



УДК 615.332.038

© 1991 г.

*А. Ю. Павлов, Е. Н. Олсуфьева, Т. Ф. Бердникова,
Б. В. Розынов *, Л. Г. Александрова, И. В. Малкова,
М. Н. Преображенская*

СИНТЕЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРОВ АНТИБИОТИКА ЭРЕМОМИЦИНА ПО КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППЕ

*Всесоюзный научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
АМН СССР, Москва;*

**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

Получены метиловый, бензиловый и дифенилметиловый эфиры антибиотика эремомицина по карбоксильной группе с использованием метода диазоалканов. Эти производные незначительно уступают по антибактериальной активности исходному эремомицину.

Интерес к антибиотикам из группы полициклических гликопептидов, среди которых наиболее известны ванкомицин (США), ристомицин А (ристоцетин А) (СССР) и тейкопланин (Италия) [2], обусловлен их ценными лечебными свойствами, связанными с уникальным механизмом действия [1]. Эти соединения высокоактивны в отношении метициллинустойчивых стафилококков, пневмококков и других грамположительных бактерий, и, что самое важное, их применение в клинике не приводит к появлению устойчивых форм микроорганизмов.

Недавно в СССР выделен и идентифицирован новый антибиотик этой группы — эремомицин (I), который также обладает высокой антибактериальной активностью [3]. Однако, как и в случае всех других антибиотиков — полициклогликопептидов, его применение приводит к возникновению ряда побочных эффектов.

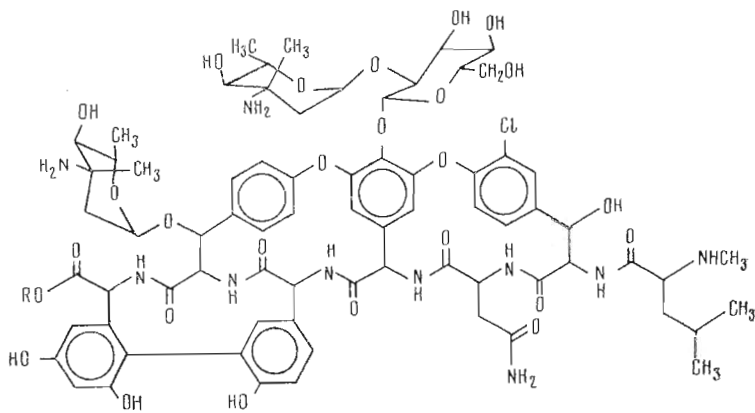
С целью снижения нежелательных побочных реакций (нефро- и ототоксичность, аллергенность и др.) в последние годы начата работа по химической модификации указанных антибиотиков [4—8]. Так, на основе эремомицина (I) ранее был получен ряд N-алкильных и N-ацильных производных [8].

В данной работе изучена возможность получения эфиров эремомицина по карбоксильной группе и влияние такой модификации на антибактериальную активность. Можно было ожидать, что этерификация C-концевой карбоксильной группы эремомицина не приведет к потере антибактериальной активности, поскольку среди природных антибиотиков группы полициклических гликопептидов есть высокоактивные соединения, содержащие этерифицированную C-концевую аминокислоту, например ристомицин (ристоцетин).

Хотя в литературе имеются данные о применении метода Фишера для получения эфиров псевдоагликона тейкопланина [9], этерификация эремомицина избытком соответствующего спирта в присутствии хлористого водорода или *n*-толуолсульфокислоты не привела к положительным результатам. Это связано с наличием в молекуле антибиотика кислотолabileй дисахаридной группировки [10]. Применение диметилсульфата или алкилгалогенидов сопровождалось алкилированием фенольных и аминогрупп эремомицина.

Этерификацию антибиотика удалось успешно провести с помощью диазоалканов. Воздействием избытков диазометана [11], фенилдиазоме-

тана (получен по модифицированной методике [11]) и дифенилдиазометана [12] были синтезированы соответственно метиловый (II), бензидовый (III) и дифенилметиловый (IV) эфиры эремомицина.



- (I) R=H
 (II) R=CH₃
 (III) R=CH₂C₆H₅
 (IV) R=CH(C₆H₅)₂

Диазометан по реакционной способности значительно превосходит другие диазоалканы, поэтому возможна побочная реакция метилирования фенольных групп. Образование побочных продуктов удалось избежать подбором оптимального количества реагента (1 М раствор диазометана в эфире). При этом в смеси после реакции помимо целевого продукта (II) присутствовал также исходный эремомицин (I), что потребовало дополнительной очистки метилового эфира (II) на колонке с карбоксиметилцеллюлозой.

