



УДК 615.332.012

НЕПРИРОДНЫЕ АГЛИКОНЫ ГЛИКОПЕПТИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ ВАНКОМИЦИНОВОЙ ГРУППЫ. СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

© 1997 г. А. Ю. Павлов[#], Е. Н. Олсуфьева, О. В. Мирошникова, М. И. Резникова, Э. И. Лажко,
А. Малабарба*, Р. Чабатти*, М. Н. Преображенская

НИИ по изысканию новых антибиотиков РАМН, 119867, Москва, ул. Большая Пироговская, 11

* *Lepetit Research Center, Gerenzano (Varese), Италия*

Поступила в редакцию 16.12.96 г.

В качестве нового подхода к модификации гептапептидного кора гликопептидных антибиотиков разработаны методы замены аминокислот в положениях 1 и 3 в агликоне тейкопланина и аминокислоты в положении 1 в агликоне эремомицина. Получено 6 новых неприродных агликонов ванкомицинового типа. Соединения, синтезированные из агликона тейкопланина, высокоактивны *in vitro* в отношении грамположительных бактерий, два из них проявляют также активность в отношении ванкомицинустойчивых энтерококков.

Ключевые слова: гликопептидные антибиотики, ванкомицинустойчивые энтерококки, эремомицин, тейкопланин.

Гликопептидные антибиотики ванкомициновой группы (ванкомицин, тейкопланин) (рис. 1) являются препаратами последнего выбора при лечении инфекций, вызванных грамположительными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью (стафилококками, энтерококками, стрептококками, клостридиями).

Механизм действия гликопептидных антибиотиков основывается на их связывании с С-концевым фрагментом $-Lys-D-Ala-D-Ala$ пептидогликана строящейся клеточной стенки бактерий (рис. 2) [1]. Это приводит к остановке синтеза пептидогликана и гибели бактерий.

В последние годы широкое применение ванкомицина и тейкопланина привело к появлению и распространению мультирезистентных штаммов энтерококков, устойчивых также и к гликопептидным антибиотикам (например, ванкомицинустойчивые штаммы *Enterococcus faecium* L 569 и *Enterococcus faecalis* L 562) [2]. Это явление представляет собой серьезную угрозу, поскольку инфекции, вызванные этими бактериями, не поддаются лечению ни одним из имеющихся в настоящее время в клинике лекарственных средств. Такие бактерии для построения пептидогликана клеточной стенки используют не остаток $-Lys-D-$

$Ala-D-Ala$, а депсипептидный фрагмент $-Lys-D-Ala-D-Lac$, который практически не связывается с гликопептидами (рис. 2). Кроме этого в клинике все чаще выявляются штаммы коагулазотрицательных стафилококков (например, *Staphylococcus haemolyticus* L 602), имеющих пониженную чувствительность и к тейкопланину, и к ванкомицину.

Все вышесказанное делает актуальной проблему получения новых полусинтетических гликопептидов, высокоактивных в отношении ванкомицинустойчивых энтерококков и коагулазотрицательных стафилококков.

Одним из наиболее перспективных направлений является химическая модификация $Lys-D-Ala-D-Ala$ -связывающего кармана антибиотика – его пептидного кора. Известно [1], что в образовании комплекса антибиотик–мишень непосредственное участие принимают аминокислоты 1 и 3 (рис. 2). Они образуют стенки гидрофобного кармана, в котором размещается фрагмент $-Lys-D-Ala-D-Ala$. Поэтому замена этих аминокислот на другие аминокислоты или их аналоги может привести как к увеличению прочности комплекса антибиотик–мишень у чувствительных бактерий, так и к возможности образования комплекса антибиотика с фрагментом $-Lys-D-Ala-D-Lac$ у ванкомицинустойчивых энтерококков.

Необходимо отметить, что активность гликопептидных антибиотиков сохраняется только при определенной абсолютной конфигурации аминокислот их пептидного кора, и в частности первая

Сокращения: Lac – остаток молочной кислоты, NOV1 – 1-гидроксибензотриазол, RuVOP – бензотриазолокси-трис-пирролидинофосфония гексафторфосфат,

Fmoc – флуорен-9-илметоксикарбонил-, Bom – бензилоксиметил-, Pfp – пентафторфенил.

[#] Автор для переписки (тел.: 245-37-53).

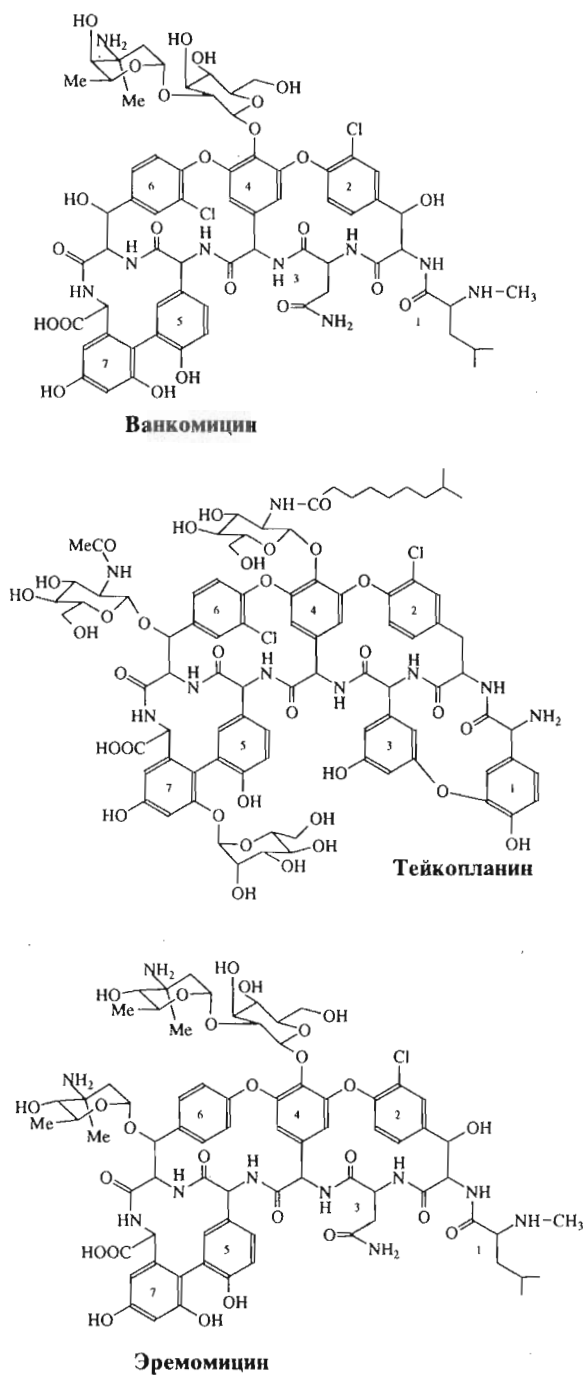


Рис. 1. Строение некоторых гликопептидных антибиотиков. Цифрами обозначены аминокислотные остатки гептапептидного кора.

аминокислота должна иметь только *D*-, а третья – только *L*-конфигурацию. Известно, что обращение конфигурации этих аминокислот приводит к полной потере активности [3].

