



УДК 577.182.82'1

ИЗУЧЕНИЕ ДИМЕРИЗАЦИИ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ АНТИБИОТИКА ЭРЕМОМИЦИНА МЕТОДОМ ESI MS И ЕЕ РОЛЬ В ПРОЯВЛЕНИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2000 г. О. А. Миргородская, Е. Н. Олсуфьева^{*,#}, Д. Е. Колуме^{**}, Т. Д. Д. Йоргенсен^{**}, П. Роепсторфф^{**}, А. Ю. Павлов^{*}, О. В. Мирошникова^{*}, М. Н. Преображенская^{*}

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4;

^{*} НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН, 119867, Москва, Большая Пироговская ул., 11;

^{**} Университет, Оденсе, Дания

Поступила в редакцию 29.12.99 г. Принята к печати 25.03.2000 г.

Из данных, полученных методом масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией (ESI MS), определены константы димеризации природных гликопептидных антибиотиков ванкомицина, ристомицина, а также эремомицина и его девяти полусинтетических производных. Полученные значения констант димеризации для известных соединений близки таковым, определенным ранее методом ЯМР-спектроскопии. Показано, что антибактериальная активность всех изученных соединений по отношению к клиническим штаммам грамположительных микроорганизмов *in vitro* не зависит от степени димеризации изученных гликопептидов.

Ключевые слова: гликопептидные антибиотики, эремомицин, ванкомицин; масс-спектрометрия с электроспрей-ионизацией (ESI MS); димеризация; антибактериальная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотики-гликопептиды высокоактивны в отношении стафилококков, стрептококков, энтерококков и других грамположительных бактерий, устойчивых ко многим лекарственным средствам, включая β -лактамы и фторхинолоны последнего поколения. Механизм действия этих антибиотиков основан на ингибировании ими синтеза клеточной стенки бактерий путем их прочного связывания с *N*-ацил-*D*-Ala-*D*-Ala-фрагментом растущего пептидогликана [1]. Наиболее важное значение среди антибиотиков-гликопептидов имеют применяемые в медицине ванкомицин и тейкопланин. Антибиотик этой группы эремомицин [2] обладает в 4–5 раз более высокой по сравнению с перечисленными препаратами антибактериальной активностью, несмотря на то, что он в 23 раза слабее ванкомицина связывается с модельным лигандом Ac-Lys(Ac)-*D*-Ala-*D*-Ala [3]. Эремомицин проявляет способность образовывать прочные димеры, что было ранее продемонстрировано методами ЯМР-спектроскопии [4, 5], а также масс-спектрометрии [6]. Было показано, что димеры образуются за счет водородных свя-

зей между СО- и NH-группами пептидного остова антибиотика, которые не заняты взаимодействием с модельным лигандом (рис. 1) [5]. Кроме того, важную стабилизирующую роль в образовании димера играет водородная связь между аминогруппой эремозамина при аминокислоте “6” (см. R⁶) и карбонильной группой аминокислоты “2” второй молекулы антибиотика [5].

Стабильные димеры образует в водных растворах также хлорэремомицин, отличающийся от эремомицина наличием атома хлора в ароматическом кольце аминокислоты “6”, и его полусинтетическое производное LY 333328, в котором аминогруппа эремозамина дисахаридной цепи модифицирована *пара*-(*пара*-хлорфенил)бензильным остатком [7]. Высокая антибактериальная активность эремомицина, хлорэремомицина, LY 333328 и ряда других производных этих антибиотиков была объяснена кооперативным взаимодействием димеров на поверхности бактериальной клетки [5, 7]. Таким образом, предполагалось, что изучение димеризации антибиотиков-гликопептидов является важным моментом для понимания механизма их действия [8].

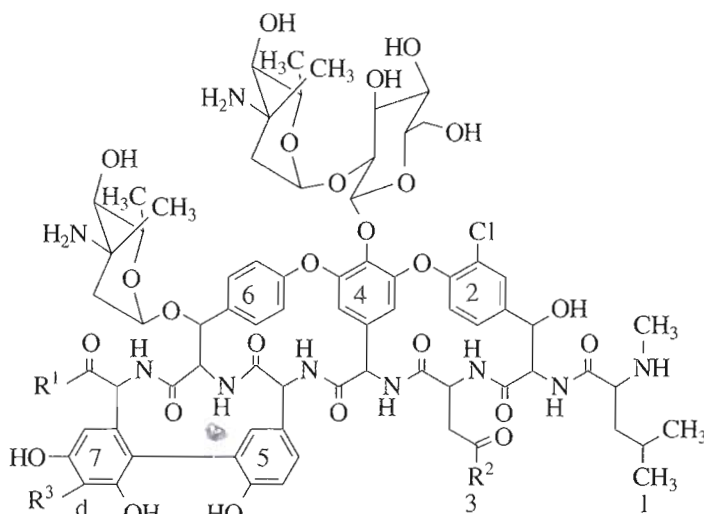
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе методом ESI MS изучена димеризация производных эремомицина различных типов в сравнении с эремомицином, ванкоми-