В случае фенил- и дифенилдиазометана из-за пространственных затруднений наблюдалось незначительное образование побочных продуктов. Это позволило провести реакции практически до полного исчезновения исходного антибиотика (I).

В ИК-спектрах эфиров эремомицина (II)—(IV) имеется характеристическая полоса поглощения сложноэфирной связи при 1750 см^{-1} , отсутствующая в ИК-спектре исходного антибиотика (I). В спектрах ¹H-ЯМР эфиров (II)—(IV) имеются все сигналы протонов, характерные для молекулы эремомицина (рис. 1), а также сигналы протонов введенных эфирных групп. Так, в ¹H-ЯМР-спектре метилового эфира (II) имеется дополнительный трехпротонный синглет метоксигруппы с δ 3,93 м. д., бензидовый эфир (III) проявляет дополнительный пятипротонный синглет при δ 7,43 м. д., а дифенилметиловый эфир (IV) — два пятипротонных синглета при δ 7,23 и 7,18 м. д.

Строение эфиров (II) и (IV) подтверждено также тем, что в масс-спектрах этих соединений присутствуют пики ионов $[M + H]^+$ с m/z 1571 и 1723 соответственно.

С целью дальнейшего изучения биологической активности полученных полусинтетических производных нами были разработаны условия определения степени чистоты эфиров эремомицина (II)—(IV) методом ВЭЖХ.

Разделение антибиотиков группы полициклических гликопептидов в большинстве случаев проводят на обращенной фазе с привитыми октильными [13] или октадецильными группами [14], используя в качестве подвижной фазы системы, состоящие из метанола [15] или ацетонитрила [16] и буферного раствора; часто используют также ион-парную хроматографию [17]. Хроматографию осуществляют как в изократическом [18], так и в градиентных режимах.

Нами ранее предложены хроматографические системы с использованием линейного градиента для разделения ристоцетина, эремомицина

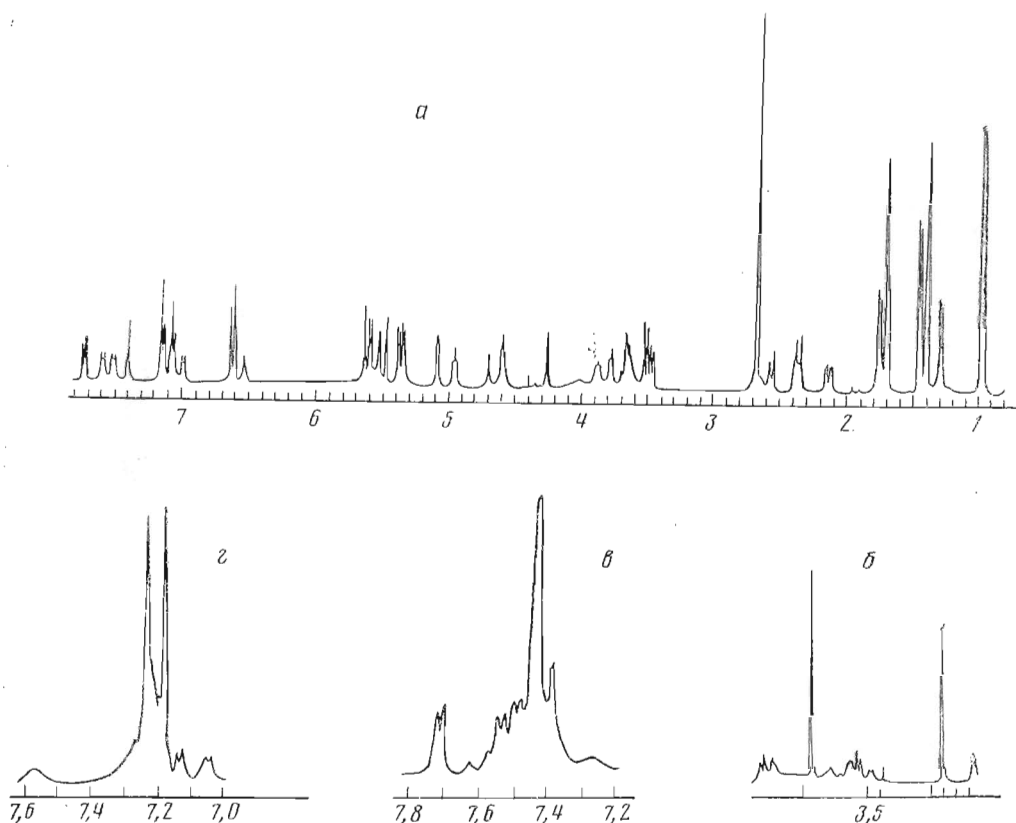


Рис. 1. ^1H -ЯМР-спектр эремомицина (I) в D_2O при 70°C (a) и фрагменты ^1H -ЯМР-спектров его метилового (б), бензилового (в) и дифенилметилового (г) эфиров. Спектр записан в $\text{CH}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}$ (3 : 1)

и продуктов их деградации [19]. Однако эти системы оказались непригодными для определения малых количеств эремомицина (I) в эфирах эремомицина.

