

УДК 577.112.345

КАТИОННЫЕ ЛИПОАМИНОКИСЛОТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ДИЭТАНОЛАМИНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНО МЕМБРАНО-АКТИВНЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ

© 2023 г. М. К. Гусева^а, З. Г. Дениева^б, У. А. Буданова^{а, *}, Ю. Л. Себякин^а

^аМИРЭА – Российский технологический университет,

Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия

^бИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,

Москва, 119071 Россия

*e-mail: c-221@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.09.2022 г.

После доработки 21.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Данная работа направлена на получение ряда катионных амфифилов на основе аминокислотных производных диэтанолamina как потенциально мембрано-активных антибактериальных агентов. Разработанные соединения содержат два остатка аминокислот в полярном блоке и различаются длиной алифатических цепей в гидрофобном домене. Амфифилы получены в препаративных количествах, достаточных для подтверждения их структур и проведения исследования антибактериальной активности. Синтезированные образцы на основе β -Ala (**4c**) и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) (**4d**) с алифатической цепью C12 в гидрофобном домене проявили перспективный для дальнейших исследований уровень антимикробной активности (МИК, 1 мкг/мл) в отношении грамположительных (*Bacillus subtilis*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*) бактерий. Амфифилы, содержащие ароматические аминокислоты *L*-Phe (**6a**) и *L*-Trp (**6b**) в полярной головной группе и углеводородную цепь C8, активны в отношении бактерий *B. subtilis* с МИК 1 мкг/мл. Полученные данные об антимикробной активности делают отобранные соединения привлекательными для дальнейшего детального изучения их механизма действия.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, пептидомиметики, катионные амфифилы, диэтанол-амин, производные аминокислот, резистентность бактерий

DOI: 10.31857/S0233475523020032, EDN: LANSBL

ВВЕДЕНИЕ

Быстрое распространение бактерий, устойчивых к существующим антибиотикам, ставит множество задач перед системой здравоохранения. Антибиотики, которые входят в состав стандартных протоколов лечения, со временем становятся неэффективными в отношении мультирезистентных бактерий, что провоцирует тяжелое течение инфекционных заболеваний. Поиском эффективных средств борьбы с патогенами, которые смогут пополнить антибактериальный терапевтический арсенал, занимается множество научных групп по всему миру.

Антимикробные пептиды (АМП) рассматриваются как возможно новый тип противомикробных агентов природного происхождения [1]. Они сочетают в себе противомикробную, ангиогенную и противовоспалительную активность с иммуномодулирующим действием [2]. Однако дороговизна расходных материалов, недостаточная

изученность физико-химических и биологических свойств, нестабильность продукта или его токсичность для собственных клеток организма затрудняют широкое применение таких биологически активных структур [3].

Недостатки АМП стимулировали разработку новых мембрано-активных веществ – пептидомиметиков [4]. Это синтетические производные аминокислот и пептидов, предназначенные для имитации основных функций и свойств исходных фармакофоров. Выбор мембраны в качестве мишени обеспечивает преимущество пептидных агентов перед обычными антибиотиками, поскольку развитие устойчивости к ним происходит медленно или даже отсутствует. Такие молекулы сохраняют профиль активности и избирательность действия, при этом они обладают большей биодоступностью и стабильностью в физиологических условиях по сравнению с классическими АМП. За последнее десятилетие было синтезировано, выделено и изучено большое количество

подобных агентов [4]. Некоторые из них уже используются в клинике [5], а некоторые проходят клинические испытания [6, 7].

Одним из наиболее перспективных направлений является использование пептидомиметиков — катионных амфифилов, которые имеют простую конструкцию и высокую стабильность, но при этом показывают перспективные результаты антимикробного действия [8]. Особый интерес к данным соединениям основан на эффективности стратегий синтеза, который не требует высоких экономических и временных затрат [9]. Основные способы получения амфифилов предполагают классические методы пептидной и липидной химии, что позволяет легко заменять или внедрять альтернативные фрагменты, представляющие собой различные аналоги аминокислот или алифатические звенья [8].

Биологическая активность амфифилов во многом зависит от архитектуры синтезируемых молекул. Она не однообразна, в отличие от прототипов, состоящих исключительно из α -аминокислотных остатков, а предполагает варьирование структуры основных фрагментов. Кроме того, возможен синтез малых молекул, центральное звено которых не представлено амидным остовом [10, 11]. В общем виде структура амфифильных молекул представлена одной или двумя алифатическими цепями, аминокислотными участками в качестве гидрофильной головной группы и спейсером, соединяющим два этих домена. Варьирование структурных элементов амфифила может влиять на биодоступность молекулы и ее токсический эффект [12]. Исследования показывают, что существует связь между длиной гидрофобного блока амфифильного соединения и минимальной ингибирующей концентрацией (МИК), которая необходима для подавления роста микроорганизмов [13].

Важнейшую роль в положительной динамике антибактериального действия играет «настройка» амфифильности данных соединений, в частности, соотношение гидрофильной части к гидрофобной — гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) [14, 15]. Подбор оптимальной конструкции пептидомиметика способствует проявлению высокой антимикробной активности и снижению возможных токсических эффектов.

