

ХИМИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 615.332.038

**СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ N-АЦИЛЬНЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ АНТИБИОТИКА-ГЛИКОПЕПТИДА
РИСТОМИЦИНА А**

И.В. Денисова, И.Г. Смирнова, Т.Ф. Бердникова* , Г.С. Катруха*

(кафедра химии природных соединений)

Проведена специфическая химическая модификация свободных аминогрупп молекулы антибиотика – гликопептида ристомицина А остатками жирных кислот: энантовой ($C_7H_{14}O_2$), миристиновой ($C_{14}H_{28}O_2$), пальмитиновой ($C_{16}H_{32}O_2$). Получены соответствующие моно- и ди-N-ацильные производные антибиотика. Изучены их физико-химические и биологические свойства.

Настоящая работа является продолжением исследований по направленной химической модификации клинического антибиотика ристомицина А (ристоцетина А) [1–4]. Ристомицин А получен в НИИ по изысканию новых антибиотиков РАМН [5, 6], относится к антибиотикам группы далбагептидов [7, 8] и применяется в медицинской практике при лечении острых бактериальных инфекций, вызванных грамположительными бактериями – стафилококками, стрептококками и энтерококками, в том числе и обладающими устойчивостью к β -лактамам антибиотикам, тетрациклинам и макролидам. Антибиотики-далбагептиды обладают уникальной способностью воздействовать на бактерии, которая заключается в ингибировании биосинтеза клеточной стенки бактерий путем связывания с D-Ala-D-Ala-OH – фрагментом растущего пептидогликана [9, 10]. В последнее время обнаружены резистентные к далбагептидам штаммы бактерий, в пептидогликанах

клеточной стенки которых вместо фрагмента D-Ala-D-Ala-OH присутствует фрагмент D-Ala-D-Lactat [11], который практически не связывается с антибиотиками рассматриваемой группы, и бактерия продолжает свой жизненный цикл. Опасность широкого распространения резистентных ко многим антибиотикам штаммов болезнетворных бактерий требует развития исследований по выяснению механизма резистентности и поиска соединений, преодолевающих резистентность. Одним из подходов к решению данной задачи является направленная химическая модификация антибиотиков – далбагептидов ванкомициновой и ристомициновой групп [12].

Известно, что введение в молекулу гликопептидов гидрофобных радикалов определенного размера вызывает не только преодоление резистентности, но и расширение спектра действия антибиотика [13–15]. Поэтому в данной работе изучена возможность получе-

*НИИ по изысканию новых антибиотиков РАМН (Москва) .

ния ацильных производных по свободным аминогруппам ристомицина **A** с использованием активированных пентафторфениловых эфиров жирных кислот с различным числом углеродных атомов.

В работе использовали энантовую ($C_6H_{13}COOH$), миристиновую ($C_{13}H_{27}COOH$) и пальмитиновую ($C_{15}H_{31}COOH$) кислоты. Для активации карбоксильной группы получали пентафторфениловые эфиры жирных кислот по модифицированной методике [16] с применением дициклогексилкарбодиимида (КДИ). Активированные эфиры жирных кислот вводили в реакцию с антибиотиком ристомицином в присутствии N-метилморфолина в смеси ДМФА – H_2O при $37^\circ C$. Контроль за ходом реакции осуществляли с помощью электрофореза на бумаге в электролите (рН 1.1). Известно, что ристомицин содержит две свободные аминогруппы: аминогруппу N-концевой ристомициновой кислоты и аминсахара ристозамина, связанного с агликоном через β -оксигруппу трехядерной дидехлорванкомициновой кислоты [6].

В зависимости от количества вводимого в реакцию активированного эфира наблюдалось образование либо ди-N,N'-ацильного производного ристомицина **A**, либо смеси моно-N-, ди-N,N'-ацильных производных и свободного ристомицина **A**. Для получения индивидуальных компонентов реакцию смесь разделяли с помощью метода ТСХ на силикагеле в системе I – n-бутанол – $HCOOH - H_2O$ (4:1:1).