Для разделения этих компонентов было применено градиентное элюирование с использованием ацетонитрила и 0,1 М раствора $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (рН 3,7).

Подобранная система и режим разделения искусственной смеси позволяют надежно оценить степень чистоты антибиотика и каждого из производных (II)–(IV), поскольку их времена удерживания достоверно различаются и составляют соответственно 10,7; 12,75; 19,2 и 24,1 мин (рис. 2). В этих условиях было определено, что метиловый эфир эремомицина (II),

Активность производных эремомицина в отношении метициллинустойчивых штаммов *S. aureus*, выделенных от больных, в сравнении с эремомицином, ванкомицином и тейкопланином

Соединение	Диапазон колебаний МПК	МПК ₅₀ *	МПК ₉₆ *
	мкг/мл		
Эремомицин (I)	0,25–1	0,5	1
Метиловый эфир эремомицина (II)	0,5–2	1	2
Бензиловый эфир эремомицина (III)	1–8	4	8
Дифенилметиловый эфир эремомицина (IV)	2–8	4	8
Ванкомицин	0,5–2	2	2
Тейкопланин	0,5–8	2	4

* МПК₅₀ и МПК₉₆ — минимальная концентрация, подавляющая соответственно на 50 и 96% рост 20 метициллинустойчивых штаммов.

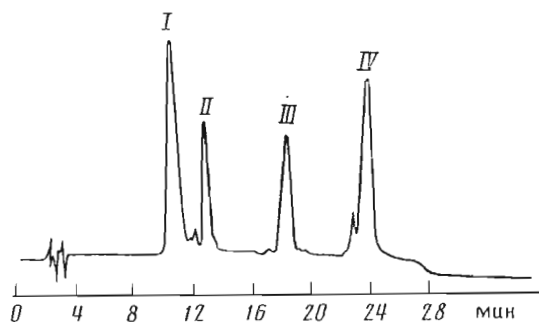


Рис. 2. ВЭЖХ искусственной смеси эремомицина (I) и его эфиров (II)—(IV). Условия разделения приведены в «Экспер. части»

полученный как описано выше, содержит 1%, а бензиловый (III) и дифенилметилловый (IV) — менее 1% исходного антибиотика (I).

Антимикробную активность производных эремомицина (II)—(IV) в сравнении с исходным антибиотиком (I), ванкомицином и тейкопланином изучили в отношении 20 метициллинустойчивых клинических штаммов *Staphylococcus aureus*. Как видно из таблицы, все производные эремомицина оказались активными в отношении метициллинустойчивых штаммов *S. aureus*.

Среди полученных производных наибольшей антибактериальной активностью обладает метиловый эфир (II), МПК₅₀ и МПК₉₀ которого выше тех же показателей эремомицина только в 2 раза.

Экспериментальная часть

Анализ производных проводили методом ТСХ на пластинках с силикагелем 60F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системах: этилацетат — *n*-пропанол — 25% водный аммиак, 1 : 1 : 1 (А), *n*-бутанол — *n*-пропанол — 25% водный аммиак, 3 : 4 : 1,5 (Б), а также методом электрофореза на бумаге с использованием 0,05 М пиридин-ацетатного буфера (рН 5,6) при 900 В в течение 3 ч. Электрофоретическую подвижность (E_f) рассчитывали по отношению к эремомицину. Проявление антибиотика и его производных осуществляли с помощью реактива Паули.

Препаративную ионообменную хроматографию проводили на СМ-целлюлозе Whatman CM-32 с использованием установки для создания градиента Ultrograd (LKB, Швеция).

ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Du Pont 8800 (США), колонка (0,46 × 25 см) Zorbax ODS, 5 мкм, детектор SP 8490 (λ 245 нм). Для хроматографирования использовали линейный градиент от 100% А до 100% Б, где раствор А: 5% ацетонитрил — 95% 0,1 М NH₄H₂PO₄, а раствор Б: 45% ацетонитрил — 55% 0,1 М NH₄H₂PO₄. Скорость потока 1 мл/мин, время хроматографирования 25 мин, температура 35° С. Анализируемые растворы (0,5 мг/мл) перед хроматографированием фильтровали через фильтры FH фирмы Millipore с размером пор 0,45 мкм.