Для модификации гептапептидного кора были использованы агликоны тейкопланина и эремомицина. Оригинальный отечественный гликопептидный антибиотик эремомицин (рис. 1) был

получен в НИИ по изысканию новых антибиотиков РАМН [4]. По активности он в несколько раз превосходит ванкомицин и тейкопланин, однако ванкомицинустойчивые энтерококки, резистентные к ванкомицину и тейкопланину, не чувствительны также и к эремомицину.

Предварительно нами была исследована возможность замены первой аминокислоты. В каче-

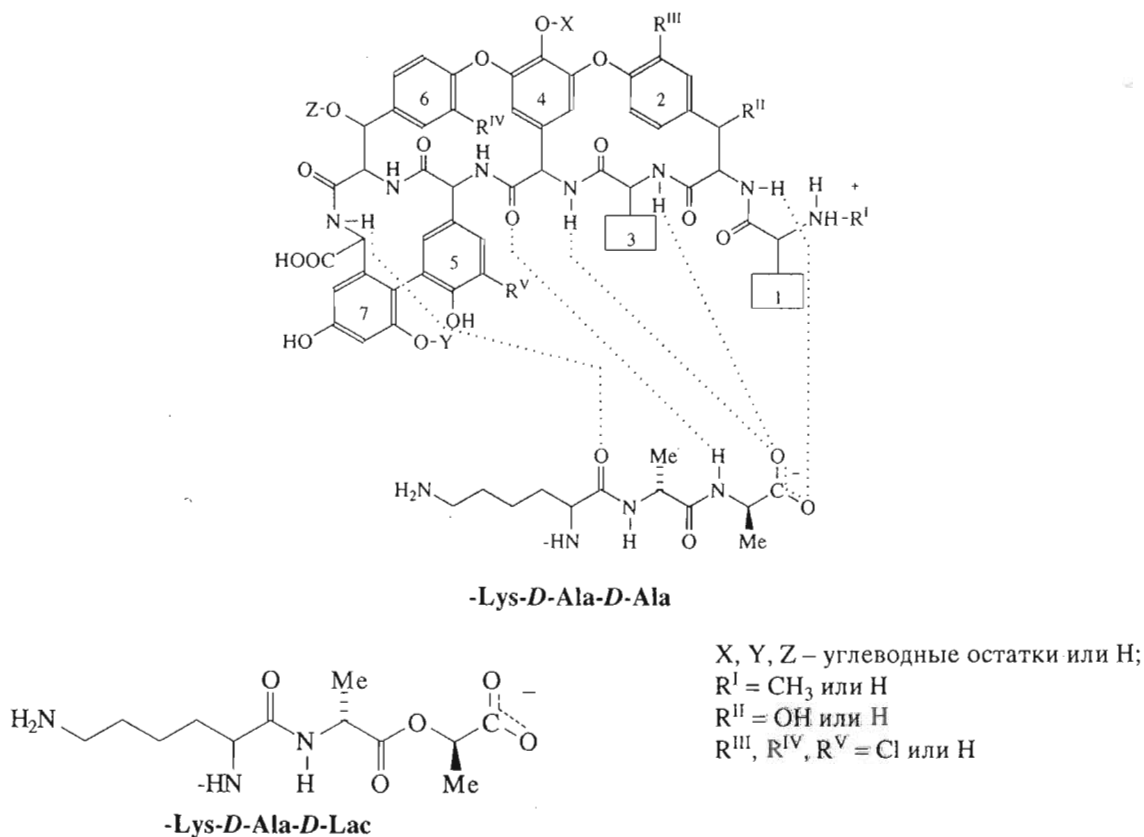


Рис. 2. Предполагаемая схема взаимодействия гликопептидных антибиотиков с С-концевым фрагментом *-Lys-D-Ala-D-Ala* пептидогликана клеточной стенки чувствительных бактерий. В качестве сравнения приведен фрагмент *-Lys-D-Ala-D-Lac*-резистентных (ванкомициноустойчивых) бактерий.

стве исходного соединения для этой цели был использован агликон эремомицина (I), который был получен из эремомицина кислотным гидролизом [5]. Дегидратацией по Эдману из агликона (I) был синтезирован гексапептид (II) (схема 1). В результате реакции гексапептида (II) с активированными эфирами N-защитенных *D*-аминокислот (*D*-Lys, *D*-His, *D*-Trp) и последующего снятия защитных групп были получены три не природных агликона (III)–(V) (схема 1). Изучение их антибактериальной активности *in vitro* показало, что замена *D*-MeLeu на *D*-Lys приводит лишь к ее незначительному снижению, в то время как замена на *D*-His или *D*-Trp вызывает полную потерю активности (табл. 1). Ни одно из полученных соединений не обладало активностью в отношении ванкомициноустойчивых энтерококков.

Таким образом, наиболее подходящими N-концевыми аминокислотами из изученных нами являются *D*-MeLeu и *D*-Lys. В качестве N-концевых они были предложены нами при одновременной замене первой и третьей аминокислот в агликоме тейкопланина (VI). Задача одновременной замены этих аминокислот оказалась бы невыпол-

нимой, если бы не открытая Малабарба и соавторами необычная реакция восстановительного расщепления пептидной связи между второй и третьей аминокислотами [6] (схема 2). Из полученного с помощью этой реакции пентапептида спирта в 11 стадий был синтезирован тетрапептид (VII) [7] (схема 2), который является ключевым соединением в синтезе новых не природных агликонов с различными аминокислотными остатками в положениях 1 и 3. Аминоацилизацией тетрапептида (VII) активированными эфирами N-защитенных *L*-аминокислот (Lys, Phe, His) и последующим деблокированием были получены три пентапептида (VIII)–(X) (схема 3).

Для следующей стадии, представляющей собой внутримолекулярную циклизацию (схема 3), было опробовано много вариантов с разными условиями и различными конденсирующими агентами. Наилучший результат был получен при использовании DCC и гидрата HOBT при комнатной температуре в смеси DMF– CH_2Cl_2 (схема 3). Конечные гексапептиды были очищены от продуктов полимеризации колоночной хроматографией на сефадексе LH-20. Гексапептиды (XI) и (XII),

