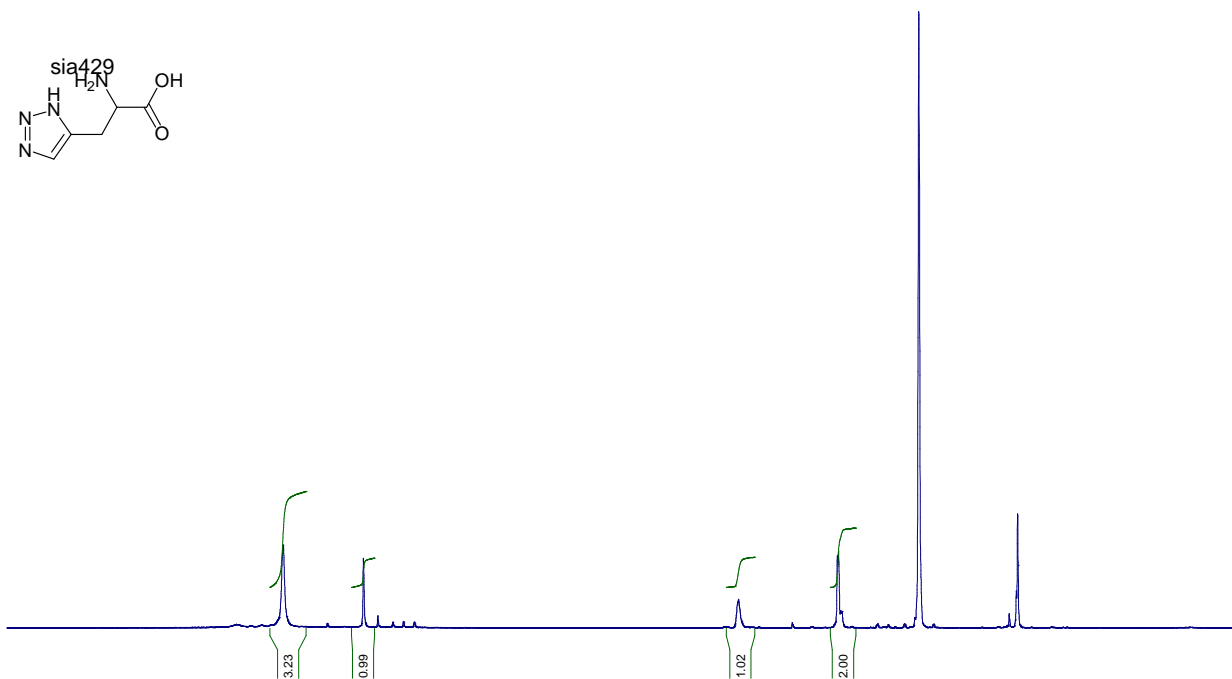
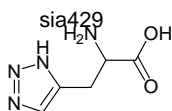
PPM

