

BIOLOGICKY AKTIVNÍ DEPSIPEPTIDY

JARMILA VINŠOVÁ^a a EVŽEN KASAFÍREK^b

^aFarmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, ^bVýzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Kouřimská 17, 130 60 Praha

Došlo dne 13.III.1997

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika a rozdělení
3. Syntéza, chránící skupiny, kondenzační činidla a aktivační látky
4. Vedlejší reakce
5. Dipeptidy, lineární, cyklické, příklady syntéz
6. Tri-, tetra- až polydipeptidy
 - 6.1. Tripeptidy
 - 6.2. Tetrapeptidy
 - 6.3. Polydipeptidy
7. Biologická aktivita
 - 7.1. Antibiotika
 - 7.2. Látky s antineoplastickým účinkem
 - 7.3. Fytotoxické sloučeniny
 - 7.4. Látky s antifungální aktivitou
 - 7.5. Insekticidní toxiny (destrukciny)
 - 7.6. Enzymové substráty
 - 7.7. Biodegradabilní nosiče

1. Úvod

Depsipeptidy jsou lineární nebo cyklické sloučeniny podobné peptidům, ve kterých je peptidická (amidická) vazba nahrazena vazbou depsipeptidickou (esterovou). Tato vzájemná podobnost obou struktur je odlišena rozdílnou chemickou reaktivitou a fyzikálně-chemickou povahou.

- a) Depsipeptidická vazba je mnohem reaktivnější, tj. méně stabilní.
- b) Enzymatické štěpení esterové vazby není výrazně selektivní jako je tomu u vazby peptidické. Esterová

vazba je štěpena nespecificky jak esterázami tak i proteázami.

Podobně jako u peptidů, existují depsipeptidy v cyklických útvarech (zpravidla nejčastěji) od nejjednodušších sloučenin 2,5-morfolindionů (odpovídají cyklickým dipeptidům, 2,5-piperazindionům), přes tri-, tetra-, pentadepsipeptidy až po vyšší homology. Tyto sloučeniny jsou známy pozoruhodnými biologickými aktivitami (antifungální, protinádorová). Rozvoj chemie depsipeptidů náleží Šemjakinově škole. Izolací, stanovením struktury a jejich syntézou se značnou měrou zabývají také japonští autoři.

Kombinace esterové a amidické vazby je spojena s mnohými syntetickými problémy: selektivní chránění amino- a hydroxyskupin, optimalizace kondenzačních metod a minimalizování vedlejších reakcí. Sledování depsipeptidických struktur s cílem nových účinných farmak by mohlo být přínosem farmaceutické vědě.

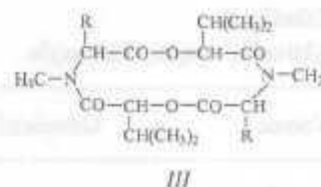
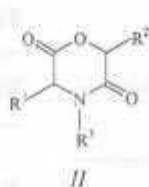
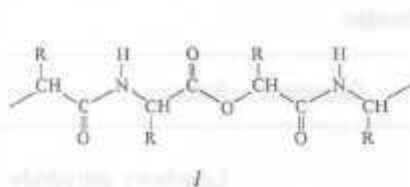
2. Charakteristika a rozdělení

Depsipeptidy jsou heterodetní heteromerní peptidy, u nichž je amidová vazba substituována vazbou esterovou. Heterokomponentou jsou bifunkční kyseliny α - nebo β -hydroxykyseliny. Amidová a esterová vazba jsou si strukturně velmi podobné. Hlavní rozdíly spočívají ve velikosti úhlu C'OC, který je o 10° menší (113°) než úhel C'NC (123°). Protože esterové seskupení neobsahuje vodík, který je přítomen v aminoskupině a hraje roli u sekundární struktury tvorby helixu pomocí vodíkové vazby mění se prostorové uspořádání depsipeptidů. Jak esterová tak i amidová vazba se vyskytují v *trans* planární konfiguraci¹. Depsipeptidy mohou tvořit jak řadu lineární tak cyklickou (I–III).

Nejnižším členem cyklických peptidických laktonů je 2,5-morfolindion (1,4-oxazin-2,5-dion), který je tvořen glycinem a α -hydroxyoctovou kyselinou. Jeho alkylované nebo arylované deriváty tvoří skupinu cyklických didepsipeptidů.

Analogicky k peptidům lze podle počtu komponent dělit depsipeptidy dále na tri-, tetra-, penta-, okta- až polydipeptidy.

Většina těchto látek byla izolována z přírodních antibio-



Tabulka I
Chránič skupiny pro amino- a hydroxyskupinu

Vzorec	Označení	Název
<i>Amino-</i>		
	Boc	terc.butyloxykarbonyl
	Bpoc	bifenylisopropyl-oxykarbonyl
	Nps	o-nitrofenylsul-fenyl
	FMOC	9-fluorenylme-thoxykarbonyl
	Cbz-(Z)	benzyloxykar-bonyl
<i>Hydroxy-</i>		
	Dca	dichloracetyl

tik s cílem objasnit jejich aktivní komponentu, popř. připravit synteticky účinný derivát. Např. z kmene *Fusarium* byly izolovány lateritiin I a II, avenacein, sambucinin, a fruktigenin obsahující α -hydroxykyselinu isariin, serratamolid, esperin a pithomykolid obsahující β -hydroxykyselinu².

3. Syntéza, chránič skupiny, kondenzační činidla a aktivační látky

Vzhledem k podobnosti struktury k peptidům jsou pro jejich přípravu používány některé metody peptidové chemie. Hydroxylová skupina je slabší nukleofil oproti ami-

noskupině a reakce zahrnující větší fragmenty jsou obvykle obtížnější než ty, které vycházejí z chráněných aminokyselin. Zavedení esterové vazby do řetězce později je méně úspěšné. Na druhé straně je esterová vazba labilnější než amidová a za některých podmínek peptidové syntézy je nestabilní. Z toho vyplývá, že je někdy obtížné připravit požadovaný depsipeptidový analog. K chránění je třeba vybrat takové skupiny, jejichž odbourávání není spojeno s rozštěpením depsipeptidové esterové vazby.

Při tvorbě dipeptidů je nutné chránit jak aminoskupinu tak i karboxylovou skupinu aminokyseliny. Obdobně je tomu u depsipeptidů. Zde je třeba chránit aminoskupinu a karboxylovou skupinu aminokyseliny a hydroxyskupinu nebo karboxylovou skupinu druhé komponenty - hydroxykyseliny a aktivovat karboxylovou skupinu.

Chránič skupiny musí mít takové chemické vlastnosti, aby byly snadno odštěpitelné bez ovlivnění amidové nebo esterové vazby. K chránění aminoskupiny se nejčastěji používají skupiny uvedené v tabulce I. Karboxylová skupina se chrání převedením na ester nebo formou soli. Pro chránění hydroxyskupiny se osvědčila dichloracetylová skupina (Dca), která se snadno odstraní ekvimolárním množstvím hydroxidu sodného a dovoluje zavést hydroxykyselinu do jakékoliv požadované pozice depsipeptidového řetězce³.