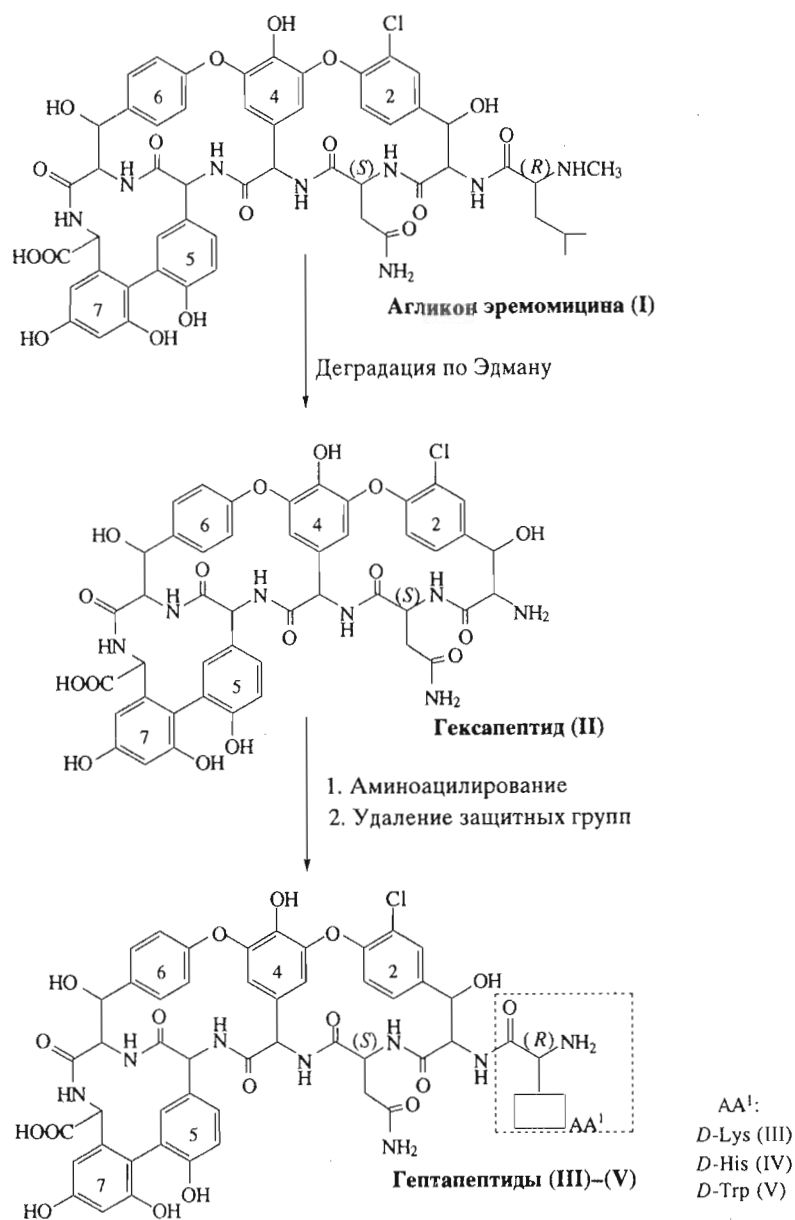


Схема 1.

содержащие соответственно остатки Lys и Phe, были получены с выходами 30%, в то время как гексапептид (XIII), содержащий остаток His, – с выходом только 2%, что не позволило использовать его в дальнейшем синтезе гептапептида.

Удаление Cbz-группы и аминоацилирование соединений (XI) и (XII) активированными эфирами N-защищенных D-аминокислот (D-Lys, D-Me-Leu) с последующим снятием защитных групп привели к трем новым не природным гептапептидам (XIV–XVI) (схема 3). Полученные соединения (XIV)–(XVI) высокоактивны в отношении грамположительных бактерий, и в частности коагулазотрицательных *S. haemolyticus* L 602 (табл. 2). Наиболее активен гептапептид (XIV), который на этом штамме примерно в 2–4 раза активнее, чем агликон тейкопланина (VI) или полученный ранее [8] метиловый эфир агликона тейкопланина (VI-Me). Однако в отношении грамотрицательных бактерий, например *E. coli*, соединение (XIV) оказалось неактивным, хотя ранее было показано, что производные агликона тейкопланина, имеющие основную природу, обладают определенной активностью в отношении этих бактерий [9]. Гептапептиды (XV) и (XVI) проявляют актив-

ложительных бактерий, и в частности коагулазотрицательных *S. haemolyticus* L 602 (табл. 2). Наиболее активен гептапептид (XIV), который на этом штамме примерно в 2–4 раза активнее, чем агликон тейкопланина (VI) или полученный ранее [8] метиловый эфир агликона тейкопланина (VI-Me). Однако в отношении грамотрицательных бактерий, например *E. coli*, соединение (XIV) оказалось неактивным, хотя ранее было показано, что производные агликона тейкопланина, имеющие основную природу, обладают определенной активностью в отношении этих бактерий [9]. Гептапептиды (XV) и (XVI) проявляют актив-

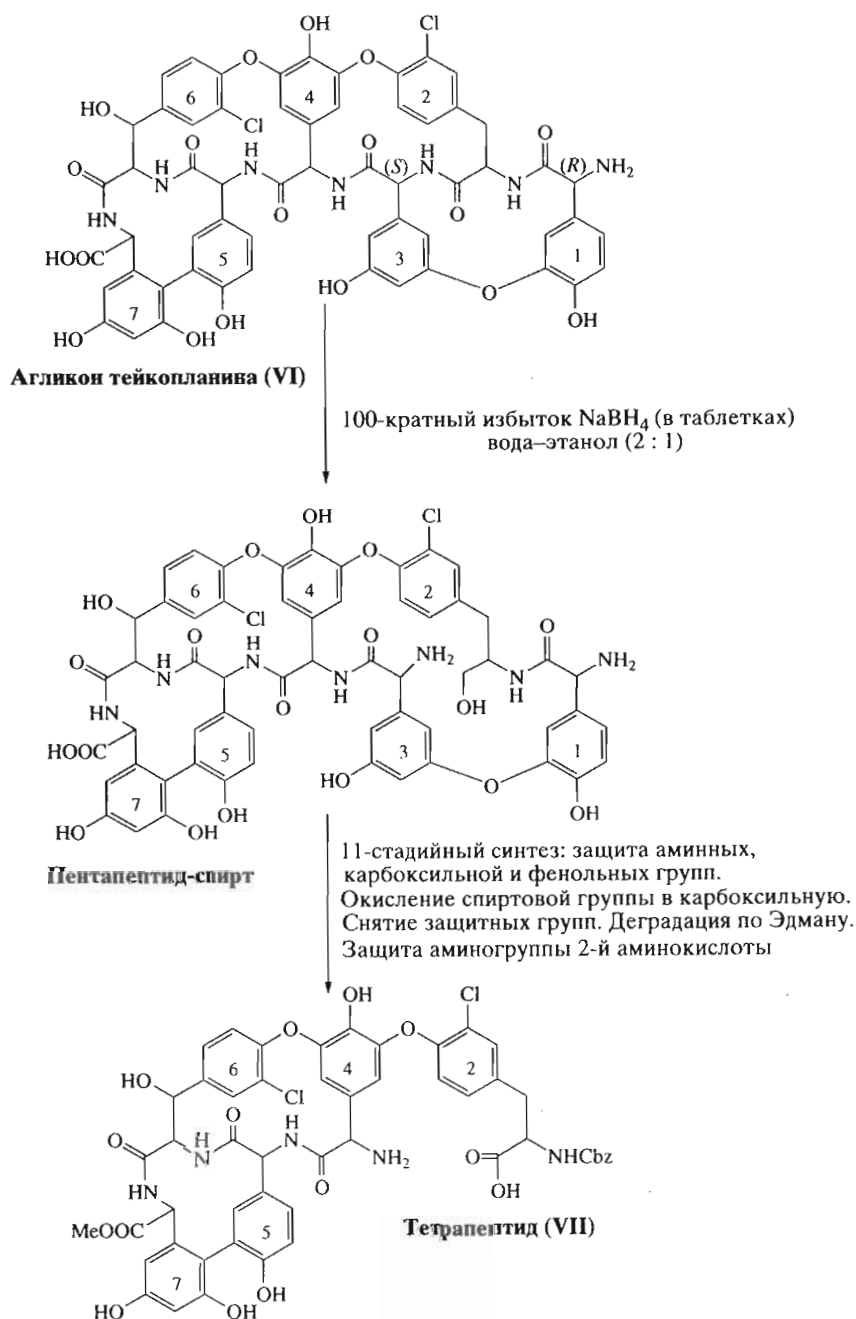


Схема 2.