Целью данного исследования является разработка схемы получения и осуществление синтеза серии новых антимикробных пептидомиметиков, а также проведение предварительных биологических тестов антибактериальной активности. В качестве целевых соединений были выбраны катионные амфифилы на основе алифатических производных диэтанолamina, содержащие два остатка аминокислот в полярном блоке и различающиеся длиной алифатических цепей в гидрофобном домене. Структура синтезированных мо-

лекул предполагает их действие на мембраны бактериальных клеток, основываясь на литературных данных о подобных молекулах [8, 16, 17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Реактивы для синтеза коммерчески доступны и были использованы без предварительной очистки. Спектры ^1H -ЯМР снимали в дейтерированном растворителе на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker WM-300 (Германия) с рабочей частотой 300 МГц. Внутренний стандарт — гексаметилдисилоксан. ИК-спектры веществ регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Bruker EQUINOX 55 (Германия). Масс-спектры регистрировали на времяпролетном масс-спектрометре VISION 2000 (Великобритания) методом MALDI, в качестве матрицы использовалась 2,4-дигидроксibenзойная кислота (DHB). Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Сорбфил (Краснодар) и Silufol (Чехия), препаративную тонкослойную хроматографию — на силикагеле TLC standard grade (Sigma-Aldrich, Германия). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле 0.040–0.063 мм (Merck, Германия). Обнаружение пятен веществ при тонкослойной хроматографии (ТСХ) осуществляли нагреванием над пламенем спиртовки или парах йода. Вещества, содержащие аминогруппы, обнаруживали в 5%-ном растворе нингидрина с последующим нагреванием до 50°C. Ароматические соединения обнаруживали в ультрафиолете на пластинках Alugram Xtra SIL G/UV₂₅₄.

Методы. Синтез катионных амфифилов проводили стандартными методами пептидной и липидной химии.

N-Октилдиэтаноламин (2a). Смесь 1 г (9.51 ммоль) диэтанолamina, 1.65 г (8.56 ммоль) 1-бромоктана и 6.58 г (47.6 ммоль) карбоната калия в 20 мл ацетонитрила перемешивали при 80°C в течение 24 ч. После завершения реакции избыток карбоната калия отфильтровывали, растворитель удаляли под вакуумом. Полученную массу растворяли в 25 мл этилацетата, промывали дистиллированной водой (3 × 20 мл) и сушили над сульфатом натрия. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии в системе хлороформ:метанол 9 : 1. Получали 837 мг продукта **2a** (45%).

^1H -ЯМР-спектр (DMSO-d₆, δ , м.д.): 0.88 (т, 3H, CH₃), 1.27 (с, 10H, CH₂CH₂(CH₂)₅CH₃), 1.38 (п, 2H, CH₂CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.43 (т, 2H, CH₂CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.51 (т, 4H, CH₂CH₂NH), 3.40 (т, 4H, CH₂CH₂NH), 4.33 (с, 2H, OH).

N-Додецилдиэтаноламин (2b). N-Додецилдиэтаноламин получали аналогичным образом. Из 1 г (9.51 ммоль) диэтанолamina и 2.13 г (8.56 ммоль) 1-бромододекана получали 1.7 г продукта **2b** (74%).

^1H -ЯМР-спектр (DMSO- d_6 , δ , м.д.): 0.85 (т, 3H, CH_3), 1.24 (с, 18H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1.36 (п, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.43 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.51 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.40 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4.37 (с, 2H, OH).

О,О'-ди-(N-(*трет*-бутоксикарбонил- β -аланил)октил)диэтанолламин (3a). К раствору 220 мг (1.15 ммоль) Вос-(β -Ala)-OH в 5 мл безводного хлористого метилена при перемешивании добавляли 225 мг (1.84 ммоль) 4-диметиламинопиридина (DMAP) и раствор 380 мг (1.84 ммоль) дидецилгексилкарбодиимида (DCC) в 5 мл хлористого метилена. Смесь перемешивали при 0°C в течение 15 мин. Добавляли раствор 100 мг (0.461 ммоль) продукта **2a** в 5 мл хлористого метилена. Смесь выдерживали при интенсивном перемешивании в течение 24 ч. После завершения реакции отфильтровывали выпавший осадок дидецилгексилмочевины, реакцию массу растворяли в 50 мл этилацетата и промывали дистиллированной водой (3 \times 50 мл) и сушили над Na_2SO_4 . После удаления растворителя на вакууме продукт выделяли колоночной хроматографией в системе толуол:этилацетат – 2 : 1. Выход продукта **3a** составил 102 мг (40%).

^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.89 (т, 3H, CH_3), 1.28 (с, 10H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.46 (с, 18H, CCH_3), 1.94 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.53 (т, 4H, β -Ala: $^\alpha\text{CH}_2$), 2.64 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.78 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.41 (к, 4H, β -Ala: $^\beta\text{CH}_2$), 4.18 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 5.25 (с, 2H, NH).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3415 (N–H); 2949, 2894 (C–H); 1743 (C=O эфир), 1720 (C=O, I амидная полоса); 1527 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(N-(*трет*-бутоксикарбонил-ГАМК)октил) диэтанолламин (3b). Реакцию проводили аналогичным образом. Из 234 мг (1.15 ммоль) Вос-(ГАМК)-OH и 0.1 г (0.461 ммоль) соединения **2a** получали 112 мг продукта **3b** (41%).