Pro aktivaci karboxylové skupiny existuje neomezený výběr elektronakceptorových skupin tzv. aktivačních skupin (tabulka II).

Leuchovy anhydridy a anhydrid N-karboxy-2-aminokyselin jsou kombinací aktivující a chránič skupiny. 2-Nitrofenylsulfenyl-N-karboxyanhydridy α -aminokyselin (Nps-NCAs) mají výhodu v rychlé tvorbě esterové vazby rovněž s nechráněnými hydroxykyselinami. Takto byly připraveny depsipeptidy obsahující hydroxyoctovou kyselinu, mléčnou kyselinu a 2-hydroxyisovalerovou kyselinu, které byly dále polymerovány⁴.

Jako nejběžnější kondenzační činidla se používají N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCC), diterc.butylpyrokarbonat (Boc)₂O za katalýzy 4-N,N-dimethylaminopyridinu (DMAP) nebo pyridinu, karbonyldiimidazol (CDI) nebo z moderních kondenzačních činidel benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)fosfonium hexafluorofosfat (BOP),

Tabulka II
Aktivační skupiny karboxylu

Vzorec	Označení	Název
		azidová
		anhydridová – směsné nesymetrické anhy- dridy
	R-CO-ONp	aktivní estery, nitrofe- nylestery, <i>p</i> -nitrofenyl- ester
	R-CO-ONo	<i>o</i> -nitrofenylester
	R-CO-ONm	<i>m</i> -nitrofenylester
	R-CO-ODNp	2,4-dinitrofenylester
	R-CO-ONSu	N-hydroxysukcin- imid ester
	R-CO-OPfp	pentafluorofenylester
	R-CO-OPcp	pentachlorofenylester
	R-CO-OPfp	2,4,5-trichlorofenylester
	HOBt	1-hydroxybenztriazol

Tabulka II - pokračování

Vzorec	Označení	Název
		Leuchovy anhydridy
	Nps-NCAs	aktivní anhydrid 2-nitrofenylsulfenyl- -N-karboxanhydrid- α - -aminokyseliny
		isoprenylchlorokar- bonat

Tabulka III
Kondenzační činidla

Vzorec	Označení	Název
	Boc ₂ O	diterc.butylpyrokarbonat
	DCC	dicyklohexylkarbodiimid
	CDI	karbonyldiimidazol
	BOP	benzotriazol-1-yloxy- -tris(dimethylamino)fos- fonium hexafluorofosfat

viz tabulka III. Při použití (Boc)₂O byly získány dobré výtěžky. Metoda byla srovnána s metodou za použití dicyklohexylkarbodiimidu. V obou případech nedocházelo k racemizaci produktů⁵.

Takto byly připraveny depsipeptidy: formyl-L-Val-L-Lac-OtBu, Z-L-Phe(4-NO₂)-L-Lac-OtBu.

Některé nedostatky byly odstraněny použitím nukleofilního katalyzátoru DMAP v N,N'-dicyklohexylkarbodi-

imidové metodě⁶. 4-Aminopyridiny byly shledány účinnějšími acylačními katalyzátory, mnohem lepšími než pyridin, zvláště při esterifikaci stericky bráněných alkoholů. Výhodou této metody jsou: mírné reakční podmínky (25 °C, dichlormethan), tak aby mohly být přítomny labilní chránící skupiny, poměrně krátká reakční doba a vysoké výtěžky také u stericky bráněných hydroxy- a karboxykomponent.

Pro tvorbu esterové vazby v modelu depsipeptidů byly použity 2-bromkarboxamidy obsahující primární, sekundární nebo terciární halogen a nesubstituovanou nebo

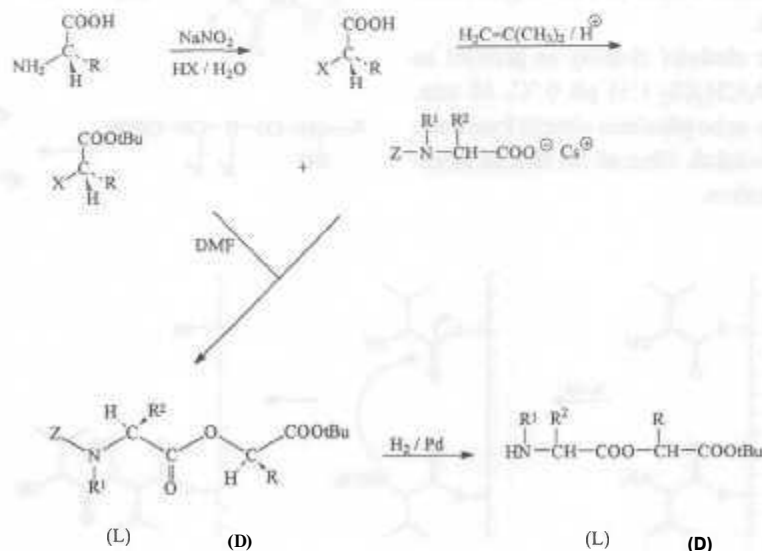
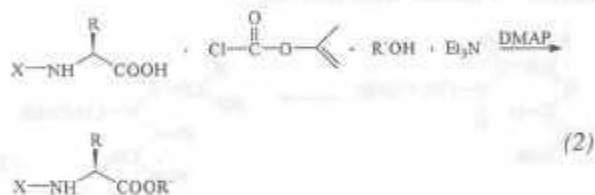
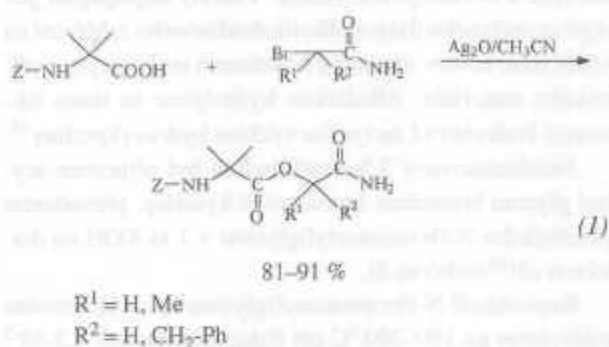


Schéma 1

monosubstituovanou amidovou aminoskupinu. Za laboratorní teploty reagují s N-chráněnými aminokyselinami v přítomnosti ekvimolárního množství oxidu stříbrného za vzniku depsipeptidových analogů ve vysokých výtěžcích. Vedlejší reakce nebyly pozorovány⁷⁻⁸ (7).

Jiné sloučeniny jako je acetát stříbrný, hydrid sodný, oxid barnatý nebo oxid měďný nebyly účinné, z reakcí byly získány výchozí sloučeniny.

Při přípravě antibiotika valinomycinu (dodekacyklo-depsipeptid) bylo použito isoprenylchlorokarbonátu (IPCC) pro aktivaci karboxylu chráněné aminokyseliny za katalýzy 0,2 ekvivalentu DMAP (2).

Takto byly připraveny depsipeptidy D-Val-Lac a Val-D-Hiv, které byly spolu kondenzovány reakcí s benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylammonio)phosphonium hexafluorofosfátem (BOP)⁹.