Оптическое вращение образцов измеряли на поляриметре Perkin — Elmer-241 (Швеция). УФ-спектры снимали в 0,01 н. HCl на спектрофотометре SP-8000 (Pye-Unicam, Великобритания), ИК-спектры (в таблетке с KBr) — на спектрофотометре SP-1100 (Pye-Unicam, Великобритания). Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометре VXR-400 (Varian, Швейцария). Масс-спектры получали на время-пролетном масс-спектрометре BIN-10K (Швеция) ионизацией помещенных на нитроцеллюлозу веществ осколками деления калифорния-252.

В работе использовали эремомицин-сульфат (λ_{max} 280 нм, $E_{1\text{ см}}^{1\%}$ 40, $[\alpha]_D^{20}$ —100° (c 1, вода), R_f 0,1 (А), 0 (Б), получен на опытной установке ВНИИ по изысканию новых антибиотиков АМН СССР), ванкомицин (Eli Lilly, США) и тейкопланин (Gruppo Lepetit, Италия).

Метилловый эфир эремомицина (II). К раствору 330 мг (0,2 ммоль) сульфата эремомицина (I) в 15 мл диметилсульфоксида при 20° С и перемешивании прибавляли двумя порциями (1,5 и 2 мл) с интервалом 5 мин 1 М раствор диазометана в эфире. После перемешивания в течение 1 ч продукт реакции осаждали 60 мл смеси эфира и ацетона (5:1). Получали 330 мг смеси исходного (I) и целевого (II), которую разделяли на колонке (1 × 45 см) с СМ-целлюлозой в прямом градиенте от 0,2 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4\text{—C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (9:1), рН 6,7, до 0,2 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4\text{—C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (9:1, с добавлением NH_4OH до рН 9,0). Фракцию, содержащую эфир (II), подкисляли 6 н. H_2SO_4 до рН 6,0. Из солевого раствора эфир (II) выделяли путем сорбции на XAD-2 (Serva, ФРГ) с последующей элюцией смесью вода — ацетонитрил (1:1). Элюат упаривали до объема 2 мл и целевое соединение (II) осаждали 60 мл ацетона. Выход эфира (II) 150 мг (47%); R_f 0,25 (А), 0,06 (Б); E_f 1,26; $[\alpha]_D^{25} -100^\circ$ (с 1, вода); УФ-спектр: λ_{max} 280 нм, $E_{1\%}^{1\text{см}}$ 39; масс-спектр: m/z 1572 ($M + H$)⁺. $\text{C}_{74}\text{H}_{91}\text{N}_{10}\text{O}_{26}\text{Cl}$.

Бензиловый эфир эремомицина (III). К раствору 165 мг (0,1 ммоль) сульфата эремомицина в 3 мл воды при 20° С и перемешивании прибавляли тремя порциями (1, 1 и 2 мл) с интервалом 30 мин и 1 ч 2 М раствор фенилдиазометана в диоксане. Перемешивание продолжали 2 ч. После этого продукт реакции осаждали 50 мл ацетона. Сухое вещество растворяли в 20 мл воды и экстрагировали *n*-бутанолом (10 мл × 5). Водный слой упаривали до объема 3 мл и целевое соединение (III) осаждали 50 мл ацетона. Выход эфира (III) 110 мг (63%). R_f 0,55 (А), 0,30 (Б); E_f 1,16; $[\alpha]_D^{25} -100^\circ$ (с 1, вода); УФ-спектр: λ_{max} 280 нм, $E_{1\%}^{1\text{см}}$ 39.

Дифенилметилловый эфир эремомицина (IV). К раствору 165 мг (0,1 ммоль) сульфата эремомицина в 3 мл 0,1 н. HCl в метаноле при 20° С и перемешивании прибавляли тремя порциями (0,2, 0,2 и 0,3 мл) с интервалом в 20 и 30 мин 10 М раствор дифенилдиазометана в диоксане. Перемешивание продолжали 1 ч. После этого продукт реакции осаждали 50 мл эфира. Сухое вещество растворяли в 20 мл воды, трижды экстрагировали (по 10 мл) смесью *n*-бутанол — этилацетат (1:1), водный слой упаривали, целевое соединение (IV) растворяли в 3 мл метанола и осаждали 50 мл эфира. Выход 120 мг (66%); R_f 0,60 (А), 0,40 (Б); E_f 1,10; $[\alpha]_D^{25} -87^\circ$ (с 1, вода); УФ-спектр: λ_{max} 280 нм, $E_{1\%}^{1\text{см}}$ 39; масс-спектр: m/z 1723 ($M + H$)⁺. $\text{C}_{86}\text{H}_{99}\text{N}_{10}\text{O}_{26}\text{Cl}$.