^1H -ЯМР спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.89 (т, 3H, CH_3), 1.28 (с, 10H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.46 (с, 18H, CCH_3), 1.82 (п, 4H, ГАМК: $^\beta\text{CH}_2$), 1.95 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.37 (т, 4H, ГАМК: $^\alpha\text{CH}_2$), 2.52 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.78 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.17 (м, 4H, ГАМК: $^\gamma\text{CH}_2$), 4.15 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4.79 (с, 2H, NH).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3386 (N–H); 2927, 2856 cm^{-1} (C–H); 1737 (C=O эфир); 1677 (C=O, I амидная полоса); 1521 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(N-(*трет*-бутоксикарбонил- β -Ala)додецил)диэтанолламин (3c). Соединение **3c** получали аналогичным образом. Из 0.34 г (1.8 ммоль) Вос-(β -Ala)-OH и 0.2 г (0.73 ммоль) соединения **2b** получали 277 мг продукта **3c** (62%).

^1H -ЯМР спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.86 (т, 3H, CH_3), 1.28 (с, 18H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1.46

(с, 18H, CCH_3), 1.63 (п, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.53 (т, 4H, β -Ala: $^\alpha\text{CH}_2$), 2.59 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.83 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.37 (м, 4H, β -Ala: $^\beta\text{CH}_2$), 4.21 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 5.22 (с, 2H, NH).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3311 (N–H); 2958, 2902 (C–H); 1739 (C=O эфир); 1715 (C=O, I амидная полоса); 1519 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(N-(*трет*-бутоксикарбонил-ГАМК)додецил)диэтанолламин (3d). Соединение **3d** получали аналогичным образом. Из 0.37 г (1.8 ммоль) Вос-(ГАМК)-OH и 0.2 г (0.73 ммоль) соединения **2b** получали 280 мг продукта **3d** (60%).

^1H -ЯМР спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.87 (т, 3H, CH_3), 1.24 (с, 18H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1.46 (с, 18H, CCH_3), 1.63 (п, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1.80 (м, 4H, ГАМК: $^\beta\text{CH}_2$), 2.36 (т, 4H, ГАМК: $^\alpha\text{CH}_2$), 2.49 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 2.73 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.14 (м, 4H, ГАМК: $^\gamma\text{CH}_2$), 4.11 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4.75 (с, 2H, NH).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3340 (N–H); 2914, 2855 cm^{-1} (C–H); 1735 (C=O эфир); 1625 (C=O эфир, I амидная полоса); 1521 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(β -аланилоктил)диэтанолламин бистрифторацетат (4a). К раствору 11 мг (0.02 ммоль) вещества **3a** в 5 мл безводного хлористого метилена добавляли 33 мг (0.3 ммоль) трифторуксусной кислоты. Перемешивали 2 ч при 0°C. По завершению реакции растворитель и избыток трифторуксусной кислоты отгоняли на ротаторном испарителе. Конечный маслянистый продукт **4a** получали с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 382.18 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 398.20 $[\text{M} + \text{K}]^+$.

О,О'-ди-(ГАМК-октил)диэтанолламин бистрифторацетат (4b). Соединение **4b** получали аналогичным образом. Из 14 мг (0.024 ммоль) соединения **3b** и 41 мг (0.36 ммоль) трифторуксусной кислоты получали продукт **4b** с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 410.12 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 426.18 $[\text{M} + \text{K}]^+$.

О,О'-ди-(β -аланил-додецил)диэтанолламин бистрифторацетат (4c). Соединение **4c** получали аналогичным образом. Из 12 мг (0.02 ммоль) соединения **3c** и 41 мг (0.36 ммоль) трифторуксусной кислоты получали продукт **4c** с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 438.213 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 454.209 $[\text{M} + \text{K}]^+$.

О,О'-ди-(ГАМК-додецил)диэтанолламин бистрифторацетат (4d). Соединение **4d** получали аналогичным образом. Из 10 мг (0.016 ммоль) соединения **3d** и 27 мг (0.23 ммоль) трифторуксусной кис-

лоты получали продукт **4d** с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 466.29 $[M + Na]^+$; 485.31 $[M + K]^+$.

О,О'-ди-(N-(трет-бутоксикарбонил-L-Phe)октил)диэтанолламин (5a). Реакцию получения **5a** проводили аналогично соединению **3a**. Из 0.1 г (0.46 ммоль) **2a** и 0.427 г (1.6 ммоль) Вос-(Phe)-ОН получали 0.24 г продукта **5a** (72%).

^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.88 (т, 3H, CH_3), 1.27 (с, 10H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.41 (с, 18H, CCH_3), 1.54 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.46 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.67 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.10 (м, 4H, $\text{NHCHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4.12 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4.56 (м, 2H, $\text{NHCHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 5.02 (с, 2H, NH), 7.14–7.32 (м, 10H, C_6H_5).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3443 (N–H); 3070, 3057, 750, 709 ($^{\text{ar}}\text{C}–\text{H}$); 2982, 2851 cm^{-1} (C–H); 1751 (C=O); 1678 (C=O эфир, I амидная полоса); 1516 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(N-(трет-бутоксикарбонил-L-Trp)октил)диэтанолламин (5b). Реакцию получения **5b** проводили аналогично соединению **3a**. Из 0.1 г (0.4 ммоль) **2a** и 0.490 г (1.6 ммоль) Вос-(Trp)-ОН получали 0.2 г продукта **5b** (56%).