1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) byl s úspěchem použit pro kondenzaci L-Leu-NH₂HCl s L-α-hydroxykapronovou kyselinou při přípravě peptolidových substrátů savčí kolagenasy¹⁰.

Při řešení struktury valinomycinu a enniatinu byly připraveny depsipeptidy obsahující D-α-hydroxykyseliny¹¹. Tyto depsipeptidy byly syntetizovány reakcí terc.butylesteru L-α-halogenkyselin získaných z L-aminokyselin s cesnými solemi N-chráněných aminokyselin. Při jejich kondenzaci došlo ke změně konfigurace hydroxykyseliny (schéma 1).

Úsilí o biosyntetickou přípravu antibiotik vedlo k přípravě depsipeptidových fragmentů také enzymovou cestou.

Například depsipeptid D-2-hydroxyisovaleryl-N-methylvalin, stavební kámen antibiotik enniatinů, byl připraven biosynteticky jak ukazuje schéma 2 (cit. ¹²).

Za kyselých podmínek je schopen podléhat intramolekulární kondenzaci za vzniku odpovídajícího morfolindionu.

Selektivní syntéza několika enniatinových homologů byla provedena částečně imobilizovaným enzymem enniatin syntetasou vázanou na propyl agarosu se 45 % účinností volného enzymu¹³. Takto byly připraveny rovněž depsipeptidy, které se v přírodním materiálu nevy-
skytují.

4. Vedlejší reakce

Skupina kolem Goodmana^{14,16} se zabývala syntézou depsipeptidů jako analogů kolagenu a elastinu s cílem zodpovězení otázky, zda zavést esterovou vazbu do řetězce dříve či později. Uvedení autoři zjistili, že esterová vazba u depsipeptidů je nestabilní za podmínek acetylace a aminolýzy a dochází při ní pravděpodobně k intramolekulární acylační reakci (3).

Další vedlejší reakcí je β -eliminace. Přidáme-li terciární bázi nebo aminokomponentu, hraje tato roli v E_2 . β -Vodík u hydroxyisovalerové kys. (Hiv) je eliminován a vazba O-C α je štěpena. Tato reakce vede k uvolnění karboxylátového iontu, což u peptidů neexistuje, tam se uvolňuje RCONH⁻ (4).

Kondenzace přes DCC/HOBt nebo přes hydroxysuccinimid aktivní ester je také určitý typ aminolýzy esteru. Dvě aminolýzy spolu soutěží a když je reakce provedena pomalu, převládá štěpení.

Kyselé uvolnění Boc chránicí skupiny se provádí za mírných podmínek (TFA/CH₂Cl₂ 1:1) při 0 °C, 10 min. Prodloužení reakční doby nebo působení silnější kyselinou vede ke vzniku směsi produktů. Obecně lze říci, že záleží na rychlosti provedené reakce.

5. Didepsipeptidy, lineární, cyklické, příklady syntéz

Zájem o deriváty 2,5-morfolindionů souvisí s izolací přírodních antibiotik. Cook, Cox a Farmer¹⁷ referovali o antibiotiku latericinu I, produkovaném houbou *Fusarium lateritium*, který byl převeden působením hydroxidu sodného na hydroxykyselinu, spontánně cyklizující na lakton (5).

Syntetický přístup vycházel z (-)- α -bromoisovalerychloridu a N-methyl-D,L-valinu. Vzniklý depsipeptid poskytl za sníženého tlaku a několikahodinového zahřívání na vodní lázni lakton, identický s laktonem izolovaným z přírodního materiálu. Alkalickou hydrolyzou se tento laktonový kruh otevírá za vzniku výchozí hydroxykyseliny¹⁸.

Nesubstituovaný 2,5-morfolindion byl připraven acylací glycinu bromidem bromoctové kyseliny, převedením resultujícího N-(bromoacetyl)glycinu v 1 M-KOH na draselnou sůl¹⁹ (schéma 3).

Bezvodá sůl N-(bromoacetyl)glycinu byla cyklizována zahříváním na 180–200 °C při tlaku menším než 1,3.10⁻⁵ kPa (cit. ²⁰). Obdobně byl připraven 6-methyl-2,5-morfolindion²¹ a některé další deriváty²².

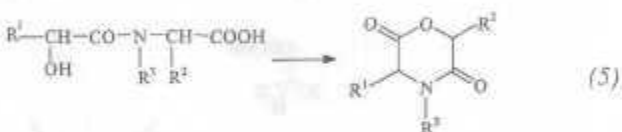
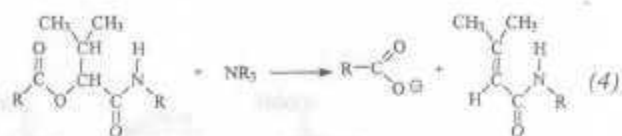
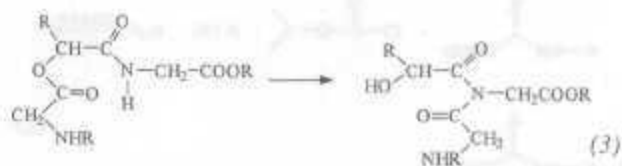
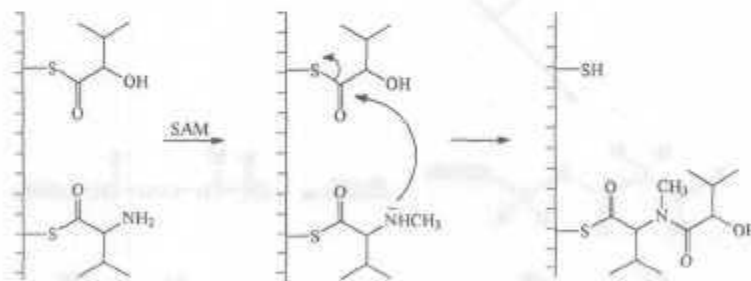
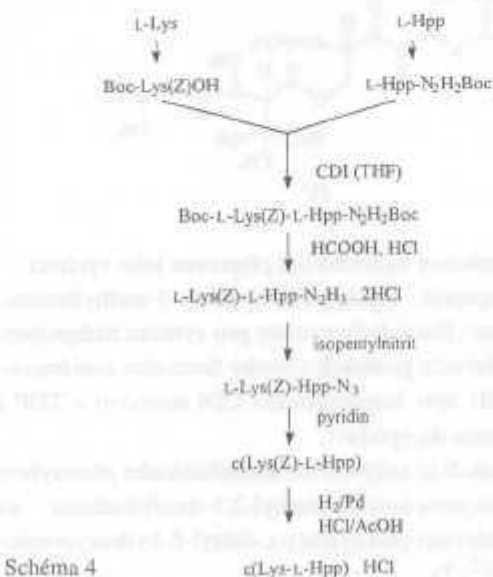
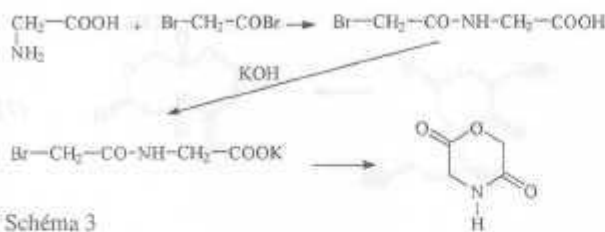


Schéma 2





Syntéza substituovaných 2,5-morfolindionů vycházela z různě substituovaných α' -bromacetyl- α -aminokyselin, připravených metodou podle Fischera a Schenkela²³ reakcí soli aminokyseliny s chloridem kyseliny v ledovém vodném roztoku za přítomnosti přebytku alkálií nebo vhodněji třepáním chloridu kyseliny se dvěma ekvivalenty aminokyseliny suspendované v chloroformu.