Однородность полученных N-ацильных производных ристомицина **A** проверяли методом ТСХ на силикагеле в системе II – этилацетат – *изо*-пропанол – 25%-й аммиак (15:15:20), а антибактериальную активность *in vitro* – методом биоавтографии с использованием в качестве тест-организма *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Было показано, что полученные моно-N-ацильные производные ристомицина **A** обладают антибактериальной активностью в отношении выбранного тест-организма. Причем наибольшую активность имеет ристомицин **A**, ацилированный энантовой кислотой. Ди-N,N'-ацильные производные ристомицина **A** практически неактивны, возможно, вследствие их плохой растворимости в испытанных водно-органических средах.

В дальнейшем предполагается продолжить работу по получению новых N-ацильных производных ристомицина **A**, а также изучению их биологических свойств в опытах *in vitro* и *in vivo* и комплексообразования с C-концевым фрагментом растущего пептидогликана бактериальной стенки N-Ас-D-Ala-D-Ala-OH.

Экспериментальная часть

В работе использовали образцы ристомицина **A** сульфата, полученного на опытной установке НИИ по изысканию новых антибиотиков РАМН (λ_{max} 280 нм, $E^{1\%} = 40$, $[a]_D^{20} = -131^\circ$ (с1, вода); алифатические кислоты, пентафторфенол, дициклогексилкарбодиимид и пластинки с силикагелем фирмы «Merck» (Германия)).

ТСХ проводили в системах: n-бутанол – $HCOOH$ – вода (4:1:1) (I), этилацетат – *изо*-пропанол – 25%-й аммиак (15:15:20) (II), бензол – гексан (1:1) (III).

Электрофорез проводили на приборе, работающем по принципу влажной камеры Дуррома (бумага *Filtrak FN-14* (Германия), электролит $HCOOH - CH_3COOH - H_2O$ (28:20:52), 300 В, 3 ч).

Электрофоретическую подвижность веществ (U) определяли по формуле

$$U = d \cdot l / V \cdot t \text{ (см}^2 \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1} \text{),}$$

где d – расстояние, пройденное веществом от точки нанесения (см), l – длина полоски бумаги (см), V – напряжение (В), t – время электрофореза (ч).

Активированные эфиры обнаруживали на пластинках по поглощению в УФ-свете и с помощью качественных реакций (гидроксамовой и с индикатором бромтимоловым-синим). Ристомицин и его производные обнаруживали по поглощению в УФ-свете, а также с помощью diazo-реакции Паули и нингидринового реактива [17].

Синтез активированных эфиров жирных кислот

Пентафторфениловый эфир пальмитиновой кислоты. К раствору 1.282 г пальмитиновой кислоты в смеси диоксан (25 мл) и CH_2Cl_2 (15 мл) прибавили 0.924 г пентафторфенола и раствор 1.03 г КДИ в 10 мл диоксана. Смесь перемешивали в течение 20 ч при комнатной температуре, отфильтровывали осадок дициклогексилмочевины, раствор упаривали и остаток растворяли в этилацетате. Этилацетатный раствор промывали несколько раз 3%-м водным раствором бикарбоната натрия, высушивали безводным Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Выход 60%. $C_{22}H_{31}O_2F_5$. $M = 422$, $T_{пл} = 39-40^\circ C$, $R_f = 0.92$ (I), 0.56 (II) и 0.60 (III).

Пентафторфениловый эфир миристиновой кислоты получен по аналогичной методике. Выход 60%. $C_{20}H_{27}O_2F_5$. $M = 394$. $T_{пл} = 37-40^\circ C$, $R_f = 0.94$ (I), 0.50 (II) и 0.55 (III).

Пентафторфениловый эфир энантовой кислоты получен по описанной выше методике. Выход 18 %. $C_{13}H_{13}O_2F_5$. $M = 296$. $T_{пл} = 25-28^\circ C$, $R_f = 0.97$ (I), 0.48 (II) и 0.54 (III).

Синтез N-ацильных производных ристомицина А

К раствору 83 ммоль ристомицина А сульфата в 0.5 мл воды прибавили по каплям N-метилморфолин до pH 9.0, а затем раствор 46 ммоль активированного эфира в 1.0 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивали в течение 18–20 ч при $37^\circ C$, продукт реакции осаждали ацетоном, осадок промывали ацетоном, растворяли в системе I и хроматографировали на пластинках 20×20 см с кизельгелем «Merck-60-F₂₅₄» (Германия) в той же системе. Местоположение производных на пластинке определяли по поглощению в УФ-свете, силикагель, содержащий производное антибиотика, собирали на фильтр и вещество элюировали 80%-м спиртом. Элюат упаривали в вакууме и проводили анализ полученного N-ацильного производного ристомицина А. Получены следующие N-ацильные производные ристомицина А:

Моно-N-энантоил-ристомицин А

$C_{102}H_{121}N_8O_{45}$. $M = 2178$, $R_f = 0.09$ (I), 0.84 (II), $U = 0.49$.