^1H -ЯМР спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.90 (т, 3H, CH_3), 1.25 (с, 10H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.48 (с, 18H, CCH_3), 1.57 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.24 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.35 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.28 (м, 4H, $\text{NHCHCH}_2\text{C}_8\text{H}_5\text{NH}$), 3.94 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4.62 (м, 2H, $\text{NHCHCH}_2\text{C}_8\text{H}_5\text{NH}$), 5.21 (с, 2H, NH), 7.00–7.58 (м, 12H, $\text{C}_8\text{H}_5\text{NH}$), 8.68 (м, 2H, $\text{C}_8\text{H}_5\text{NH}$).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3361 (N–H); 3063, 3030, 749, 701 ($^{\text{ar}}\text{C}–\text{H}$); 2928, 2855 cm^{-1} (C–H); 1721 (C=O эфир); 1715 (C=O эфир, I амидная полоса); 1500 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(N-(трет-бутоксикарбонил-L-Tyr)октил)диэтанолламин (5c). Реакцию получения **5c** проводили аналогичным образом. Из 0.1 г (0.4 ммоль) **2a** и 0.405 г (1.4 ммоль) Вос-(Tyr)-ОН получали 96 мг продукта **5c** (28%).

^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.88 (т, 3H, CH_3), 1.26 (с, 10H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.43 (с, 18H, CCH_3), 1.58 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.34 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.73 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2.94 (м, 4H, $\text{NHCHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$), 3.65 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4.53 (м, 2H, $\text{NHCHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$), 4.99 (с, 2H, NH), 6.75–7.04 (м, 10H, C_6H_5), 7.25 (с, 2H, OH).

ИК-спектр: (KBr), ν/cm^{-1} : 3474 (N–H); 3072, 3061 ($^{\text{ar}}\text{C}–\text{H}$); 2934, 2854 cm^{-1} (C–H); 1692 (C=O); 1643 (C=O эфир, I амидная полоса); 1514 (N–C, II амидная полоса).

О,О'-ди-(L-Phe-октил)диэтанолламин бистрифторацетат (6a). К раствору 12 мг (0.017 ммоль) вещества **5a** в 7 мл безводного CH_2Cl_2 добавляли 29 мг (0.25 ммоль) трифторуксусной кислоты. Перемешивали 3 ч при 0°C . По завершению реакции растворитель и избыток трифторуксусной кислоты отгоняли на роторном испарителе. Конечный маслянистый продукт **6a** получали с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 534.24 $[M + Na]^+$; 550.22 $[M + K]^+$.

О,О'-ди-(L-Trp-октил)диэтанолламин бистрифторацетат (6b). Соединение **6b** получали аналогичным образом. Из 12 мг (0.013 ммоль) соединения **5b** и 20 мг (0.20 ммоль) трифторуксусной кислоты получали продукт **6b** с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 612.16 $[M + Na]^+$; 628.22 $[M + K]^+$.

О,О'-ди-(L-Tyr-октил)диэтанолламин бистрифторацетат (6c). Соединение **6c** получали аналогичным образом. Из 12 мг (0.016 ммоль) соединения **5b** и 28 мг (0.24 ммоль) трифторуксусной кислоты получали продукт **6c** с количественным выходом.

Масс-спектр, m/z : 566.40 $[M + Na]^+$; 581.37 $[M + K]^+$.

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) методом диффузии в агар. Исследование антибактериальной активности полученных амфифилов проводили совместно с сотрудниками базовой кафедры ФГБОУ “Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе”. В качестве тест-микроорганизмов использовали подготовленные суспензии *Bacillus subtilis* 534 и *Escherichia coli* M17 с концентрацией 1.5×10^8 КОЕ/мл и оптической плотностью 0.5 ед. по Мак-Фарланду. На чашки Петри наносили по 100 мкл суспензии и заливали 10 мл теплого питательного агара, перемешивали, оставляли до застывания. Потом на поверхность агара в чашках с культурами помещали стерильные диски из плотной фильтровальной бумаги (6 штук) равного размера и массы, с внутренним диаметром (6.0 ± 0.1 мм) на одинаковом расстоянии друг от друга. На диски наносили аликвоты исследуемых и контрольных образцов: по 1, 10 и 100 мкл, что соответствует 1, 10 и 100 мкг/мл вещества. После чего чашки выдерживали при комнатной температуре в течение 1–2 ч с последующим инкубированием при температуре $36 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 16–18 ч. По завершении эксперимента определяли диаметр зон подавления роста тест-микроорганизма с точностью до 1 мм. Эксперимент проводили 3 раза. В качестве препаратов сравнения использовались растворы ампициллина (Sigma-Aldrich) и ванкомицина (Acros Organics), к которым чувствительны используемые микроорганизмы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе была предложена и реализована схема синтеза новых катионных амфифилов на основе природных аминокислот и диэтанолamina (схема 1). Основным критерием выбора синтезируемых структур амфифилов стали результаты расчета гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ). Значения ГЛБ коррелируют с возможностью взаимодействий терапевтических молекул с компонентами клеточной стенки бактерий и проявлением антимикробной активности. Согласно литературным данным, оптимальный показатель ГЛБ соединений, проявляющих высокую антибактериальную активность, соответствует интервалу от 5 до 7 [17]. Теоретический расчет ГЛБ был проведен с использованием программы "ACD/Labs, LogP". Была разработана библиотека химических структур на основе аминокислот и аминоспиртов и отобраны молекулы, значения ГЛБ которых лежат в диапазоне вероятной антибактериальной активности и варьируются от 3.14 до 6.49 (табл. 1). Для расчета ГЛБ в редакторе химических соединений "ChemDraw"