Převedením na sodnou sůl a zahříváním na teplotu 150–200 °C za tlaku $1,3 \cdot 10^{-5}$ kPa rezultovaly cyklické 2,5-morfolindiony. Laktonizace je považována za S_N2 (cit. ²⁴). Kdyby probíhala S_N1 mechanismem, kdy dochází v prvním stupni k ionizaci Br jako určujícího kroku reakce, byl by tento krok nezávislý na sterické konfiguraci molekuly. Alkylsubstituenty ovlivňují laktonizaci dvojím způsobem. Díky jejich +I efektu se snadněji uvolňuje bromidový anion, ale sterickým bráněním dochází ke zpomalování reakce. U aminokyselin elektronový efekt převažuje,

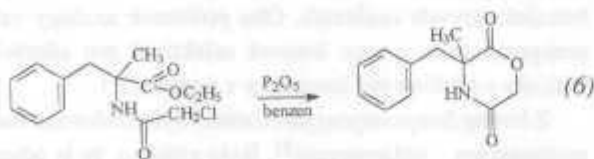
takže valinový derivát laktonizuje rychleji než norvalinový a substituované N-isopropylaminokyseliny laktonizují rychleji než N-methylaminokyseliny. Jestliže však je alkylová skupina vázána na uhlík, na němž je také vázán brom, hraje důležitou úlohu naopak sterický efekt, což je pochopitelné, protože při S_N2 v tranzitním stavu má uhlík pět substituentů ve svém okolí, takže objemné substituenty způsobují retardaci substituce. N-(α -hydroxyisovaleryl)sarkosin laktonizuje už stáním při 20 °C, kdežto N-hydroxyacetyl-N-methylvalin destilací ve vakuu. Otevírání laktonového kruhu za vzniku N-hydroxylacylaminokyselin bylo provedeno ve vodě na vroucí lázni během 30 minut.

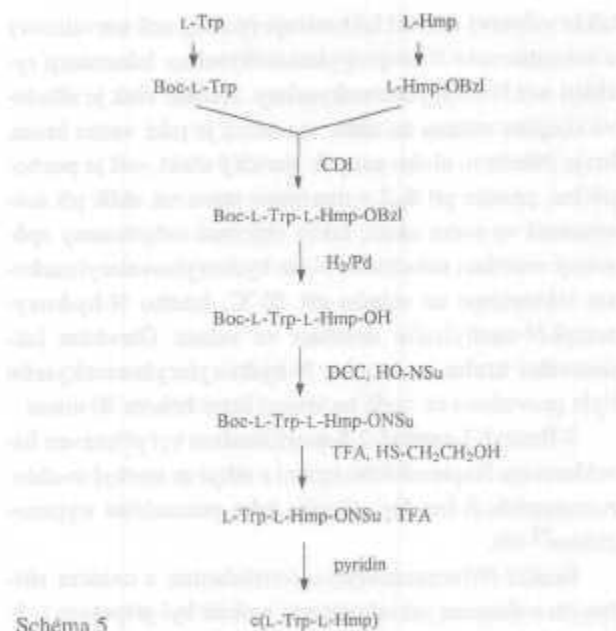
3-Benzyl-3-methyl-2,5-morfolindion byl připraven Bischlerovou-Napieralského reakcí z ethyl- α -methyl- α -chloroacetamido- β -fenylpropionátu jako potenciální trypanocidum²⁵ (6).

Reakcí N(bromoacetyl)-L-fenylalaninu s oxidem stříbrným v dioxanu při laboratorní teplotě byl připraven L-3-benzyl-3-methyl-2,5-morfolindion jako chymotrypsinový substrát²⁶.

Trypsin hydrolyzuje peptidovou vazbu obsahující karbonylovou skupinu L-lysinu a L-argininu, avšak nehydrolyzuje peptidovou vazbu cyklických dipeptidů, jako je c(L-Lys-L-Phe) a c(L-Lys-Gly), i když obsahují lysinový zbytek v molekule. Je dobře známo, že trypsin hydrolyzuje esterovou vazbu daleko rychleji než peptidovou vazbu, proto byly připraveny 4 stereoizomery c(Lys-Hpp), kde Hpp = 2-hydroxy-3-fenylpropanová kyselina (LL, LD, DL, DD) a c(Trp-Hmp), kde Hmp = 2-hydroxy-4-methylpentanová kyselina (LL, LD, DL, DD) jako substráty proteolytických enzymů²⁷⁻²⁸.

Syntéza c(L-Lys-L-Hpp).HCl (cit. ²⁹) vycházela z kondenzace chráněného terc.butyloxykarbonyl-L-lysinu (Boc-L-Lys(Z)-OH) s N,N'-karbonyldiimidazolem (CDI) a terc.butyloxykarbonylhydrazinem L-hydroxy-3-fenylpropanové kyseliny (H-L-Hpp-N₂H₂Boc) v tetrahydrofuranu. Terc.butyloxykarbonylová skupina byla odbourána 3 hod. stáním v 99 % mravenčí kyselině. Přidáním 2 M-HCl/ethylacetát byl převeden hydrazin na hydrochlorid. K cyklizaci byla použita azidová metoda, protože běžná metoda pro přípravu cyklických dipeptidů (tj. působením methanolickeho amoniaku) může způsobit rozštěpení laktonového kruhu. Hydrogenace c(L-Lys(Z)-L-Hpp) v obvyklých alkoholických nebo vodných rozpouštědlech dává nízké výtěžky vzhledem k nestabilnímu šestičlennému laktonovému kruhu. Vedlejší reakce jsou potlačeny zkrácením doby redukce, použitím octové kyseliny jako rozpouštědla a velkého množství Pd černi jako katalyzátoru viz schéma 4.





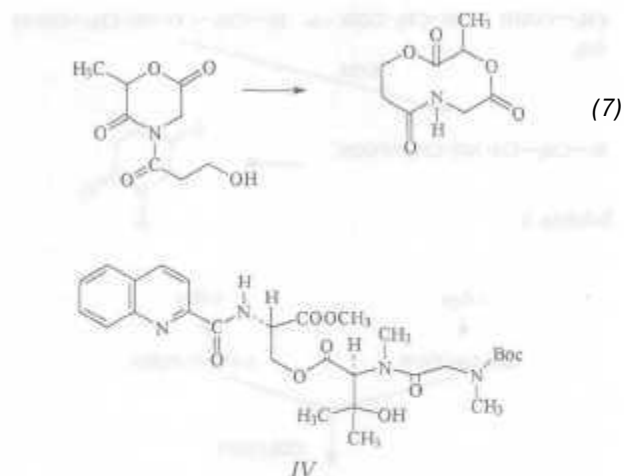
Cyklické didepsiptydy obsahující tryptofan a hydroxykyselinový analog lysinu 2-hydroxy-4-methylpentanovou kyselinu (Hmp) byly připraveny podle schématu 5.