Ди-N,N'-энантоил-ристомицин А

$C_{109}H_{133}N_8O_{46}$. $M = 2290$, $R_f = 0.20$ (I), 0.86 (II), $U = 0$.

Моно-N-миристиноил-ристомицин А

$C_{109}H_{135}N_8O_{45}$. $M = 2276$, $R_f = 0.17$ (I), 0.84 (II), $U = 0.48$.

Ди-N,N'-миристиноил-ристомицин А

$C_{123}H_{161}N_8O_{46}$. $M = 2486$, $R_f = 0.33$ (I), 0.84 (II), $U = 0$.

Моно-N-пальмитиноил-ристомицин А

$C_{111}H_{139}N_8O_{45}$. $M = 2304$. $R_f = 0.18$ (I) и 0.85 (II), $U = 0.45$.

Ди-N,N'-пальмитиноил-ристомицин А

$C_{127}H_{169}N_8O_{46}$. $M = 2542$, $R_f = 0.29$ (I), 0.89 (II), $U = 0$.

Таким образом, в результате проведенной работы получены активированные пентафторфениловые эфиры энантовой, миристиновой и пальмитиновой кислот.

С помощью активированных эфиров энантовой, миристиновой и пальмитиновой кислот впервые получены соответствующие моно- и ди-N-ацильные производные антибиотика-гликопептида ристомицина А и показано, что моно-N-ацильные производные обладают антибактериальной активностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Катруха Г.С., Трифонова Ж.П., Смирнова И.Г., Еганян Е.Р., Смянова Г.И. Тез. докл. Всесоюз. симпозиум «Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов». г.Рига, 1982. С. 46.
2. Смирнова И.Г., Трифонова Ж.П., Смянова Г.И., Федорова Г.Б., Катруха Г.С. Антибиотики и медицинская биотехнология. 1986. **31**. С. 588.
3. Трифонова Ж.П., Стурман Н.В., Катруха Г.С., Федорова Г.Б. // Антибиотики и химиотерапия. 1988. **33**. С. 814.
4. Kobrin M.B., Katrukha G.S., Fedorova G.B. // J. Antibiotics. 1989. **42**. С. 1441.
5. Ломакина Н.Н. Дис. ... докт. хим. наук. М., 1969.
6. Ломакина Н.Н., Катруха Г.С., Бражникова М.Г., Силаев А.Б., Трифонова Ж.П., Диарра Б. // Антибиотики. 1982. **27**. С. 8.
7. Katrukha G.S., Silaev A.B. / Chemistry of Peptides and Proteins. Vol. 3. 1986. P. 289.
8. Cavalleri B., Parenti F. Glycopeptides (dalbaheptides). Encyclopedia of Chem. Technology. 4/e. Vol. 2. 1992. P. 995.
9. Barna J.C.J., Williams D.H. // Ann. Rev. Microbiol. 1984. **38**. P. 339.
10. Reynolds P.E. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1989. **8**. P. 943.
11. Тренин А.С. Антибиотики и химиотерапия. 1996. **41**. С. 49.
12. Тренин А.С., Олсуфьева Е.Н. // Биоорганическая химия. 1997. **23**. С. 851.
13. Allen N.E., LeTourneau D.L., Hobbs J.N., Jr. // J. Antibiotics. 1997. **50**. С. 677.
14. Nicas T.I., Mullen D.L., Flokovitch J.E. et al. // Antimicrob. Agents Chemoter. 1996. **40**. P. 2194.
15. Schwalbe R.S., McIntosh A.C., Oaiyumi S. et al. // Antimicrob. Agents Chemoter. 1996. **40**. P. 2416.
16. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. Киев, 1992. С. 73.
17. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Шталя. М., 1965. С. 476.