8.466

7.726

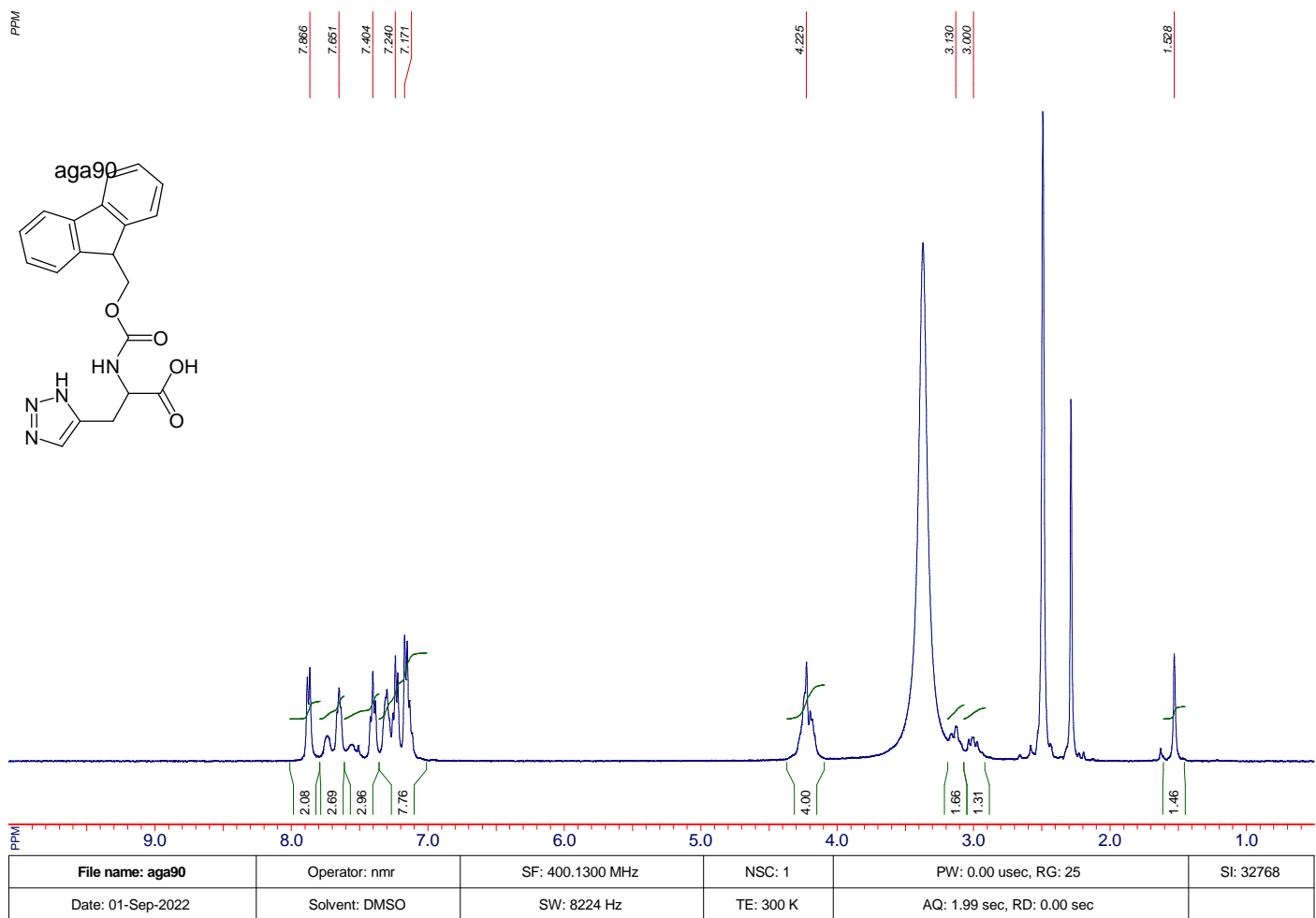
4.104

3.239

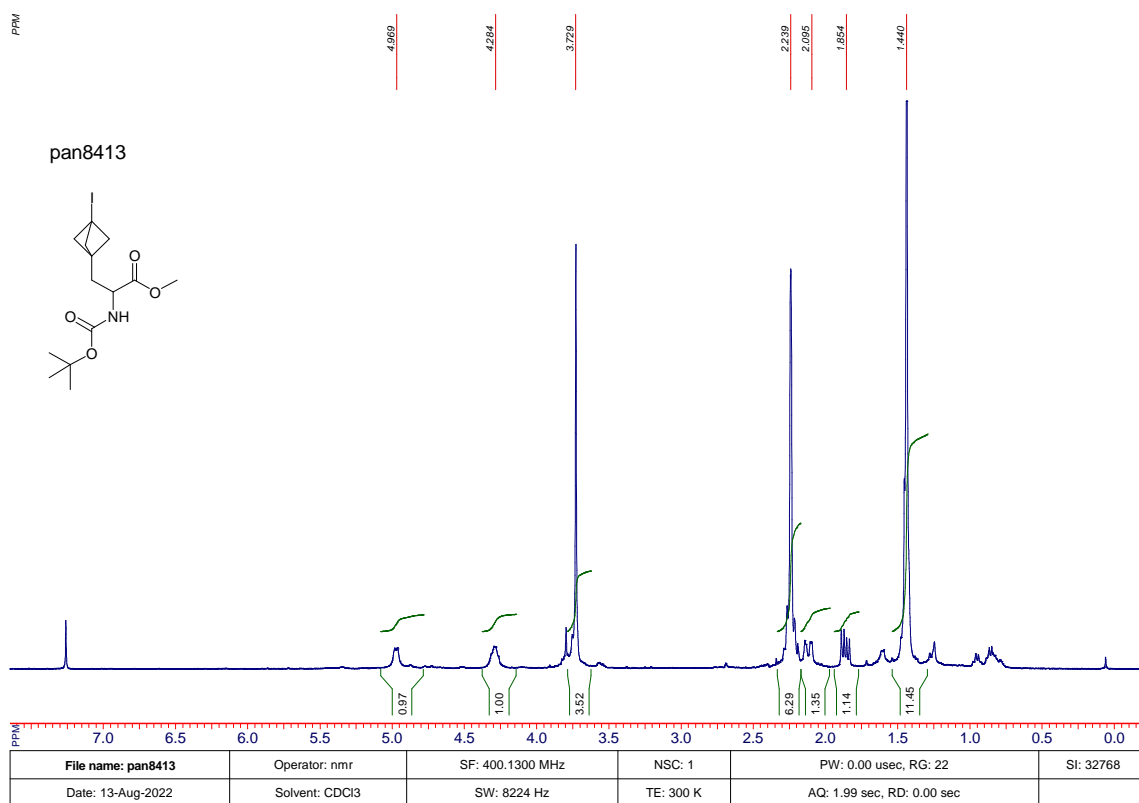


File name: sia429	Operator: root	SF: 499.7730 MHz	NSC: 1	PW: 0.00 usec, RG: 25	SI: 32768
Date: 29-Aug-2022	Solvent: DMSO	SW: 10776 Hz	TE: 683 K	AQ: 0.76 sec, RD: 0.00 sec	