создавали структуры получаемых соединений, которые затем загружались в программу "LogP" для автоматического расчета ГЛБ по заданным параметрам программы. Расчет значений для молекул из литературных источников [12, 17] со схожей структурой и с известным антибактериальным механизмом показал аналогичный результат. Полученные данные стали основой для разработки схем получения и синтеза соединений **4 (a-d)** и **6 (a-c)**.

Все синтезируемые соединения имеют общий принцип строения и состоят из следующих структурных блоков: две полярные головные группы, спейсер, линкер и гидрофобный алкильный фрагмент. Гидрофильный блок представлен двумя остатками β -Ala, ГАМК, *L*-Phe, *L*-Tyr или *L*-Trp. В качестве спейсерного участка использовали диэтаноламин. Коммерчески доступный диэтаноламин часто входит в состав косметических и лекарственных средств из-за двух реакционноспособных функциональных групп, позволяющих синтезировать препараты с широким спектром действия [18].

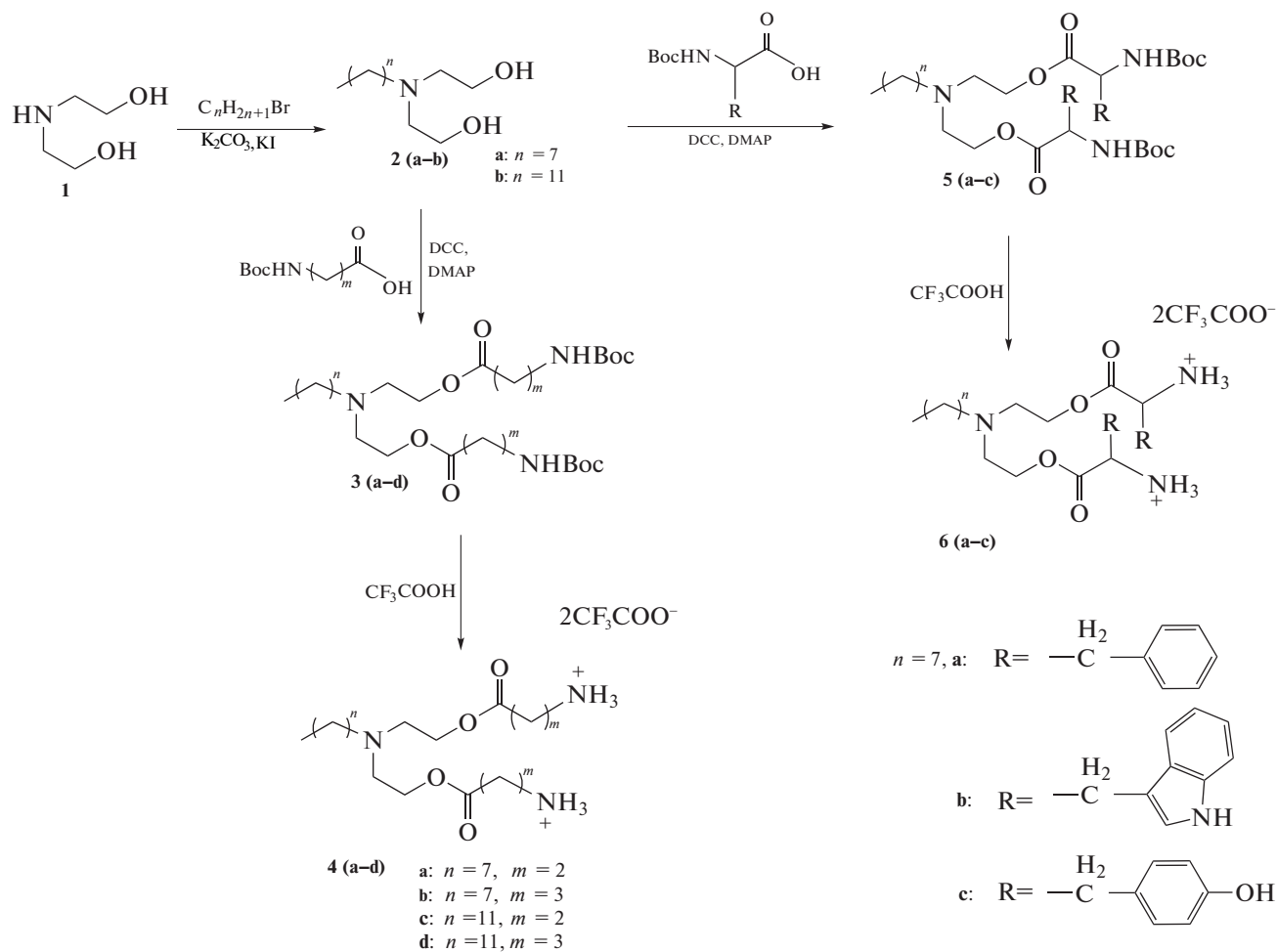


Схема 1

Таблица 1. Значения ГЛБ для синтезированных соединений

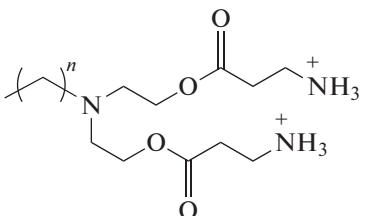
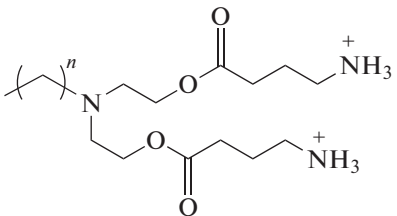
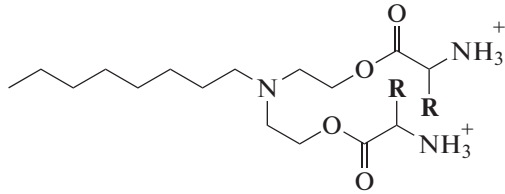
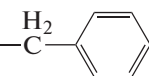
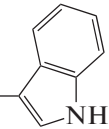
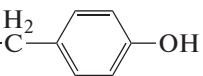
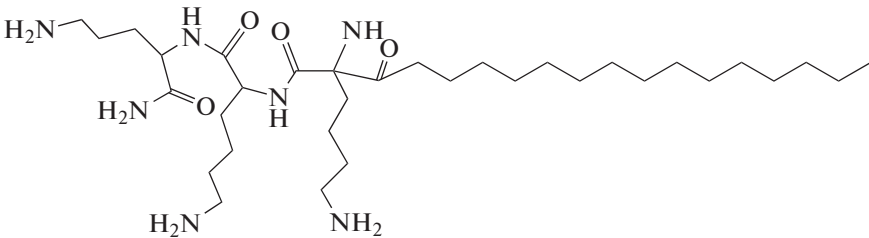
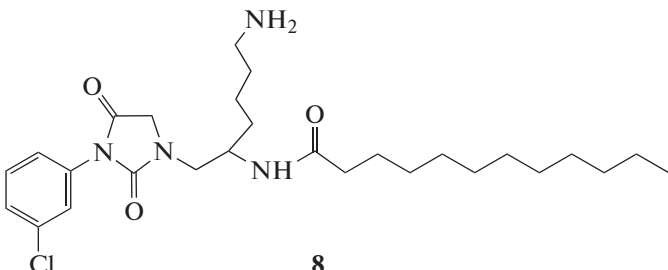
Соединение	Структурная формула	ГЛБ
4a ($n = 7$)		3.14 ± 0.40
4c ($n = 11$)		5.30 ± 0.40
4b ($n = 7$)		3.61 ± 0.36
4d ($n = 11$)		5.73 ± 0.36
		
6a	$R = -\text{C}_6\text{H}_4$ 	6.49 ± 0.45