ность в отношении ванкомициностойчивых энтерококков, однако недостаточную, для того чтобы рассматривать их как перспективные препараты для клиники.

В дополнение к вышеперечисленным соединениям для лучшего понимания связи структура-активность исходя из агликона эремозицина (I) были получены три его производных: метиловый

эфир (XVII), *D*-Lys-содержащий октапептид (XVIII) и диметиламинопропиламид (XIX) (схема 4). Метиловый эфир (XVII) и амид (XIX) проявляют сравнимую с исходным агликоном (I) антибактериальную активность *in vitro* (табл. 1) либо незначительно уступают ему по активности, в то время как октапептид (XVIII) в 4–8 раз менее активен. Полученные производные агликона эремозици-

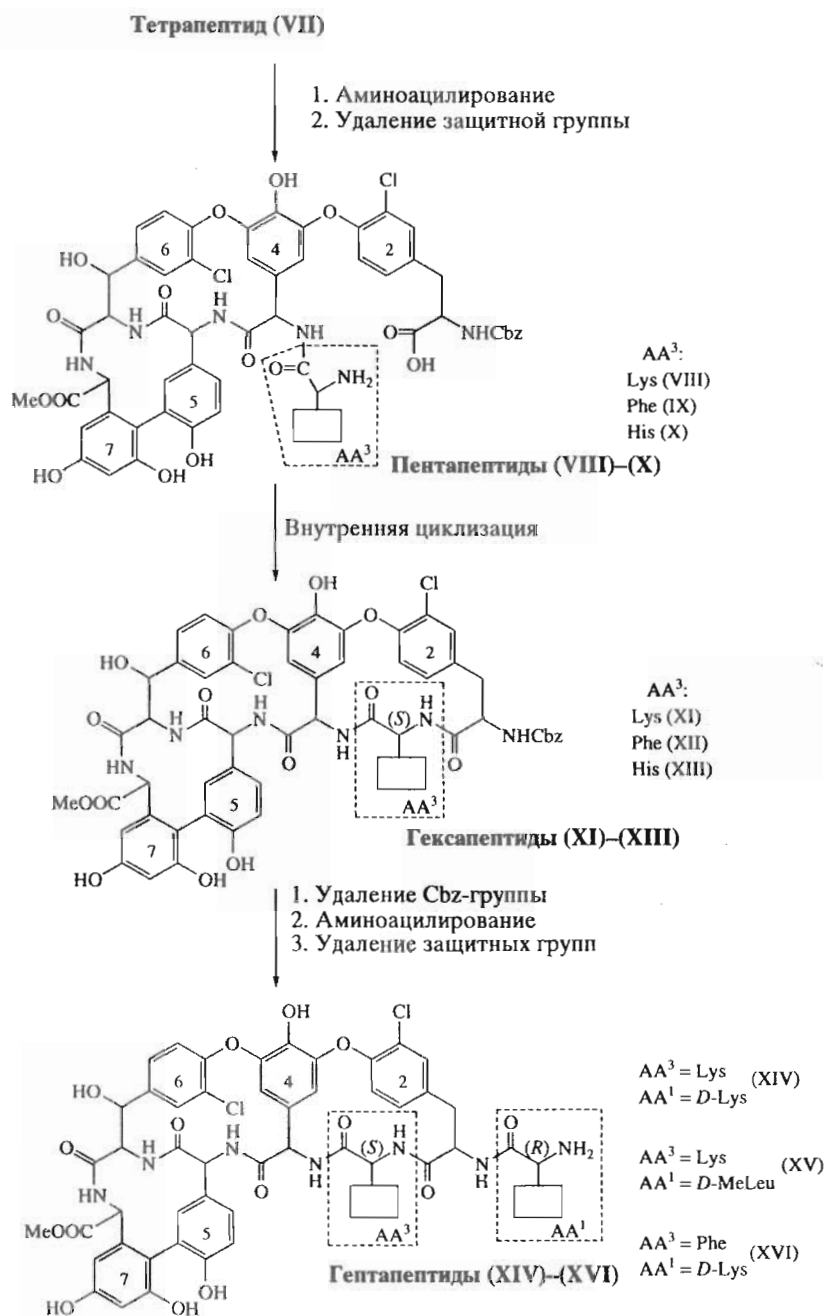


Схема 3.

на на один-два порядка менее активны, чем производные агликона тейкопланина, в том числе и ранее описанные [9] диметиламинопропиламид и *D*-Lys-содержащий октапептид агликона тейкопланина. Кроме того, известно [10], что агликон ванкомицина, отличающийся от агликона эремомицина только наличием дополнительного атома хлора в ароматическом ядре аминокислоты 6 (рис. 1), обладает активностью на порядок большей, чем активность агликона эремомицина. С другой стороны, монодеchlorированное по ароматическому ядру аминокислоты 2 производное агликона ванкомицина так же мало активно, как и агликон эремомицина.

Таким образом, сравнение активностей *in vitro* полученных нами и описанных в литературе агликонов и их производных показывает, что необходимое условие для проявления ими высокой антибактериальной активности – наличие двух атомов хлора в ароматических ядрах аминокислот 2 и 6. Другое важное условие – присутствие определенных аминокислот в положениях 1 и 3.

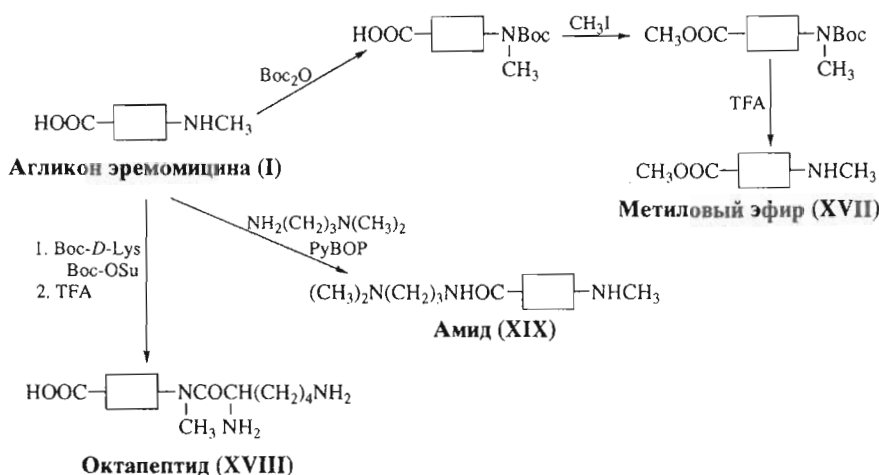


Схема 4.

Предложенный и осуществленный в данной работе подход к замещению аминокислот 1 и 3 позволяет варьировать аминокислотный состав агликонов и тем самым получать соединения, высокоактивные как в отношении чувствительных бактерий и бактерий с пониженной чувствительностью к гликопептидам, так и, возможно, в отношении резистентных энтерококков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали агликон эремомицина (I), полученный как описано ранее [5], и тетрапептид (VII), полученный 12-стадийным синтезом по методу, предложенному Малабарба и соавт. [6, 7]. Все аминокислоты и некоторые активированные эфиры аминокислот были коммерческими продуктами фирмы Sigma (США); DCC, HOBT, PyBOP, HOSu, PfpOH – Aldrich (США); N-метилморфолин, пиперидин, триэтиламин, TFA, фенилтиоизоцианат, CH_3I – Fluka (Швейцария); ацетонитрил, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 – Merck (Германия). Активированные эфиры *D*-Lys, *D*-His, *D*-Trp, His

и *D*-MeLeu были получены стандартными методами с использованием DCC [11].