L-2-Hydroxy-4-methylpentanová kyselina byla esterifikována benzylalkoholem a vzniklý ester kondenzován s terc.butyloxykarbonyltryptofanem působením N,N'-karbonyldiimidazolu v suchém tetrahydrofuranu. Po uvolnění karbonylové skupiny hydrogenací na Pd černi byla převedena na aktivní N-hydroxysukcinimidový derivát, který byl po acidolýze trifluoroctovou kyselinou s přidávkou 2 % β -merkaptioethanolu cyklizován v pyridinu³⁰.

6. Tri-, tetra- až polydepsiptydy

6.1. Tridepsiptydy

Tripeptolidový typ hydroxyacylaminokyselin byl syntetizován buď z hydroxyacylaminokyselin a aminokyselin nebo z hydroxykyselin a aminoacylaminokyselin. Pro aktivaci hydroxykyselin byla použita azidová a karbodiimidová metoda, ne však anhydridová metoda. Hydraziny byly získány z esterů hydrazinolýzou nebo volných karboxylových kyselin kondenzací s karbobenzoxyhydrazinem, *p*-nitrokarbobenzoxyhydrazinem nebo terc.butyloxykarbonylhydrazinem působením dicyklohexylkarbodiimidu. Aminoacylhydroxyacylaminokyseliny byly syntetizovány z výchozích N-chráněných aminoacyl-hydroxykyselin metodou směsných anhydridů. Azidová metoda byla aplikována,



když N'-chráněný hydrazid byl připraven jako výchozí.

Didepsiptydy obsahující 2-hydroxy-3-methylbutanovou kyselinu (Hmb) byly využity pro syntézu tridepsiptydů degradačních produktů z houby *Sarcodon scarbrosus*. Ac-Hmb-OH byla kondenzována CDI metodou v THF s methylesterem dipeptidu³¹.

Polští autoři se zabývali intramolekulárním přesmykem N-(β -3-hydroxypropionyl)-3-methyl-2,5-morfolindionu na cyklický tridepsiptyd cyklo(D,L-laktyl- β -hydroxypropionyl-glycyl)³² (7).

Při studiu aktivního tripeptidu luzopeptinu C (obsahové látky antibiotika luzopeptinu izolovaného z *Actinomadura luzonensis*) byl připraven modelový depsiptydový segment jako potenciální protinádorové a protivirové antibiotikum, který je perspektivní v terapii AIDS (cit. ³³). Tento modelový tripeptidový fragment obsahuje N-methyl-3-hydroxyvalin, serin vázaný na 2-chinolinkarboxylovou kyselinu (IV).

6.2. Tetradepsiptydy

Konformačními a ionoforickými vlastnostmi valinomycinových analogů cyklo [(D-Val-L-Pro-L-Val-D-Hyi)₄], kde Hyi = -OCH(CHMe₂)CO- a cyklo [(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Pro)₄] se zabývala skupina kolem Ovčinnikova³⁴. Zjistili, že záměnou L-Lac za L-Pro dochází k *cis*-konfiguraci terciární vazby v jakémkoli polárním rozpouštědle. Tyto konformery nebyly nalezeny ani ve valinomycinu ani v jeho hexadekanových analogích. Oba prolinové analogy valinomycinu jsou vysoce iontově selektivní pro alkalické kationty a tvoří s nimi komplexy v poměru 2:1.

Z houby *Streptomyces fulvissimus* bylo izolováno další antibiotikum - valinomycin³⁵. Bylo zjištěno, že je účinný

in vitro proti *Mycobacterium tuberculosis*. Je příkladem cyklické sloučeniny, ve které je zastoupen opticky aktivní α -hydroxykyselinový zbytek α -aminokyselinovým zbytkem.

Při totální hydrolyze valinomycinu se ukázalo, že toto antibiotikum je složeno ze 2 molekul L-valinu a D-valinu, L-mléčné kyseliny a 2 molekul D- α -hydroxyisovalerové kyseliny.

Dalším antibiotikem je enniatin B (cit. ¹⁷), ze kterého při alkalické hydrolyze vzniká vedle odpovídajícího laktону D- α -hydroxyisovaleryl-N-methyl-(+)-valin i 4-methyl-3,6-diisopropyl-2,5-morfolindion, zatímco při kyselé hydrolyze vznikají 2 moly N-methyl-(+)-valinu a 2 moly D- α -hydroxyisovalerové kyseliny. Na základě toho bylo chemické složení enniatinu B objasněno jako cyklická sloučenina s 12 členným kruhem.

Strukturou antibiotik odvozených od enniatinu B se zabývala také skupina Šemjakina a Ovčinnikova³⁶. Syntetizovali cyklotetradepsipeptid, obsahující D- α -hydroxyisovalerovou kyselinu a N-methyl-L-isoleucinový nebo N-methyl-L-valinový zbytek.

Kondenzací *p*-nitrobenzyloxykarbonyl-N-methyl-L-isoleucinu, *p*-nitrobenzyloxykarbonyl-N-methyl-L-valinu nebo *p*-nitrobenzyloxykarbonyl-N-methyl-L-leucinu s terc.butyl-D- α -hydroxyisovaleratem anhydridovou metodou (benzensulfonfylchlorid v pyridinu) poskytné odpovídající estery, z nichž podle schématu 3 byly získány odpovídající tetradepsipeptidy. Žádný ze získaných cyklotetradepsipeptidů však nevykázal aktivitu vůči *Mycobacterium phlei* v koncentraci do 100 y/ml, zatímco enniatin A je aktivní v koncentraci 1–1,25 y/ml a enniatin B v koncentraci 3 y/ml (schéma 6).

Dále bylo připraveno 35 cyklických analogů enniatinu A, B a C a beavericinu, lišících se od přírodních antibiotik velikostí kruhu, konfigurací zbytků kyselin a N-methylovými skupinami za účelem studia jejich antimikrobiální aktivity³⁷.