6b	$R = -\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}$ 	6.34 ± 0.48
6c	$R = -\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ 	5.02 ± 0.46
7 [17]	 <p style="text-align: center;">7</p>	4.15 ± 0.59
8 [12]	 <p style="text-align: center;">8</p>	5.7 ± 0.69

Таблица 2. Размер зоны подавления роста бактерий, мм

Вещество	Концентрация, мкг/мл	<i>E. coli</i> (–)			<i>B. subtilis</i> (+)		
		1	2	3	1	2	3
4a	1	–*	–	–	–	–	–
	10	–	–	–	–	–	–
	100	13 × 12	14 × 12	13 × 11	14 × 10	14 × 13	13 × 14
4b	1	–	–	–	–	–	–
	10	–	–	–	–	–	–
	100	15	16	21	20	18 × 21	20
4c	1	5	6	5	8	6	7
	10	10	9 × 8	8 × 9	13 × 14	12	12 × 10
	100	15 × 14	16 × 18	15	20 × 11	21 × 13	16 × 12
4d	1	6	7	6	7	7	8
	10	15 × 12	14 × 11	14 × 13	16 × 12	12 × 18	16
	100	27 × 25	23 × 29	26 × 22	27 × 25	24 × 33	30 × 22
6a	1	–	–	–	4	4	5
	10	–	–	–	13	12 × 15	14
	100	18	16	15	20 × 18	22	16 × 19
6b	1	–	–	–	4	5	5
	10	–	–	–	13 × 14	12	12 × 10
	100	27 × 25	23	22 × 25	22 × 25	15	20
6c	1	–	–	–	–	–	–
	10	–	–	–	15 × 12	13	16
	100	20	25	21 × 24	28 × 22	26	19 × 23
Ванкомицин	1	Не изучалось			6	7	7
	10	Не изучалось			12 × 9	15 × 12	13
	100	Не изучалось			22	23 × 24	26
Ампициллин	1	–	–	–	Не изучалось		
	10	12	13 × 11	14	Не изучалось		
	100	20 × 17	21 × 13	20	Не изучалось		

*Здесь и далее в таблице знак “–” означает, что зона подавления роста бактерий отсутствует.

Для формирования гидрофобного блока соединений **4 (a–d)** и **6 (a–c)** в данной работе предложено использовать 1-бромоктан и 1-бромдодекан. Липофильный компонент **2 (a, b)** получали реакцией N-алкилирования диэтанолamina в присутствии K_2CO_3 в среде CH_3CN . Выходы продуктов **2 (a, b)** составили 45 и 74% соответственно.