Полноту прохождения реакций, процессы очистки и выделения, а также чистоту полученных производных контролировали с помощью ТСХ и ВЭЖХ.

ТСХ осуществляли на пластинках с силикагелем 60F₂₅₄ (Merck, Германия) в системах: этилацетат–*n*-пропанол–25% водный аммиак (1 : 1 : 1; 3 : 2 : 2; 2 : 1 : 1).

Аналитическую ВЭЖХ для соединений (IX), (XII), (XVI) осуществляли на хроматографе Varian 5500 (Швейцария) на колонке LiChroCART LiChrospher RP-8 (4 × 125 мм, размер частиц 5 мкм). Запись велась при 254 нм. Хроматографирование осуществлялось по программе А (табл. 3). Для остальных производных ВЭЖХ была сделана с использованием хроматографа Shimadzu LC-10 (Япония). Запись велась при 280 нм. Для программ Б и В была использована колонка Zorbax C-8 (4.6 × 250 мм, размер частиц 5 мкм), для Г, Д и Е – Partisil ODS (4.6 × 250 мм, размер частиц 10 мкм). Условия ВЭЖХ даны в табл. 3. Полупрепаративная ВЭЖХ осуществлена на колонке Zor-

Таблица 1. Минимальная подавляющая концентрация *in vitro* (мкг/мл) гептапептидов (III)–(V) и производных агликона эремомицина (XVII)–(XIX) в сравнении с эремомицином и его агликоном (I)

Микроорганизм	Эремомицин	(I)	(III)	(IV)	(V)	(XVII)	(XVIII)	(XIX)
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith L 819	0.13	8	8	64	64	16	16	16
<i>S. aureus</i> L 561	0.5	16	32	>128	128	16	128	32
<i>S. epidermidis</i> L 533	1	16	64	>128	>128	16	64	32
<i>S. haemolyticus</i> L 602	0.25	32	32	>128	>128	32	64	16
<i>Enterococcus faecalis</i> L 559	0.13	16	32	128	128	32	64	16
<i>E. faecium</i> L 568	0.13	32	32	128	>128	16	128	16
<i>Streptococcus pyogenes</i> L 49	0.13	8	8	64	>128	8	32	32

Таблица 2. Минимальная подавляющая концентрация *in vitro* (мкг/мл)* гептапептидов (XIV)–(XVI) в сравнении с агликоном тейкопланина (VI), его метиловым эфиром (VI-Me), тейкопланином и ванкомицином

Микроорганизм	Ванкомицин	Тейкопланин	(VI)	(VI-Me)	(XIV)	(XV)	(XVI)
<i>Staphylococcus aureus</i> Tour	0.25	0.12	0.12	0.12	0.06	0.25	0.12
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0.12	0.25	0.06	0.06	0.06	0.12	0.12
<i>S. haemolyticus</i> L 602	1	16	0.25	0.25	0.06	0.12	0.12
<i>Enterococcus faecalis</i> L 562**	>128	>128	>128	>128	>128	32	16
<i>Enterococcus faecium</i> L 569**	>128	>128	>128	>128	>128	16	64
<i>Streptococcus pyogenes</i> C 203	0.25	0.12	0.12	0.12	0.5	0.12	0.25
<i>E. coli</i> SKF 12140	>128	>128	64	16	>128	64	>128

* Концентрация антибиотика, при которой наблюдалось полное угнетение роста бактерий.

** Ванкомициноустойчивые энтерококки.

вах ODS (9.4 × 250 мм, размер частиц 10 мкм). Время выхода (R_f , мин) для всех полученных соединений представлено в описании методов.

Строение конечных и промежуточных соединений доказано с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии. Отнесение химических сдвигов сделано с использованием DQCOSY-экспериментов (корреляция химических сдвигов протонов с двухквантовой фильтрацией) и проведено на основе данных, полученных для агликонов эремицина [5] и тейкопланина [12]. Спектры ^1H -ЯМР записывали на спектрометрах Varian VXR-400 (Швейцария) и Bruker AM-500 (Германия) с использованием в качестве внутреннего стандарта сигналов растворителя (DMSO- d_6 , 2.5 м.д.).

Строение полученных соединений подтверждено также данными ESI (ионизация электрораспылением) масс-спектрометрии. Необходимо отметить, что очень часто получение масс-спектров гликопептидных антибиотиков и их производных такими методами, как FAB, MALD (лазерная десорбция), TOF-MS (времяпролетная спектрометрия), затруднено или невозможно. Поэтому для получения масс-спектров данных производных был выбран метод ESI-MS, который ранее успешно применялся для исследования некоторых производных гликопептидных антибиотиков [13]. Этот метод позволил получить точные значения молекулярных масс для всех синтезированных соединений. ESI-масс-спектры были получены на спектрометре API III PE-Sciex (Канада) в условиях, описанных ранее [14].

Гексапептид (II). К раствору 600 мг (0.6 ммоль) агликона (I) в 20 мл смеси пиридин–вода (1 : 1) добавляли 0.26 мл (2 ммоль) фенолтиоизоцианата. Перемешивали 3 ч при $\sim 20^\circ\text{C}$. Реакционную смесь упаривали при пониженном давлении досуха, добавляли 25 мл воды и доводили раствор до pH 2 с помощью 1 н. HCl. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, сушили в вакууме и затем выдерживали с 6 мл TFA 1 ч при

55°C . TFA упаривали до минимального объема, вещество осаждали эфиром, отфильтровывали и сушили в вакууме. После этого сухое вещество растворяли в 80 мл воды, доводили до pH 2 с помощью 1 н. HCl и раствор промывали *n*-бутанолом (3 × 20 мл). Воду упаривали досуха, вещество растворяли в 4 мл метанола и осаждали эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Выход 365 мг (83%) гексапептида (II). R_f 4.97 (Б); масс-спектр: m/z 982.3 [$M + \text{H}$]⁺ ($M_{\text{расч}}$ 981.2). $\text{C}_{46}\text{H}_{40}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{Cl}$.

Гептапептид (III). К раствору 145 мг (0.14 ммоль) гексапептида (II) в 3 мл смеси DMSO–DMF (1 : 1) добавляли 200 мг (0.45 ммоль) Вос-*D*-Lys(Вос)-OSu и 0.08 мл (0.8 ммоль) *N*-метилморфолина. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при $\sim 20^\circ\text{C}$,

Таблица 3. Системы и условия аналитической ВЭЖХ.

Программа	CH_3CN , %	Время хроматографирования, мин	Буферная система	Скорость потока, мл/мин
А	20 → 60	30	0.2% HCOONH_4	1.5
	60 → 75	5		
	75 → 75	5		
	75 → 20	5		
Б	15 → 36	20	0.2% HCOONH_4	1.5
В	20 → 50	20	0.2% HCOONH_4 , pH 3.8*	1.5
Г	2 → 24	20	0.01 М H_3PO_4 , pH 2.6	2.0
Д	30 → 75	30	0.2% HCOONH_4	2.0
Е	20 → 80	40	0.2% HCOONH_4	1.5

*Титрование до pH 3.8 осуществлялось с использованием HCOOH .