6.3. Polydepsipeptidy

V posledních letech se objevuje celá řada prací, týkajících se přípravy polydepsipeptidů^{10,38}. Vzhledem k tomu, že poly(α -hydroxykyseliny) a poly(α -aminokyseliny) mají velký význam pro medicínální použití jako chirurgický materiál, snadno absorbovatelný, vhodných mechanických vlastností, bez tvorby toxických produktů, byla věnována pozornost polydepsipeptidům - kopolymerům α -aminokyselin a α -hydroxykyselin, které mohou být vhodnou modifikací snadno vstřebatelného materiálu. Protože obsahují

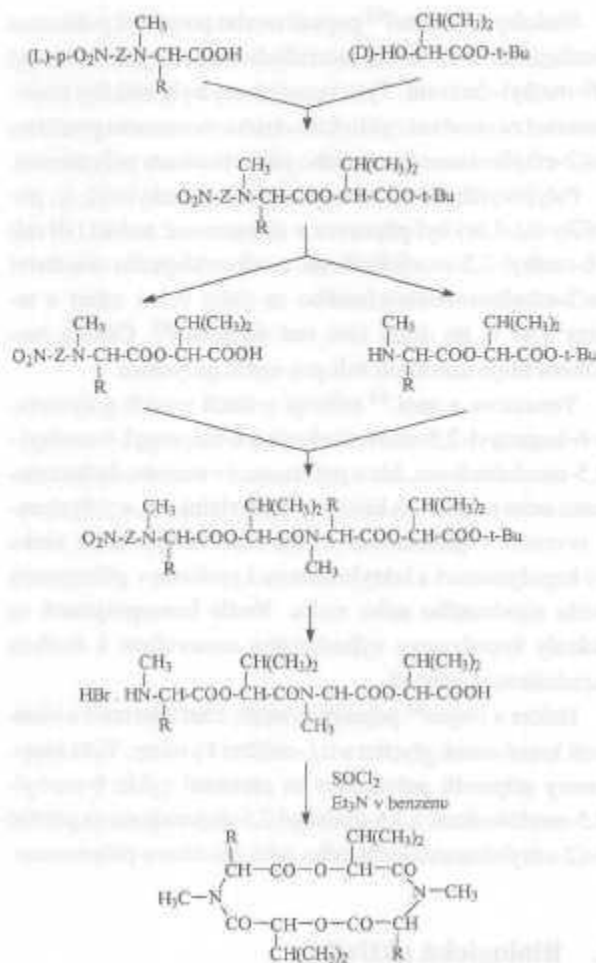
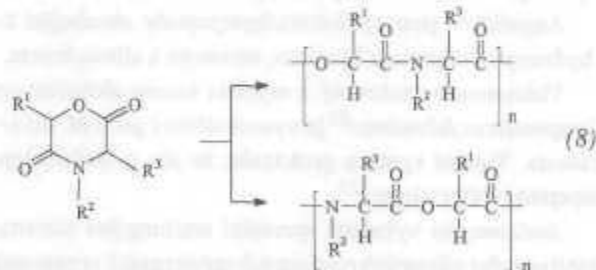


Schéma 6

vedle peptidové vazby i vazbu esterovou, jejich degradace bude odlišná od degradace homopolymerů.

Polydepsipeptidy s opakující se jednotkou [-Ala-Lac-Val-Lac-] byly připraveny v 50–75 % výtěžcích termickou polymerací pentachlorofenylesteru trifluoroacetátových solí L-alanyl-L-laktyl-L-alanyl-L-mléčné kyseliny a L-valyl-L-laktyl-L-valyl-L-mléčné kyseliny^{39,40}.

Další přístup k syntéze polydepsipeptidů je založen na polymerizaci za otevírání cyklických 2,5-morfolindionových derivátů⁴¹ (8).



Shakaby a Koelme⁴² popsali tvorbu polymerů *p*-dioxanu obsahujících 1-15 % 2,5-morfolindionu nebo jeho 3-methyl a *N*-methyl-derivátů. Tyto kopolymery byly získány kopolymerací za otevření cyklického kruhu monomeru použitím bis(2-ethylhexanoatu)cínatého jako iniciátoru polymerace.

Poly[oxyethylidenkarbonylimino(2-oxoethylen)], tj. poly(Gly-D,L-Lac) byl připraven v silanizované trubici (10 ml) z 6-methyl-2,5-morfolindionu a odpovídajícího množství bis(2-ethylhexanoatu)cínatého za tlaku 0,7-1 mbar a teploty 130 °C po dobu více než 40 hodin⁴³. Čistota monomeru hraje důležitou roli pro vznik polymeru.

Yonezawa a spol.⁴⁴ referují o třech typech polymerace 6-isopropyl-2,5-morfolindionu a 6-isopropyl-4-methyl-2,5-morfolindionu. Jde o polymeraci v roztoku dichlormethanu nebo toluenu za katalýzy diethylzinkem, o polymeraci tavením v přítomnosti oxidu zinečnatého nebo zinku a o kopolymeraci s laktylmléčnou kyselinou v přítomnosti oxidu zinečnatého nebo zinku. Vedle homopolymerů se ukázaly kopolymery výhodnějším materiálem s širokou variabilitou vlastností.

Helder a Feijen⁴⁵ popisují syntézu, charakterizaci a vlastnosti kopolymerů glycinu a D,L-mléčné kyseliny. Tyto kopolymery připravili polymeraci za otevírání cyklu 6-methyl-2,5-morfolindionu a 3,6-dimethyl-2,5-dioxandionu za použití bis(2-ethyloktanoatu)cínatého jako iniciátoru polymerace.

7. Biologická aktivita

Depsipeptidy mohou selektivně zasahovat do aktivního přenosu alkalických kovů⁴⁶ přes buněčné membrány a mají antibiotické vlastnosti, které se najejich komplexotvorných vlastnostech mohou zakládat.

7.1. Antibiotika

Lateritiin Ia je příbuzné látky inhibují růst mykobakterií a vykazují slabou aktivitu vůči zlatému stafylokoku¹⁸.

*Enniatiny A, B, C*⁴⁷⁻⁵⁰, izolované z hub rodu *Fusarium* vykazují rovněž aktivitu proti mykobakteriím.

*Angolidy*⁵¹ jsou cyklotetradepsipeptidy obsahující L-hydroxyisovalerovou kyselinu, isoleucin a alloisoleucin.

Valinomycin izolovaný z mycelia kmene aktinomycet *Streptomyces fulvisimus*⁵² je vysoce účinný proti *M. tuberculosis*. Totální syntéza prokázala, že jde o dodekadepsipeptid tvořící trimery⁵³.

Amidomycin vykazuje speciální antifungální aktivitu. Inhibuje růst některých rostlinných patogenních organismů

a některých kvasinek. Jedná se o cyklooktadepsipeptid se střídající se D- α -hydroxyvalerovou kyselinou a D-valinem⁵⁴.

Sporidesmolidy^{55,56} jsou metabolickými produkty houby *Sporidesmium bakteri*. Obsahují opakující se sekvenci dvou aminokyselin a jedné hydroxykyseliny.

Salinamidy A, B byly jako cyklické depsipeptidy izolovány z mořských bakterií rodu *Streptomyces* a jsou aktivní vůči Gram-pozitivním bakteriím⁵⁷.

7.2. Látky s antineoplastickým účinkem

Didemniny, izolované z rodu *Didemnidae* vykazují rovněž antivirovou a imunosupresivní aktivitu^{58,61}. Inhibují replikaci RNA a DNA viru, chrání např. myš proti P388 leukemii a B16 melanomu. Jsou vysoce toxické oproti L1210 leukemii buněk. Jako inhibitory proliferace lymfocytů jsou 1 000x účinnější než cyklosporin A (cit. 62). Nižší analoga didemninů vykazují rovněž cytotoxickou aktivitu⁶³.

Actinomycin D je inhibitorem syntézy DNA. Tvoří s DNA komplexy, které inhibují DNA dependentní, RNA-polymerasu a blokují tak tvorbu mRNA (cit. 64). Inhibuje replikaci virů^{65,67}. Dolastiny jsou buněčné růstové inhibitory izolované z *Dolabella auricularia*. Inhibují růst PC leukemie⁶⁸⁻⁷⁰.