Соединения **3 (a–d)**, содержащие Вос-защищенные алифатические аминокислоты, получали по карбодиимидному методу с использованием DCC и DMAP [19]. Выходы веществ **3 (a–d)** составили 40, 41, 62 и 60% соответственно. Структуры полученных продуктов подтверждали данными 1H -ЯМР- и ИК-спектроскопии.

Соединения **5 (a–c)**, содержащие Вос-защищенные ароматические аминокислоты, получали

согласно вышеописанному методу. Выходы веществ **5 (a–c)** составили 72, 56, 28% соответственно. Низкий выход соединения **5c**, содержащего тирозин, объясняется тем, что присутствие реакционноспособной гидроксильной группы приводит к образованию трудноразделимой сложной смеси. Наличие большого количества побочных продуктов затрудняет выделение целевого соединения с незащищенной OH-группой. Решением подобной проблемы может стать использование коммерческих общедоступных производных с защищенной гидроксильной группой, например, *трет*-бутильной защитой.

Конечные катионные амфифилы **4 (a–d)** и **6 (a–c)** получали удалением Вос-защитных групп действием трифторуксусной кислоты в среде без-

Таблица 3. Антибактериальная активность образцов

Шифр соединения	МИК, мкг/мл	
	<i>E. coli</i> (–)	<i>B. subtilis</i> (+)
4a	100	100
4b	100	100
4c	1	1
4d	1	1
6a	100	1
6b	100	1
6c	100	10
7	1.56 [20]	–
8	1 [12]	–
Ванкомицин	–	1
Ампициллин	10	–

водного хлористого метилена (1 : 1 v/v). За ходом реакции следили по данным ТСХ. Структуры полученных солей подтверждали данными масс-спектрометрии.

Предварительную оценку антибактериального действия синтезированных соединений проводили на линии грамположительных *B. subtilis* 534 и грамотрицательных *E. coli* M17 бактерий методом диффузии бактерий в агар (табл. 2, 3). Соединения, которые в полярной группе содержат алифатические аминокислоты β -Ala (**4c**) и ГАМК (**4d**) с гидрофобной цепью C12, проявляют антибактериальную активность в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий с МИК равной 1 мкг/мл. Амфифилы с ароматическими аминокислотами *L*-Phe (**6a**) и *L*-Trp (**6b**) в полярной головной группе и гидрофобной цепью C8 активны в отношении бактерий *B. subtilis* с МИК 1 мкг/мл. Таким образом, можно проследить следующую зависимость структуры и активности: для проявления высокой активности в отношении грамположительных бактерий *B. subtilis* необходимо проявление выраженной гидрофобности, что достигается или за счет увеличения длины углеводородной цепи до C12 при наличии алифатических аминокислот β -Ala и ГАМК, как в случае соединений **4c** и **4d**, или за счет введения гидрофобных ароматических кислот *L*-Phe и *L*-Trp при сохранении длины углеводородного радикала C8, как в случае **6a** и **6b**. При этом, в отношении грамотрицательных бактерий *E. coli* данная зависимость соблюдается только для алифатических аминокислот с длинным гидрофобным фрагментом **4c** и **4d**, так как введение ароматических аминокислот не показало эффективности.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда

фундаментальных исследований (проект № 20-04-00672). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП РГУ МИРЭА, получившего поддержку Минобрнауки РФ (соглашение от 01.09.2021 № 075-15-2021-689).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Yount N.Y., Yeaman M.R. 2004. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101** (19), 7363. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401567101>
- Мусин Х.Г. 2018. Антимикробные пептиды – потенциальная замена традиционным антибиотикам. *Инфекция и иммунитет.* **8** (3), 295.
- Rima M., Rima M., Fajloun Z., Sabatier J.-M., Bechinger B., Naas T. 2021. Antimicrobial peptides: A potent alternative to antibiotics. *Antibiotics.* **10** (9), 1095. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091095>
- Molchanova N., Hansen P.R., Franzyk H. 2017. Advances in development of antimicrobial peptidomimetics as potential drugs. *Molecules.* **22** (9), 1430. <https://doi.org/10.3390/molecules22091430>
- Pirri G., Giuliani A., Nicoletto S.F., Pizzuto L., Rinaldi A.C. 2009. Lipopeptides as anti-infectives: A practical perspective. *Cent. Eur. J. Biol.* **4**(3), 258–273. <https://doi.org/10.2478/s11535-009-0031-3>
- Fjell C.D., Hiss J.A., Hancock R.E. W., Schneider G. 2012. Designing antimicrobial peptides: Form follows function. *Nat. Rev. Drug Discovery.* **11**, 37–51.
- Faber C., Stallmann H., Lyaruu D., Joosten U., Von Eiff C., van Nieuw Amerongen A., Wuisman P.I. 2005. Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** (6), 2438–