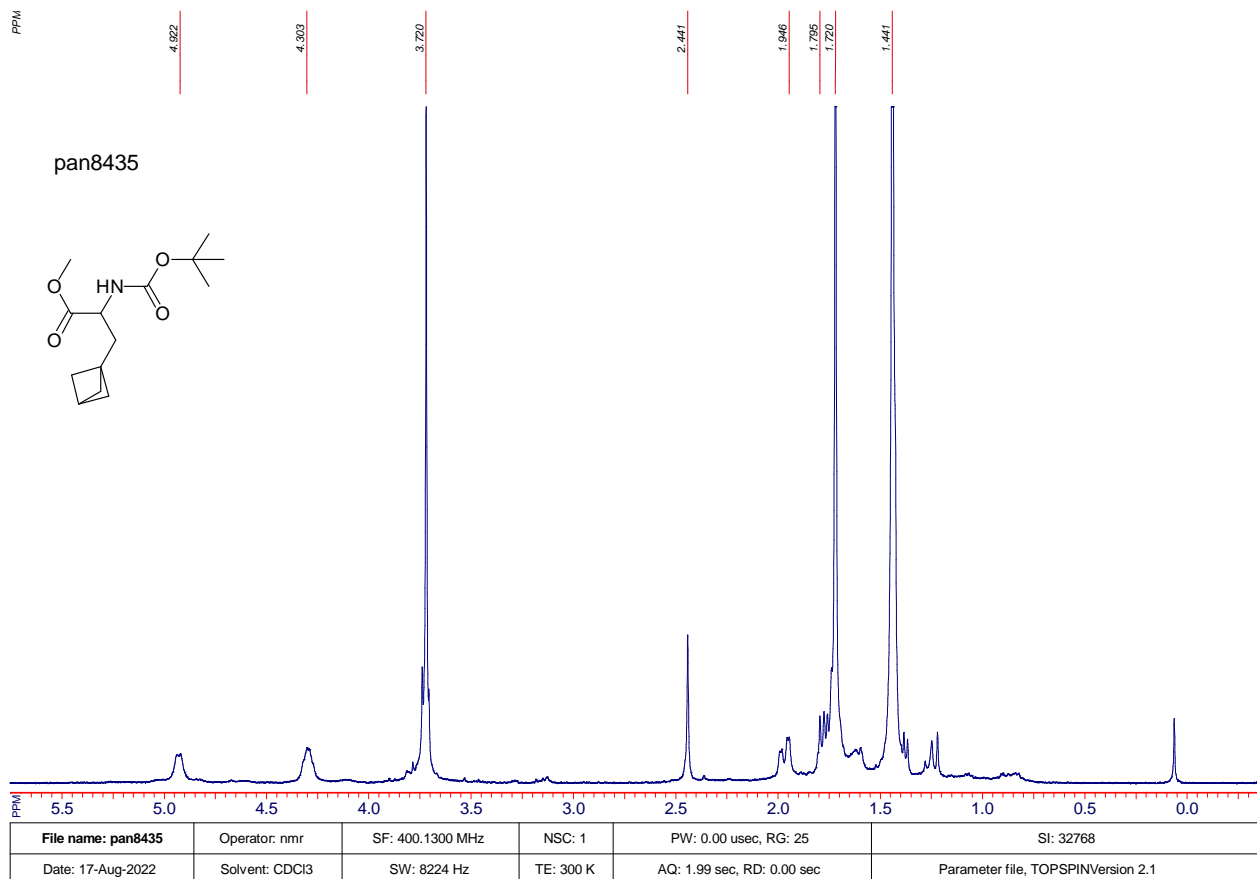
R 2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)-3-(1H-1,2,3-тріазол-5-іл)пропанова кислота