затем разводили 20 мл воды, доводили до pH 3 с помощью 1 н. HCl и экстрагировали *n*-бутанолом (2 × 7 мл). Органическую фазу промывали водой (2 × 5 мл) и бутанол упаривали в вакууме досуха. К осадку добавляли 3 мл TFA и выдерживали 30 мин при ~20°C. После этого добавляли 50 мл эфира, осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Полученное вещество (160 мг) растворяли в минимальном количестве буферной смеси 0.1 М CH₃COONH₄-DMSO-этанол (15 : 2 : 3) и наносили на колонку (2 × 20 см) с CM-32-целлюлозой (Whatman, Великобритания), предварительно уравновешенной этим буфером. Пропускали через колонку 600 мл данного буфера, а затем 600 мл смеси 0.2 М CH₃COONH₄-DMSO-этанол (15 : 2 : 3). Скорость потока 20 мл/ч. Отбирали фракции по 10 мл. Фракции, содержащие чистый гептапептид (III), объединяли и подкисляли до pH 4 с помощью 6 н. H₂SO₄, пропускали через ионообменную смолу СДВ-3 (аналог - дауэкс 50 × 2) (Олайне, Латвия) и элюировали вещество 0.25 н. NH₄OH. Раствор упаривали в вакууме досуха с добавлением *n*-бутанола. Сухое вещество растворяли в 2 мл метанола и добавляли 50 мл эфира. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Выход 65 мг (40%) гептапептида (III). *R*_f 5.85 (Б); масс-спектр: *m/z* 1110.3 [M + H]⁺ (*M*_{расч} 1109.3). C₅₂H₅₂N₉O₁₇Cl.

Гептапептид (IV). К раствору 87 мг (0.09 ммоль) гексапептида (II) в 1.5 мл смеси DMSO-DMF (1 : 1) добавляли 125 мг (0.28 ммоль) Вос-*D*-His(Вос)-OSu и 0.05 мл (0.5 ммоль) *N*-метилморфолина. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при ~20°C. Выделение и очистку продукта (IV) проводили так же, как гептапептида (III). Выход 15 мг (15%). *R*_f 8.88 (Б); масс-спектр: *m/z* 1119.3 [M + H]⁺ (*M*_{расч} 1118.3). C₅₂H₄₇N₁₀O₁₇Cl.

Гептапептид (V). К раствору 98 мг (0.1 ммоль) гексапептида (II) в 1.5 мл смеси DMSO-DMF (1 : 1) добавляли 70 мг (0.15 ммоль) Вос-*D*-Trp-OPfr и 0.05 мл (0.5 ммоль) *N*-метилморфолина. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при ~20°C. Выделение и очистку продукта (V) проводили так же, как гептапептида (III). Выход 40 мг (31%). *R*_f 10.00 (Б); масс-спектр: *m/z* 1168.3 [M + H]⁺ (*M*_{расч} 1167.3). C₅₇H₅₀N₉O₁₇Cl.

Пентапептид (VIII). К раствору 500 мг (0.43 ммоль) тетрапептида (VII) в 15 мл DMF добавляли 0.055 мл (0.5 ммоль) *N*-метилморфолина и 355 мг (0.56 ммоль) Fmoc-Lys(Вос)-OPfr. Реакционную смесь перемешивали 8 ч при ~20°C, добавляли 100 мл воды, подкисляли до pH 3 с помощью 1 н. HCl и экстрагировали *n*-бутанолом (2 × 30 мл). Бутанольную фазу промывали водой (2 × 20 мл) и упаривали до минимального объема. Добавляли 150 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в

вакууме. Получено 610 мг защищенного пентапептида. *R*_f 18.1 (Д); масс-спектр: *m/z* 1502.4 [M + H]⁺ (*M*_{расч} 1501.4). C₇₇H₇₃N₇O₂₁Cl₂.

600 мг (0.4 ммоль) защищенного пентапептида растворяли в 5 мл пиперидина и перемешивали 2 ч при ~20°C. После этого пиперидин упаривали в вакууме досуха, сухой остаток растворяли в 4 мл метанола и добавляли 150 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакууме и растворяли в 60 мл *n*-бутанола. Бутанол промывали подкисленной до pH 3 водой (3 × 20 мл), затем нейтральной водой (3 × 20 мл) и упаривали в вакууме до минимального объема. Добавляли 100 мл эфира и выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Получено 500 мг пентапептида (VIII). *R*_f 5.4 (Д); масс-спектр: *m/z* 1280.4 [M + H]⁺ (*M*_{расч} 1279.2). C₆₂H₆₃N₇O₁₉Cl₂.

Пентапептид (IX). К раствору 1000 мг (0.86 ммоль) тетрапептида (VII) в 20 мл DMF добавляли 0.13 мл (0.9 ммоль) триэтиламина и 340 мг (0.9 ммоль) Вос-Phe-OSu. Реакционную смесь перемешивали 3 ч при ~20°C, разбавляли 100 мл воды, подкисляли до pH 3 с помощью 1 н. HCl и экстрагировали *n*-бутанолом (2 × 50 мл). Бутанольную фазу промывали водой (2 × 20 мл) и упаривали до минимального объема. Добавляли 150 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Получено 900 мг защищенного пентапептида. *R*_f 14.9 (А); масс-спектр: *m/z* 1299.3 [M + H]⁺ (*M*_{расч} 1298.4). C₆₅H₆₀N₆O₁₉Cl₂.

220 мг защищенного пентапептида растворяли в 5 мл TFA, перемешивали 15 мин при ~20°C и добавляли 100 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Получено 200 мг пентапептида (IX). *R*_f 10.2 (А); масс-спектр: *m/z* 1199.3 [M + H]⁺ (*M*_{расч} 1198.4). C₆₀H₅₂N₆O₁₇Cl₂.

Пентапептид (X). 84 мг пентапептида (X) было получено из 125 мг (0.11 ммоль) тетрапептида (VII) и 112 мг (0.22 ммоль) Вос-His(Вос)-OPfr методом, описанным для синтеза пентапептида (IX). *R*_f 5.03 (Д); масс-спектр: *m/z* 1309.3 [M + H]⁺ (*M*_{расч} 1308.3). C₆₅H₅₈N₈O₁₈Cl₂.

Гексапептид (XI). К раствору 240 мг (0.19 ммоль) пентапептида (VIII) в 100 мл смеси DMF-CH₂Cl₂ (1 : 4) добавляли 0.022 мл (0.2 ммоль) *N*-метилморфолина, 135 мг (1 ммоль) НОВТ и 40 мг (0.2 ммоль) DCC. Реакционную смесь интенсивно перемешивали 18 ч, растворитель упаривали в вакууме и к остатку добавляли 10 мл смеси вода-ацетонитрил (1 : 1). Раствор выдерживали 3 ч при 5°C, выпавшую мочевину отфильтровывали. Фильтрат разводили 50 мл воды, подкисляли до pH 3 с помощью 1 н. HCl и экстрагировали *n*-бутанолом (2 × 30 мл). Бутанольную фазу промывали водой (2 × 20 мл) и упаривали до минимального

объема. Добавляли 100 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Полученное вещество (200 мг) растворяли в 3 мл метанола и наносили на колонку (3 × 70 см) с сефадексом LH-20 (Pharmacia, Швеция), предварительно уравновешенным метанолом. Через колонку пропускали 300 мл метанола. Скорость потока 2 мл/ч. Отбирали фракции по 1 мл. Фракции, содержащие чистый гексапептид (XI), объединяли, упаривали до минимального объема и добавляли 100 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Получали 75 мг (выход 30%) гексапептида (XI). R_f 11.0 (Д); масс-спектр: m/z 1262.4 $[M + H]^+$ ($M_{расч}$ 1261.4). $C_{62}H_{61}N_7O_{18}Cl_2$.