7.3. Fytotoxické sloučeniny

AM Toxiny - cyklotetradepsipeptidy, které způsobují skvrny na listech jabloní⁷¹. BZR toxiny jsou produkovány *Bipolaris zeicola*. Způsobují skvrny na listech kukuřice a rýže⁷².

7.4. Látky s antifungální aktivitou

Geodiamolid A a jaspamid byly izolovány z mořských hub, mají rovněž cytotoxickou aktivitu⁷³. Aureobasidiny produkované *Aureobasidium pullulans* jsou složeny z osmi aminokyselin a jedné hydroxykyseliny (2-hydroxy-3-methylpentanové). Jsou aktivní vůči *Candida sp.* a *Cryptococcus*⁷⁴.

Halicylindramidy A-C tetradepsipeptidové struktury vykazovaly aktivitu vůči *Mortirella ramanniana* a také P388 leukemii⁷⁵.

7.5. Insekticidní toxiny (destrukciny)

Entomogenní houby produkující insekticidní toxiny jsou zdrojem nových toxoforů. Z *Metharcium anisopliae*

var. *major* byly izolovány destruktiny A₃, F (cit.⁷⁶), *desmethyldestruktiny* A a C, které obsahují ve své molekule 2,4-dihydroxypentanovou kyselinu.

Nemacidní cyklodepsipeptidy označené jako bussaphe-locidy A a B obsahují 2-hydroxy-3-methylpentanovou kyselinu⁷⁷.

7.6. Enzymové substráty

Z různých mikroorganismů byly izolovány inhibitory trypsinu, tzv. mikropeptiny⁷⁸, chymotrypsinu²⁶, substráty β-laktamasy⁷⁹⁻⁸² a substráty karboxypeptidasy^{83,84}.

7.7. Biodegradabilní nosiče

Polydepsipeptidy byly připraveny jako biodegradabilní nosiče aktivních látek především pro pohlavní hormony a kortikoidy⁸⁵. Tyto nosiče byly použity také k potahování tablet a mikrotobolek, vzhledem k jejich stálosti vůči kyselému prostředí žaludku. K uvolnění účinných látek dochází teprve ve střevě po odbourání polydepsipeptidu⁸⁶.

Práce byla podpořena grantem GA ČR 203/95/1483.

LITERATURA

1. Simmoneta M., Carra S.: *The Chemistry of Carboxylic Acids and Esters* (Patai S., ed.). Interscience 1, New York 1969.
2. Schröder E., Lübke K.: *The Peptides*, Sv. II., str. 376. Academia Press, New York 1966.
3. Katakai R.: J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1988, 1229.
4. Katakai R.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. I 1987, 2249.
5. Pozdněv V. F.: Bioorg. Chim. 11, 725 (1985).
6. Gilon Ch., Klausner Y.: Tetrahedron Lett. 40, 3811 (1979).
7. Cavicchioni G.: Tetrahedron Lett. 28, 2427 (1987).
8. Cavicchioni G., D'Angeli F., Casolari A., Orlandini P.: Synthesis 12, 947 (1988).
9. Zeggaf Ch., Poncet J., Jouin P., Dofour M. N., Castro B.: Tetrahedron 45, 5039 (1989).
10. Weingarten H. I.: GB 2 188 946 (1983); Chem. Abstr. 100, 156 991 t (1984).
11. Lerchen H. G., Kunz H.: Tetrahedron Lett. 26, 5257 (1985).
12. Zocher R., Keller U., Kleinkauf H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 110, 292 (1983).
13. Madry N., Zocher R., Grodzki K., Kleinkauf H.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 20(2), 83 (1984).
14. Goodman M., Venkatachalapathi Y. V., Mammi S., Katakai R.: J. Biosci 8(1-2), 223 (1985).
15. Arad O., Goodman M.: Biopolymers 29, 1633(1990).
16. Arad O., Goodman M.: Biopolymers 29, 1651 (1990).
17. Cook A. H., Cox S. F., Farmer T. H.: Nature 162, 61 (1948).
18. Cook A. H., Cox S. F., Farmer T. H.: J. Chem. Soc. 1949, 1022.
19. Hwang, Seung Sang, Hong Sung Il, Choi Nam Suk: Hanguk Sumyu Konghakhoe Chi 18, 200 (1981).
20. Shakaby S. W., Koelmel D. F.: EP 86 613 (1983).
21. Chadwick A. F., Pascu E.: J. Am. Chem. Soc. 65, 392 (1943).
22. McGee J., Ritchie P. D.: J. Chem. Soc. 1961, 1782.
23. Fischer, Schenkel: Ann. 354, 13 (1907).
24. Cook A. H., Cox S. F.: J. Chem. Soc. 1949, 2347.
25. Das M., Chaudhuri S., Chakravorti S. S.: Indian J. Chem. Sect B 245, 1302 (1985).
26. Rumsh L. D., Volkova L. I., Antonov V. K.: FEBS Lett. 9(2), 64(1970).
27. Yasutake Akira, Miyazaki Koichi, Hayashi Kumiji, Aoyagi Haruhiko, Kato Tetsuo, Izumira Nobuo: Pept. Chem. 1978, 161.
28. Yasutake Akira, Miyazaki Koichi, Aoyagi Haruhiko, Kato Tetsuo, Izumira Nobuo: FEBS Lett. 100, 241 (1979).
29. Yasutake Akira, Miyazaki Koichi, Aoyagi Haruhiko, Kato Tetsuo, Izumira Nobuo: Int. J. Pept. Protein Res. 76, 61 (1980).
30. Miyazaki Koichi, Yasutake Akira, Nishino Norikazu, Aoyagi Haruhiko, Kato Tetsuo, Izumira Nobuo: Int. J. Pept. Protein Res. 17(1), 118 (1981).
31. Tomida I., Maekita T., Hatanaka A.: Biosci. Biotech. Biochem. 59(12), 2300 (1995).
32. Kazmierczak R., Kupryszewski G.: Rozc. Chem. 41(1), 103 (1967).
33. Ciufolini M. A., Swaminathan S.: Tetrahedron Lett. 30, 3027(1989).
34. Balašova T. A., Fonina L. A., Senjavina L. B., Starovojtova N. V., Avotina G., Ivanov V. T., Ovčinnikov J. A.: Bioorg. Chim. 10, 437 (1984).
35. Brockmann H., Geeren H.: Justus Liebigs Ann. Chem. 603, 216(1957).
36. Šemjakin M. M., Ovčinnikov J. A., Ivanov V. T., Kirjuškin A. A.: Tetrahedron 19, 581 (1963).