Антимикробную активность производных антибиотика изучали методом двукратных серийных разведений на плотной питательной среде (АГВ). Величина микробной нагрузки составляла 10^7 микробных тел в 1 мл. Бактериальные суспензии наносили штампом-репликатором на поверхность среды.

Авторы благодарят проф. П. Роепсдорфа (Дания) за получение масс-спектров, а также канд. хим. наук Н. П. Потапову и Э. И. Лажко за получение ¹H-ЯМР-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бердникова Т. Ф., Ломакина Н. Н. // Антибиотики и мед. биотехнол. 1986. Т. 31. № 11. С. 814—822.
2. Coronelli C., Gallo G. G., Cavalleri B. // Farmaco. Ed. sci. 1987. V. 40. P. 767—786.
3. Гаузе Г. Ф., Бражникова М. Г., Лайко А. В., Свешникова М. А., Преображенская Т. П., Федорова Г. Б., Борисова В. Н., Толстых И. В., Юрина М. С., Покрыс Л. С., Гольдберг Л. Е., Малкова И. В., Степанова Э. С. // Антибиотики и мед. биотехнол. 1987. Т. 32. № 8. С. 571—576.
4. Катруха Г. С., Смирнова И. Г., Трифонова Ж. П., Слезнова Г. И., Федорова Г. Б. // Антибиотики и мед. биотехнол. 1986. Т. 31. № 8. С. 588—592.
5. Пат. Европы, 0201251.
6. Пат. США, 4639433.
7. Malabarba A., Trani A., Ferrari P., Pallanza R., Cavalleri B. // J. Antibiotics. 1987. V. 40. № 11. P. 1572—1587.
8. Олсуфьева Е. Н., Бердникова Т. Ф., Докшина П. Ю., Ломакина Н. Н., Орлова Г. И., Малкова И. В., Прозорова И. Н. // Антибиотики и химиотерапия. 1989. Т. 34. № 5. С. 352—357.
9. Пат. США, 0182157.
10. Ломакина Н. Н., Бердникова Т. Ф., Токарева Н. Л., Абрамова Е. А., Докшина Н. Ю. // Антибиотики и химиотерапия. 1989. Т. 34. № 4. С. 254—258.

11. Синтезы органических препаратов. М.: ИЛ, 1949. Сб. 12. С. 174.
12. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза. М.: Мир, 1970. Т. 1. С. 385—387.
13. Malabarba A., Strazzalini P., Depaoli A., Landi M., Berti M., Cavalleri B. // J. Antibiotics. 1984. V. 37. № 9. P. 988—999.
14. Falcoz P. Y., Sassard J. H. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1987. V. 31. № 8. P. 1255—1262.
15. Joos B., Luthy R. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1987. V. 31. № 8. P. 1222—1224.
16. Levy J., Truog B. L., Goignau H., Laethem I. V., Butzler J. P., Baurdoux P. // J. Antimicrobial Chemotherapy. 1987. V. 19. № 4. P. 533—539.
17. McClain J. B. L., Bongiovanni R., Brown S. // J. Chromatogr. 1982. V. 231. P. 463—466.
18. Bauchet J., Pussard E., Garaud J. J. // J. Chromatogr. 1987. V. 414. P. 472—476.
19. Александрова Л. Г., Бражникова М. Г., Бердникова Т. Ф., Абрамова Е. А. // Тез. докл. на I Советско-американском симпозиуме по антибиотикам и химиотерапии. М., 1988. С. 4.

Поступила в редакцию
2.VII.1990

A. Yu. PAVLOV, E. N. OLSUFYEVA, T. F. BERDNIKOVA, B. V. ROZYNOV*,
L. G. ALEKSANDROVA, I. V. MALKOVA, M. N. PREOBRAZHENSKAYA

**SYNTHESIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ANTIBIOTIC
EREMOMYCIN ESTERS**

*Institute of New Antibiotics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow:
* M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Methyl, benzyl and diphenylmethyl esters of the glycopeptide antibiotic eremomycin were obtained by its treatment with corresponding diazoalkanes. The esters have high antibacterial activity but are less active than the parent antibiotic.