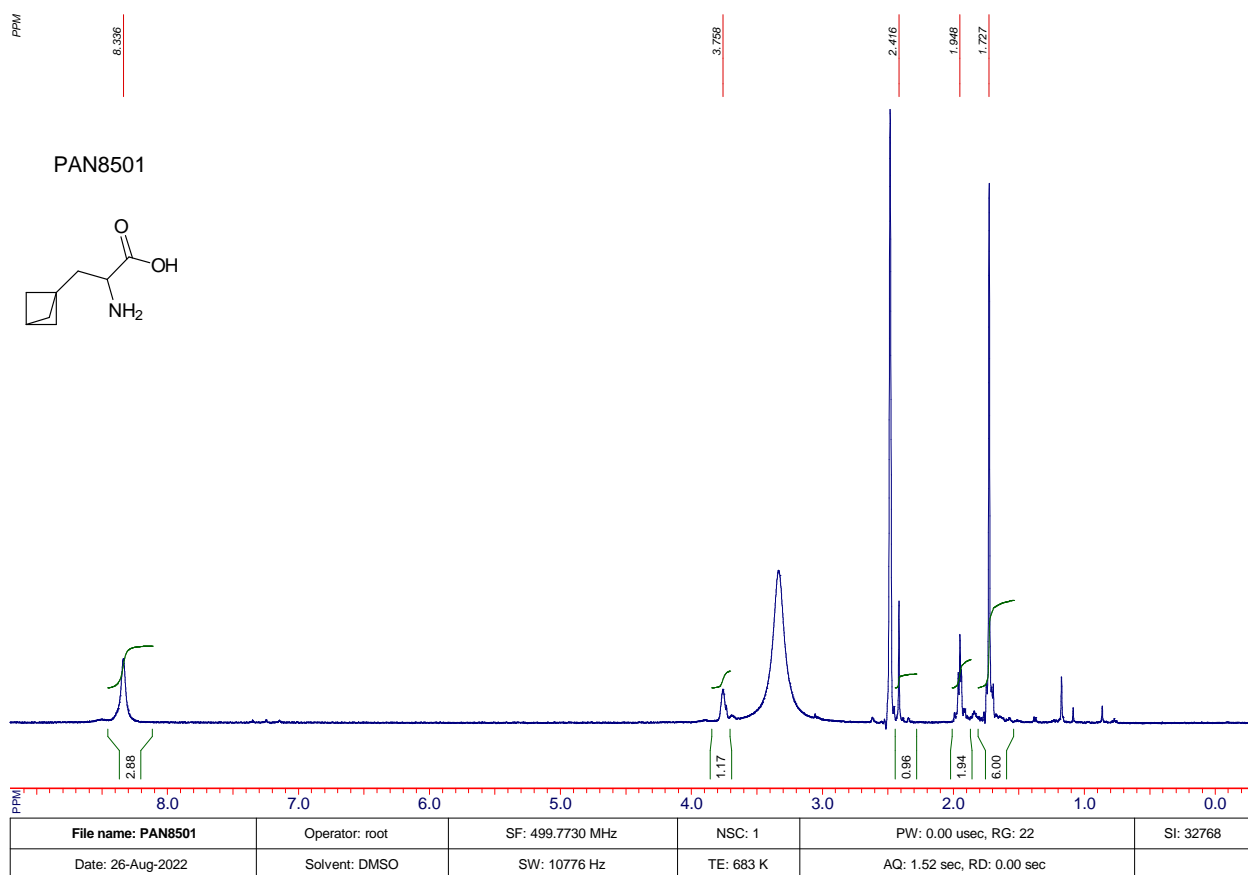
S метил 2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-(3-йодобіцикло[1.1.1]пентан-1-іл)пропаноат



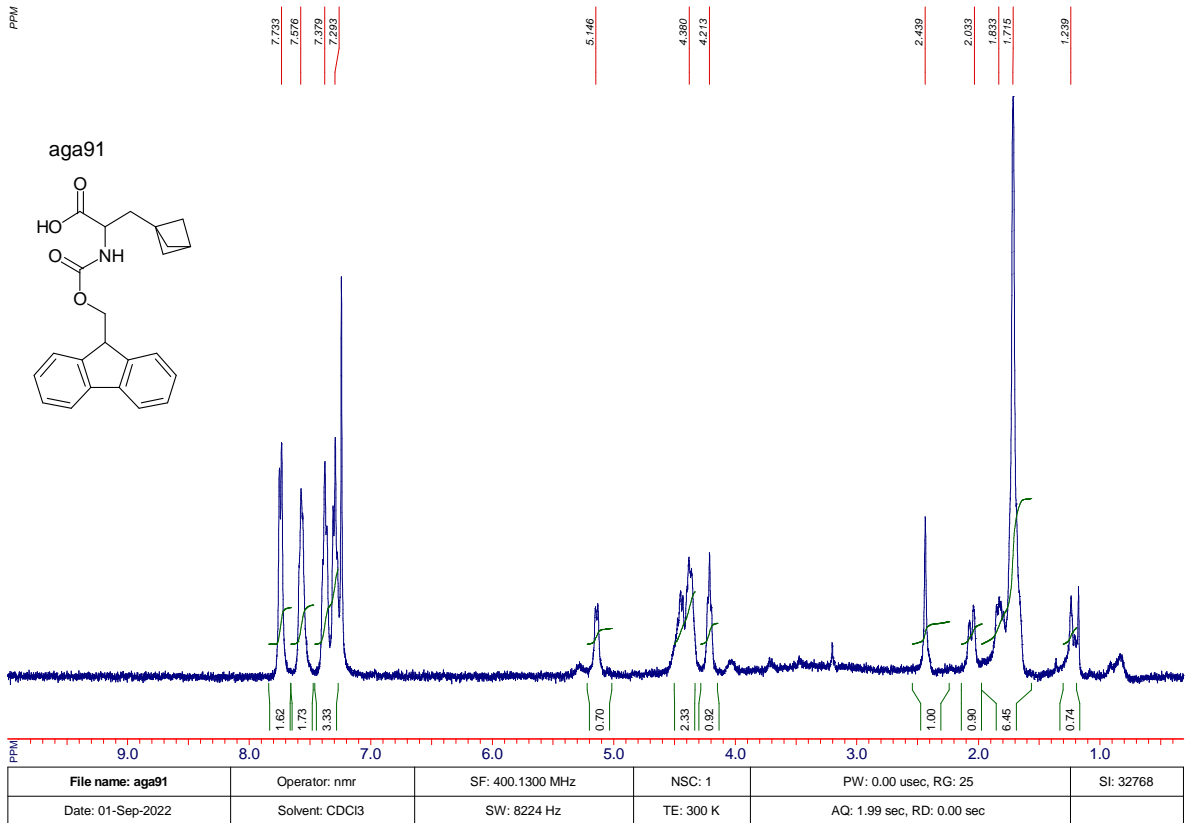
S метил 3-(біцикло[1.1.1]пентан-1-іл)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пропаноат