Гексапептид (XII). К раствору 400 мг (0.34 ммоль) пентапептида (IX) в 40 мл смеси DMF-CH₂Cl₂ (1 : 1) добавляли 0.037 мл (0.34 ммоль) N-метилморфолина, 47 мг (0.34 ммоль) HOBT и 80 мг (0.4 ммоль) DCC. Реакционную смесь интенсивно перемешивали 18 ч. Хлористый метилен упаривали в вакууме, добавляли 200 мл смеси вода-этилацетат (1 : 1) и подкисляли 1 н. HCl до pH 3. Выпавшую мочевину отфильтровывали. Органическую фазу фильтрата упаривали досуха. Полученное вещество растворяли в смеси вода-ацетонитрил-*n*-бутанол (1 : 1 : 2) и добавляли 5 г силанизованного силикагеля (Silica-gel 60, 0.06–0.2 мм; Merck, Германия). Упаривали растворитель и сухое вещество наносили в воде на колонку с 35 г того же носителя. Элюцию вели в течение 15 ч линейным градиентом ацетонитрила в воде (10 → 70%) со скоростью потока 100 мл/ч. Отбирали фракции по 10 мл. Фракции, содержащие гексапептид (XII), объединяли, упаривали до минимального объема и добавляли 100 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакууме и растворяли в 20 мл DMSO. Полученную суспензию фильтровали и фильтрат лиофилизировали. Получено 110 мг гексапептида (XII). R_f 22.6 (А); масс-спектр: m/z 1181.3 $[M + H]^+$ ($M_{расч}$ 1180.4). $C_{60}H_{50}N_6O_{16}Cl_2$.

Гексапептид (XIII). 2.5 мг гексапептида (XIII) было получено из 84 мг пентапептида (X) методом, описанным для синтеза гексапептида (XI). Дополнительно после LH-20 была проведена очистка полупрепаративной ВЭЖХ с использованием линейного градиента ацетонитрила в 0.2% HCOONH₄ (10 → 75%, 50 мин, скорость потока 1 мл/мин). R_f 12.65 (Д); масс-спектр: m/z 1191.3 $[M + H]^+$ ($M_{расч}$ 1190.4). $C_{65}H_{56}N_8O_{17}Cl_2$.

Гептапептид (XIV). Раствор 75 мг (0.06 ммоль) гексапептида (XI) в 10 мл смеси метанол-AcOH-DMF (8 : 1 : 1) гидрировали 2 ч в токе водорода над 5% Pd/C при нормальном давлении и при ~20°C. После этого катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали до минимального объема и добавляли 50 мл эфира. Выпавший осадок от-

фильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Получено 65 мг дез-Cbz-гексапептида (XI). R_f 10.3 (Д); масс-спектр: m/z 1128.3 $[M + H]^+$ ($M_{расч}$ 1127.4). $C_{54}H_{55}N_7O_{16}Cl_2$.

К раствору 65 мг (0.065 ммоль) дез-Cbz-гексапептида (XI) в 2 мл DMF добавляли 0.02 мл (0.15 ммоль) триэтиламина и 55 мг (0.125 ммоль) Boc-D-Lys(Boc)-OSu. Реакционную смесь перемешивали 18 ч при ~20°C, разбавляли 20 мл воды, подкисляли до pH 3 с помощью 1 н. HCl и экстрагировали *n*-бутанолом (2 × 5 мл). Бутанольную фракцию промывали водой (2 × 5 мл) и упаривали до минимального объема. Добавляли 30 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. К полученным 50 мг защищенного гептапептида (R_f 13.9 (Д)) добавляли 2 мл TFA и выдерживали 10 мин. Добавляли 30 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. После очистки с использованием полупрепаративной ВЭЖХ по программе Г получено 14 мг гептапептида (XIV) (общий выход из тетрапептида (VII) 5%). R_f 8.3 (Г); масс-спектр: m/z 1156.4 $[M + H]^+$ ($M_{расч}$ 1155.4). $C_{55}H_{59}N_9O_{15}Cl_2$.

Гептапептид (XV). К раствору 55 мг (0.05 ммоль) дез-Cbz-гексапептида (XI), полученного как описано для гептапептида (XIV), в 0.6 мл DMF добавляли 40 мг (0.16 ммоль) Boc-D-MeLeu-OBT. Реакционную смесь перемешивали 18 ч при ~20°C, добавляли 10 мл смеси вода-*n*-бутанол (1 : 1). Бутанол промывали подкисленной до pH 3 водой (2 × 3 мл), затем нейтральной водой (2 × 3 мл) и упаривали в вакууме до минимального объема. Добавляли 50 мл эфира и выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакууме и чистили на LH-20 как описано ранее. Дополнительно проводили очистку полупрепаративной ВЭЖХ по программе Е. Получено 8.5 мг защищенного гептапептида. R_f 30.6 (Е); масс-спектр: m/z 1355.5 $[M + H]^+$ ($M_{расч}$ 1354.4). $C_{66}H_{76}N_8O_{19}Cl_2$.

К полученным 8.5 мг защищенного гептапептида добавляли 0.3 мл TFA и выдерживали 15 мин, TFA упаривали в вакууме до минимального объема и добавляли 5 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Получено 6 мг гептапептида (XV) (общий выход из тетрапептида (VII) 2.4%). R_f 8.6 (Е); масс-спектр: m/z 1155.4 $[M + H]^+$ ($M_{расч}$ 1154.4). $C_{56}H_{60}N_8O_{15}Cl_2$.

Гептапептид (XVI). 290 мг дез-Cbz-гексапептида (XI) (R_f 17.5 (А)) и 270 мг защищенного гептапептида (XVI) (R_f 22.5 (А)) были получены последовательно из 800 мг гексапептида (XI) по методу, описанному для гептапептида (XIV). После удаления защитных групп с помощью TFA, как описано для гептапептида (XIV), очистка конечного продукта проводилась на колонке с 50 г си-

ланизованного силикагеля, как описано для гексапептида (XII). Получено 50 мг гептапептида (XVI) (общий выход из тетрапептида (VII) 8%). R_f 18.3 (A); масс-спектр: m/z 1175.3 [$M + H$]⁺ ($M_{расч}$ 1174.4). $C_{58}H_{56}N_8O_{15}Cl_2$.