37. Šemjakin M. M., Ovčinnikov J. A., Ivanov V. T., Evstratov A. V., Michaljeva I. I., Rjabova I. D.: *Zh. Obshch. Khim.* **42**(10), 2320 (1972).
38. Masaru Yoshida, Masaharu Asano, Minoru Kumakura: *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **77**, 337 (1990).
39. Nissen D., Gilon Ch., Goodman M.: *Makromol. Chem. Suppl.* **1**, 23 (1975).
40. Nissen D., Goodman M.: *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **25**, 516(1977).
41. Helder J., Kohn F. E., Sato S., Van den Berg J. W., Feijen J.: *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **6**, 9 (1985).
42. Shakaby W., Koelmel D.: *Eur. Pat. EP 80613* (1983).
43. Helder J., Kohn F. E., Sato S., Van den Berg J. W., Feijen J.: *Adv. Biomat.* **6**, 245 (1986).
44. Yonezawa N., Toda F., Hasegawa M.: *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **6**, 607 (1985).
45. Helder J., Feijen J., Lee S. J., Kim S. W.: *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **7**, 193 (1986).
46. Kunz H., Lerchen H. G.: *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 6335 (1989).
47. Plattner P. A., Nager N., Boiler A.: *Helv. Chim. Acta* **31**, 665, 2192 (1948).
48. Gäumann E., Roth S., Ettlinger L., Plattner P. A., Nager N.: *Experientia* **3**, 202 (1947).
49. Šemjakin M. M., Ovčinnikov J. A., Kirjuškin A. A., Ivanov V. T.: *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1965**, 1623.
50. Šemjakin M. M., Vinogradova E. I., Fejgina M. I., Aldanova N. A., Ovčinnikov J. A., Kirjuškin A. A.: *Zh. Obshch. Khim.* **34**, 1782 (1964).
51. McDonald C. G., Shannon J. S.: *Tetrahedron Lett.* **1964**, 3113.
52. Šemjakin M. M., Vinogradova E. I., Fejgina M. J., Aldanova N. A.: *Tetrahedron Lett.* **1963**, 351.
53. Dory I. L., Mellor J. M.: *Tetrahedron Lett.* **30**, 1695 (1989).
54. Taber W. A., Vinning L. C.: *Can. J. Microbiol.* **3**, 953 (1957).
55. Šemjakin M. M., Ovčinnikov J. A., Ivanov V. T., Kirjuškin A. A., Chalilulina K. Ch.: *Zh. Obshch. Khim.* **35**, 1399(1965).
56. Šemjakin M. M., Ovčinnikov J. A., Ivanov V. T., Kirjuškin A. A.: *Tetrahedron* **19**, 995 (1963).
57. Trischman J. A., Tapiolas D. M., Jensen P. R., Dwight R., Fenical W., McKee T. C., Ireland Ch. M., Stout T. J., Clardy J.: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 757 (1964).
58. Rinehart K. L., Kishore V., Bible K. C., Sakai Ryuichi, Sullins D. W., Li Kai Ming: *J. Nat. Prod.* **51**, 1 (1988).
59. Rinehart K. L.: *US 5,294,603*, (1994).
60. Rinehart K. L.: *Bioact. Compd. Mar. Org. Indo - U.S. Symp.* **1989**, 301.
61. Searle M. S., Hall J. G., Kyrtzsis I., Wakelin P. G.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **34**, 445 (1989).
62. Rinehart K. L., Sakai Ryuichi, Stroh J. G.: *US 4,948,791* (1990).
63. Furukubo Shigeru, Hamada Yasumasa, Shiori Takayuki: *Pept. Chem. 1992, Proc. Jpn. Symp.*, 2nd (1992).
64. Chu Wenhua, Shinomiya Miho, Kamitori Kazuyo Y., Kamitori Shigehiro, Carlson R. G., Weaver R. F., Takusagawa Fusao: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7971 (1994).
65. Kamitori Shigehiro, Takusagawa Fusao: *J. Mol. Biol.* **225**, 445(1992).
66. Kamitori Shigehiro, Takusagawa Fusao: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 4154 (1994).
67. Takusagawa Fusao: *J. Antibiot.* **38**, 1596 (1985).
68. Pettit G. R., Kamano Yoshiaki, Kizu Haruhisa, Du-fresne C., Herald Ch. L., Bontems R. J., Schmidt J. M., Boettner F. E., Nieman R. A.: *Heterocycles* **28**, 553 (1989).
69. Pettit G. R., Kamano Yoshiaki: *EP 399,685* (1990).
70. Kamano Yoshiaki, Kizu Haruhisa, Pettit G. R., Du-fresne C., Herald D. L., Herald Ch. L., Schmidt J. M., Cerny R. L.: *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* **31**, 641 (1989).
71. Ueda Kazuo, Waki Michinori, Teruya Yoshio, Izumiya Nobuo: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **62**, 1635 (1989).
72. Ueda K., Nakatsuka S.: *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* **33**, 659 (1991).
73. Imaeda Takayuki, Hamada Yasumasa, Shiori Takayuki: *Tetrahedron Lett.* **35**, 591 (1994).
74. Yoshikawa Yoshie, Ikai Katsushige, Umedi Yoshihisa, Ogawa Atsuko, Takesako Kazuto, Kato Ikunoshi, Naganawa Hiroshi: *J. Antibiot.* **46**, 1347 (1993).
75. Li Hong-yu, Matsunaga Shigeki, Fusetani Nobuhiro: *J. Med. Chem.* **38**, 338 (1995).
76. Wahlman M., Davidson B. S.: *J. Nat. Prod.* **56**, 643 (1993).
77. Kawazu Kazuyoshi, Murakami Tadashi, Ono Youko, Kanzaki Hiroshi, Kobayashi Akio, Mikawa Takashi, Yoshikawa Nobuji: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **57**, 98 (1993).

78. Okino Tatsufumi, Murakami Mashiro, Haraguchi Ryo, Munekata Hideaki, Matsuda Hisashi, Yamaguchi Katsumi: *Tetrahedron Lett.* 34, 8131 (1993).
79. Pazhanisamy S., Pratt R. F.: *Biochemistry* 28, 6870 (1989).
80. Govardhan Ch., Pratt R. F.: *Biochemistry* 26, 3385 (1987).
81. Dryjanski M., Pratt R. F.: *Biochemistry* 34, 3561 (1995).
82. Pazhanisamy S., Pratt R. F.: *Biochemistry* 28, 6875 (1989).
83. Wright G. D., Molinas C., Arthur M., Courvalin P., Walsh Ch. T.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1514(1992).
84. Martin M. T., Holmquist B., Riordan J. F.: *J. Inorg. Biochem.* 36, 39 (1989).
85. Masaru Yoshida, Masaharu Asano, Minoru Kumakura: *J. Biomed. Mater. Res.* 24, 1173 (1990).
86. Masaru Yoshida, Masaharu Asano, Minoru Kumakura, Ryoichi Katakai, Tooru Mashimo, Hisako Yuasa, Hidetoshi Yamanake: *Eur. Polym. J.* 27, 325 (1991).

J. Vinšová^a and E. Kasářírek^b (^a*Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*, ^b*Research Institute for Pharmacy and Biochemistry, Prague*): **Biologically Active Depsipeptides**

The review on contemporary knowledge of the group of depsipeptides. A hydroxy acid unit incorporated in a peptide chain is very similar to an amino acid unit. The ester bond is more labile than amide bond and may prove unstable in the usual conditions of peptide synthesis. The condensation, protecting groups, deprotection steps, and several side reactions are discussed. Attention is paid to the biological activity of depsipeptides.