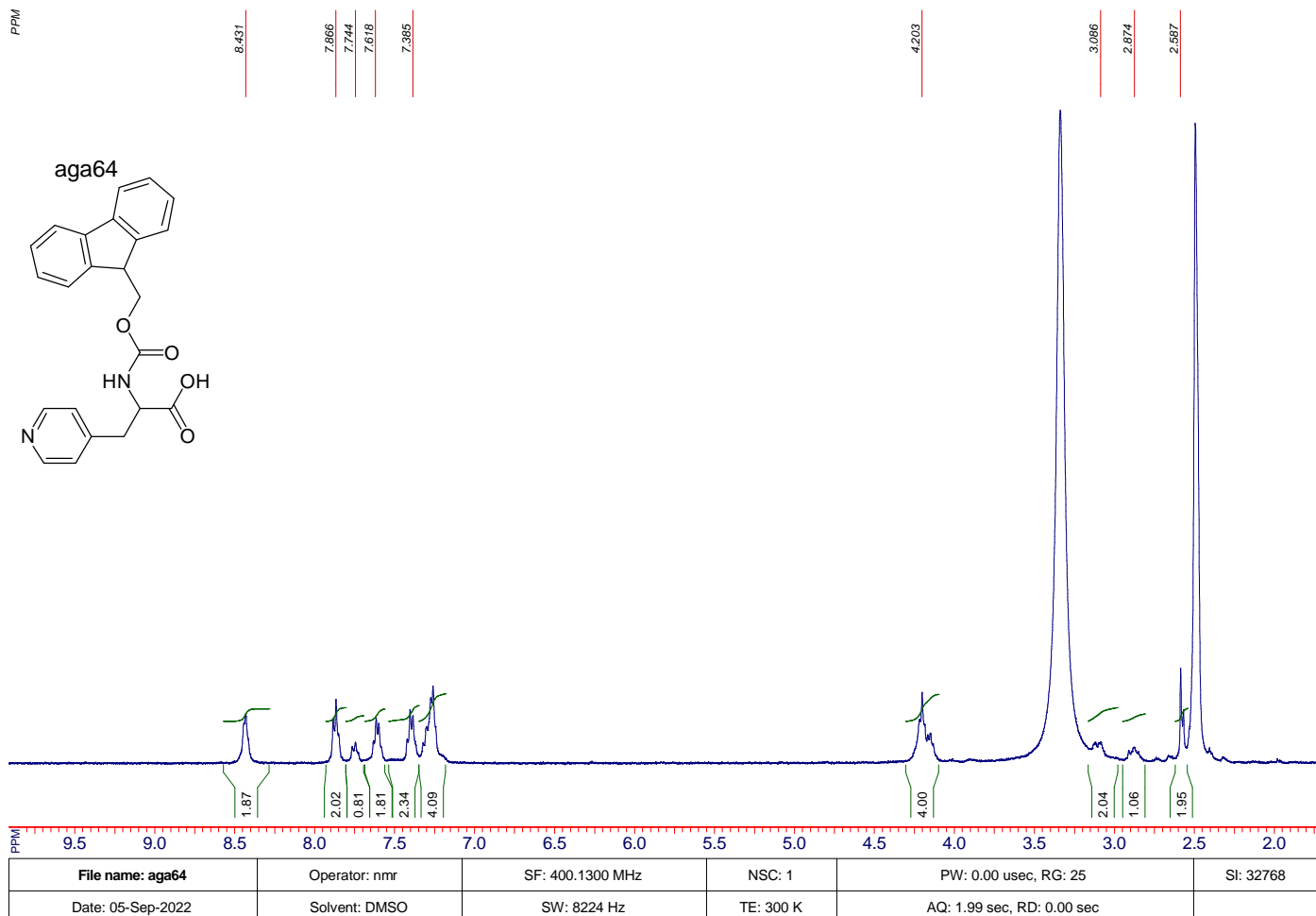
S 2-аміно-3-(біцикло[1.1.1]пентан-1-іл)пропанова кислота