Метилловый эфир агликона эремомицина (XVII). К раствору 110 мг (0.1 ммоль) агликона (I) в 10 мл смеси диоксан–вода (1 : 1) добавляли 8.4 мг (0.1 ммоль) $NaHCO_3$ и 21.6 мг (0.1 ммоль) Woc_2O . Реакционную смесь перемешивали 8 ч при $-20^\circ C$, разбавляли 30 мл воды, подкисляли до pH 3 с помощью 1 н. HCl и экстрагировали *n*-бутанолом (2 × 15 мл). Бутанольную фракцию промывали водой (2 × 5 мл) и упаривали до минимального объема. Добавляли 50 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Далее растворяли его в 4 мл DMF и добавляли 8.4 мг $NaHCO_3$ и 0.012 мл (0.2 ммоль) CF_3I . Перемешивали 6 ч при $-20^\circ C$, разбавляли 30 мл воды и экстрагировали *n*-бутанолом (2 × 15 мл). Бутанольную фракцию промывали водой (2 × 5 мл) и упаривали досуха. К осадку добавляли 3 мл TFA, выдерживали 30 мин при $-20^\circ C$ и добавляли 50 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Получено 90 мг (82%) метилового эфира (XVII). R_f 18.55 (B); масс-спектр: m/z 1123.5 [$M + H$]⁺ ($M_{расч}$ 1122.5). $C_{54}H_{55}N_8O_{17}Cl$.

D-Lys-содержащий октапептид агликона эремомицина (XVIII). К раствору 110 мг (0.1 ммоль) агликона (I) в 2.5 мл смеси DMSO–DMF (1 : 1) добавляли 88.8 мг (0.2 ммоль) $Woc-D-Lys(Woc)-OSu$ и 0.057 мл (0.5 ммоль) *N*-метилморфолина. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при $-20^\circ C$. Выделение и очистку октапептида (XVIII) проводили так же, как гептапептида (XVI). Выход 6 мг (5%). R_f 7.34 (B); масс-спектр: m/z 1237.4 [$M + H$]⁺ ($M_{расч}$ 1236.5). $C_{59}H_{65}N_{10}O_{18}Cl$.

Диметиламинопропиламид агликона эремомицина (XIX). К раствору 110 мг (0.1 ммоль) агликона (I) в 5 мл DMSO добавляли 0.013 мл (0.1 ммоль) диметиламинопропиламина и 52 мг (0.1 ммоль) $PyBOP$. Реакционную смесь перемешивали 3 ч при $-20^\circ C$ и разбавляли 100 мл воды. Подкисляли раствор до pH 2 с помощью 6 н. H_2SO_4 , пропускали через ионообменную смолу СДВ-3 и элюировали вещество 0.25 н. NH_4OH . Раствор упаривали в вакууме досуха с добавлением *n*-бутанола. Сухое вещество растворяли в 2 мл смеси вода–метанол (1 : 1), подкисляли раствор до pH 6 с помощью 6 н. H_2SO_4 и добавляли 100 мл ацетона. Осадок отфильтровывали, промывали ацетоном и сушили в вакууме. Получено 85 мг (выход 71%) амида (XIX). R_f 15.85 (B); масс-спектр: m/z 1193.4 [$M + H$]⁺ ($M_{расч}$ 1192.4). $C_{58}H_{65}N_{10}O_{16}Cl$.

Антибактериальную активность in vitro антибиотиков и их производных определяли методом серийных разведений на питательных средах: Todd-Hewitt для стрептококков и Oxoid Iso-Sensitest для остальных бактерий. Бактериальные суспензии наносили штампом-репликатором на поверхность среды. Величина микробной нагрузки составляла 10^5 микробных тел в 1 мл. Инкубацию проводили 24 ч при $37^\circ C$.

Авторы выражают благодарность доктору П. Феррари (Lepetit Research Center, Италия) за получение 1H -ЯМР-спектров некоторых производных, а также доктору Л. Коломбо (Lepetit Research Center, Италия) за изучение ESI-масс-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barna J.C.J., Williams D.H. // Annu. Rev. Microbiol. 1984. V. 38. P. 339–357.
2. Bugg T.D.H., Wright G.D., Dutka-Malen S., Arthur M., Courvalin P., Walsh M. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 10408–10415.
3. Barna J.C.J., Williams D.H., Strazzolini P., Malabarba A., Leung T.-W.C. // J. Antibiot. 1984. V. 37. P. 1204–1208.
4. Гаузе Г.Ф., Бражникова М.Г., Ломакина Н.Н., Гольдберг Л.Е., Лайко А.В., Федорова Г.Б., Бердникова Т.Ф. // Антибиотики и химиотерапия. 1989. Т. 34. С. 348–352.
5. Бердникова Т.Ф., Ломакина Н.Н., Олсуфьева Е.Н., Александрова Л.Г., Потапова Н.П., Розынов Б.В., Малкова И.В., Орлова Г.И. // Антибиотики и химиотерапия. 1991. Т. 36. С. 28–31.
6. Malabarba A., Ciabatti R., Kettenring J., Ferrari P., Vekey K., Bellasio E., Denaro M. // J. Org. Chem. 1996. V. 62. P. 2137–2150.
7. Malabarba A., Ciabatti R., Maggini M., Ferrari P., Colombo L., Denaro M. // J. Org. Chem. 1996. V. 61. P. 2151–2157.
8. Malabarba A., Trani A., Ferrari P., Pallarza R., Cavalleri B. // J. Antibiot. 1987. V. 40. P. 1572–1587.
9. Malabarba A., Ciabatti R., Scotti R., Goldstein B.P. // J. Antibiot. 1993. V. 46. P. 661–667.
10. Nagarajan R., Schabel A.A. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1988. P. 1306–1307.
11. Гершкович А.А., Кубицев В.К. Химический синтез пептидов. Киев: Наук. думка, 1992.
12. Malabarba A., Ferrari P., Gallo G.G., Kettenring J., Cavalleri B. // J. Antibiot. 1986. V. 39. P. 1430–1435.
13. Pavlov A.Y., Berdnikova T.F., Olsufyeva E.N., Miroshnikova O.V., Filippovsyanz S.T., Preobrazhenskaya M.N. // J. Antibiot. 1996. V. 49. P. 194–198.
14. Miroshnikova O.V., Berdnikova T.F., Olsufyeva E.N., Pavlov A.Y., Reznikova M.I., Preobrazhenskaya M.N., Ciabatti R., Malabarba A., Colombo L. // J. Antibiot. 1996. V. 49. P. 1157–1161.

Synthesis and Antibacterial Activity of Nonnatural Aglycones of Glycopeptide Antibiotics of the Vancomycin Group

A. Yu. Pavlov*, E. N. Olsufyeva*, O. V. Miroshnikova*, M. I. Reznikova*,
E. I. Lazhko*, A. Malabarba**, R. Ciabatti**, and M. N. Preobrazhenskaya*

* *Research Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Bol'shaya Pirogovskaya 11, Moscow, 119867 Russia*

** *Lepetit Research Center, Gerenzano (Varese), Italy*

Received December 16, 1996

Abstract—A new approach for the modification of the heptapeptide core of glycopeptide antibiotics was proposed based on the replacement of amino acid residues in positions 1 and 3 in teicoplanin aglycone and in position 1 in the eremomycin aglycone. Six novel nonnatural aglycones of the vancomycin type were obtained. Compounds derived from the teicoplanin aglycone exhibited *in vitro* activity against Gram-positive bacteria, and two of them were also active against the vancomycin-resistant enterococci.

Key words: glycopeptide antibiotics, vancomycin-resistant enterococci, eremomycin, teicoplanin.