2444.
<https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2438-2444.2005>
8. Lin L., Chi J., Yan Y., Luo R., Feng X., Zheng Y., Xian D., Li X., Quan G., Liu D., Wu C., Lu C., Pan X. 2021. Membrane-disruptive peptides/peptidomimetics-based therapeutics: Promising systems to combat bacteria and cancer in the drug-resistant era. *Acta Pharm. Sin. B.* **11** (9), 2609.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.07.014>
9. Tague A.J., Putsathit P., Hammer K.A., Wales S.M., Knight D.R., Riley T.V., Keller P.A., Pyne S.G. 2019. Cationic biaryl 1,2,3-triazolyl peptidomimetic amphiphiles: Synthesis, antibacterial evaluation and preliminary mechanism of action studies. *Eur. J. Med. Chem.* **168**, 386.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.013>
10. Mojsoska B., Jenssen H. 2015. Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design. *Pharmaceuticals (Basel)*. **8**(3), 366–415.
<https://doi.org/10.3390/ph8030366>
11. Zhang E., Bai P.-Y., Cui D.-Y., Chu W.-C., Hua Y.-G., Liu Q., Yin H.-Y., Zhang Y.-J., Qin S., Liu H.-M. 2018. Synthesis and bioactivities study of new antibacterial peptide mimics: The dialkyl cationic amphiphiles. *Europ. J. Med. Chem.* **143**, 1489–1509.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.044>
12. Su M., Xia D., Teng P., Nimmagadda A., Zhang C., Odom T., Cao A., Hu Y., Cai J. 2017. Membrane-active hydantoin derivatives as antibiotic agents. *J. Med. Chem.* **60** (20), 8456.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00847>
13. Konai M.M., Ghosh C., Yarlagadda V. 2014. Membrane active phenylalanine conjugated lipophilic norspermidine derivatives with selective antibacterial activity. *J. Med. Chem.* **57**, 9409–9423.
<https://doi.org/10.1021/jm5013566>
14. Ghosh C., Sarkar P., Samaddar S., Uppua D., Haldar J. 2017. L-Lysine based lipidated biphenyls as agents with anti-biofilm and anti-inflammatory properties that also inhibit intracellular bacteria. *Chem. Commun.*, **53**, 8427–8430.
<https://doi.org/10.1039/C7CC04206J>
15. Lohan S., Kalanta A., Sonkusre P., Cameotra S.S., Bisht G.S. 2014. Development of novel membrane active lipidated peptidomimetics active against drug resistant clinical isolates. *Bioorg. & Med. Chem.*, **22**, 4544–4552.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.07.041>
16. Schnaider L., Brahmachari S., Schmidt N.W., Mensa B., Shaham-Niv S., Bychenko D., Adler-Abramovich L., Shimon L.J.W., Kolusheva S., DeGrado W.F., Gazit E. 2017. Self-assembling dipeptide antibacterial nanostructures with membrane disrupting activity. *Nat. Commun.* **8** (1), 1365.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01447-x>
17. Shahane G., Ding W., Palaiokostas M., Azevedo H.S., Orsi M. 2019. Interaction of antimicrobial lipopeptides with bacterial lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* **252** (4–5), 317.
<https://doi.org/10.1007/s00232-019-00068-3>
18. Yar M., Mushtaq N., Afzal S. 2013. Synthesis, reactions, applications, and biological activity of diethanolamine and its derivatives. *Russ. J. Org. Chem.* **49** (7) 949–967.
<https://doi.org/10.1134/S1070428013070014>
19. Denieva Z.G., Romanova N.A., Bodrova T.G., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. 2019. Synthesis of amphiphilic peptidomimetics based on the aliphatic derivatives of natural amino acids. *Moscow Univ. Chem. Bull.* **74** (6), 300–305.
<https://doi.org/10.3103/S0027131419060087>
20. Makovitzki A., Baram J., Shai Y. 2008. Antimicrobial lipopolypeptides composed of palmitoyl di- and tri-cationic peptides: in vitro and in vivo activities, self-assembly to nanostructures, and a plausible mode of action. *Biochemistry*. **47** (40), 10630.
<https://doi.org/10.1021/bi8011675>

Cationic Lip amino acid Derivatives of Diethanolamine as Potentially Membrane-Active Antibacterial Agents

M. K. Guseva¹, Z. G. Denieva², U. A. Budanova¹*, Yu. L. Sebyakin¹

¹MIREA, Russian Technology University, Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow, 119571 Russia

²Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: c-221@yandex.ru

This work is aimed to develop a number of cationic amphiphiles based on amino acid derivatives of diethanolamine as potentially membrane-active antibacterial agents. The developed compounds contain two amino acid residues in the polar block and various length of aliphatic chains in the hydrophobic domain. Amphiphiles were obtained in preparative amounts sufficient to confirm their structures and perform a study of antibacterial activity. The synthesized samples based on β -Ala (**4c**) and GABA (**4d**) with an aliphatic C12 chain in the hydrophobic domain showed a promising level of antimicrobial activity (minimal inhibitory concentration, MIC, 1 μ g/mL) against gram-positive (*B. subtilis*) and gram-negative (*E. coli*) bacteria. Amphiphiles containing aromatic amino acids *L*-Phe (**6a**) and *L*-Trp (**6b**) in the polar head group and C8 hydrocarbon chain are active against *B. subtilis* with a MIC of 1 μ g/mL. The obtained data on antimicrobial activity make the selected compounds attractive for further detailed study of their mechanism of action.

Keywords: antimicrobial peptides, peptidomimetics, cationic amphiphiles, diethanolamine, amino acid derivatives, bacterial resistance