S 2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)-3-(біцикло[1.1.1]пентан-1-іл)пропанова кислота



S 2-(((9H-флуорен-9-іл)метоксі)карбоніл)аміно)-3-(піридин-4-іл)пропанова кислота

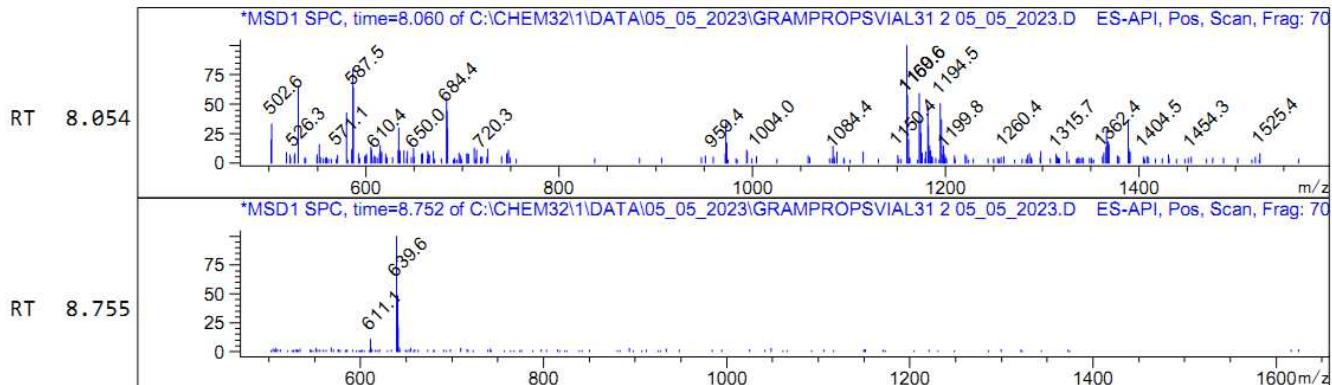
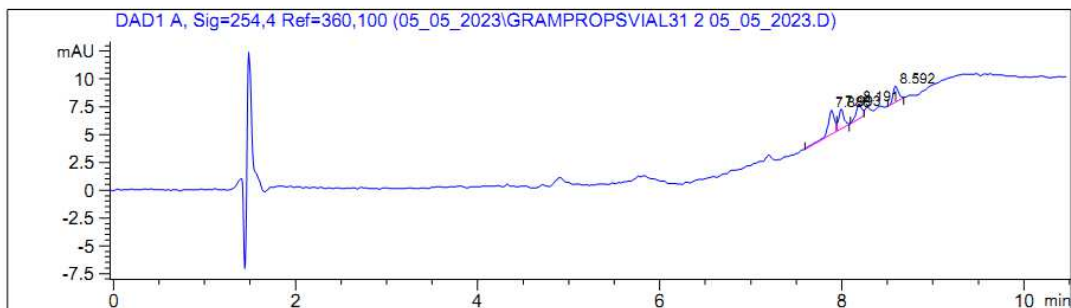


S,S Вос захищений біциклопентановий міметик Граміцидину S(світиться дикатіон без Вос)

MaxPeak: 36.09%  
Ret\_Time: 7.886 min

Sample #

#	Time	Area%
1	7.886	36.09
2	7.993	24.45
3	8.191	19.98
4	8.592	19.48

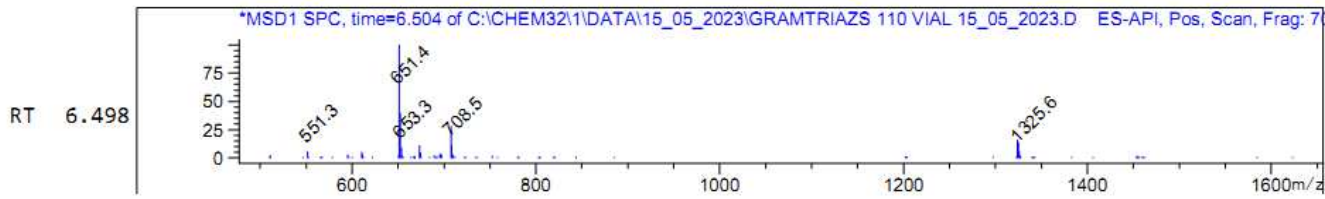
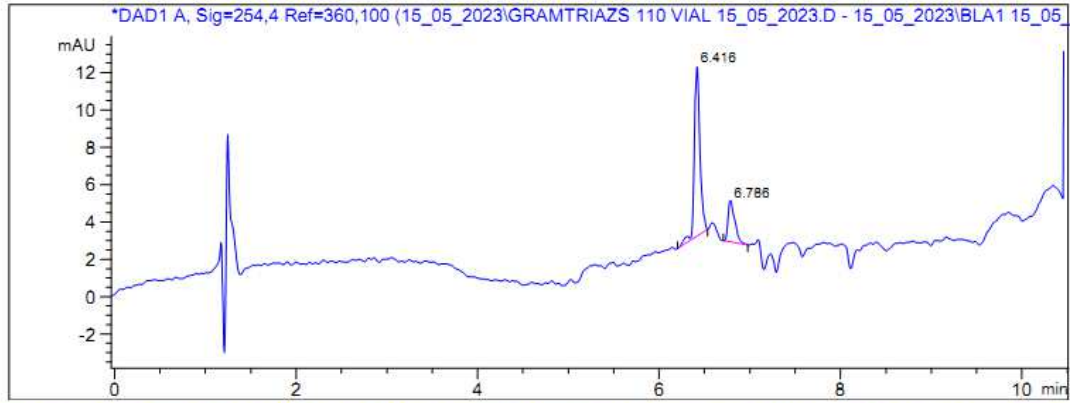


S,S Вос захищений триазольний міметик Граміцидину S

MaxPeak: 77.61%  
Ret\_Time: 6.416 min

Sample #

#	Time	Area%
1	6.416	77.61
2	6.786	22.39



RT 6.498