Сокращения: ESI MS – масс-спектрометрия с электроспрей-ионизацией; МПК – минимальная подавляющая концентрация.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 245-37-53; факс: (095) 245-02-95; e-mail: lcta@space.ru).

Соединение	R ¹	R ²	R ³
ЭМ	OH	NH ₂	H
(I)	NHCH ₂ Ph	»	»
(II)	NH(CH ₂) ₃ NMe ₂	»	»
(III)	NHC ₁₀ H ₂₁	»	»
(IV)	NHCHPh ₂	»	»
(V)	NHOMe	»	»
(VI)	OH	OH	»
(VII)	NHCH ₂ Ph	NHCH ₂ Ph	»
(VIII)	NH(CH ₂) ₃ NMe ₂	NH(CH ₂) ₃ NMe ₂	»
(IX)	OH	NH ₂	CH ₂ NHC ₁₀ H ₂₁



Эремомицин (ЭМ) и его производные (I)–(IX).

цином и ристоцетином. Рассчитанные из данных масс-спектрометрии (табл. 1) константы равновесной димеризации (k_{dim}) сопоставлены с антибактериальной активностью соединений *in vitro* (табл. 2).

Для получения спектров методом ESI MS использовались $\sim 10^{-4}$ – 10^{-5} М концентрации антибиотиков в 5 мМ NH₄OAc при pH 5.0–5.1*. В спектре ESI MS водного раствора эремомицина (рис. 2) присутствуют группы пиков квазимолекулярных ионов с m/z : 519.8 (4%) (группа пиков А) (рис. 2а), 779.2 (28%) (группа пиков Б) (рис. 2б), 1039.2 (100%) (группа пиков В) (рис. 2в) и 1558.2 (4%) (группа пиков Г). Так как разность между изотопными пиками на спектре с высоким разрешением (пики А¹, А², А³, А⁴, А⁵, А⁶, рис. 2а) составляет ~ 0.3 Да, можно полагать, что группа пиков А представляет собой типичную группу пиков квазимолекулярного иона с зарядом 3⁺, соответствующую

мономеру $[M + 3H]^{3+}$. Исходя из разницы в ~ 0.3 Да между ближайшими изотопными пиками (В¹, В², В³, В⁴, В⁵, В⁶, В⁷, рис. 2в), в группе пиков В с вдвое большим значением m/z 1039.2 (рис. 2), можно сделать вывод, что эта группа пиков соответствует иону димера с зарядом 3⁺ – $[2M + 3H]^{3+}$. Четная по заряду группа пиков Б с m/z 779.2 (рис. 2) соответствует смеси двух типов ионов. В группе пиков Б частичное наложение изотопных пиков, соответствующих квазимолекулярным ионам $[M + 2H]^{2+}$ и отличающихся на 0.5 Да (Б¹, Б³, Б⁵, Б⁷, рис. 2б), на изотопные пики меньшей интенсивности с разницей в 0.25 Да (Б¹, Б², Б³, Б⁴, Б⁵, Б⁶, Б⁷) однозначно доказывает присутствие четырехзарядного иона димера $[2M + 4H]^{4+}$. Аналогично группа пиков Г (рис. 2) соответствует смеси ионов $[M + H]^{1+}$ и $[2M + 2H]^{2+}$.

Исходя из полученных данных ESI MS был осуществлен расчет соотношения концентраций мономерных и димерных форм эремомицина, необходимых для определения равновесной константы димеризации k_{dim} . Полученные результа-

*В спектрах ESI MS эремомицина и его метоксиамида (V), полученных в аналогичных условиях, но без добавления буфера, присутствуют пики, соответствующие только мономерным формам: $[M + 3H]^{3+}$ (100%) и $[M + 2H]^{2+}$ ($\sim 15\%$).

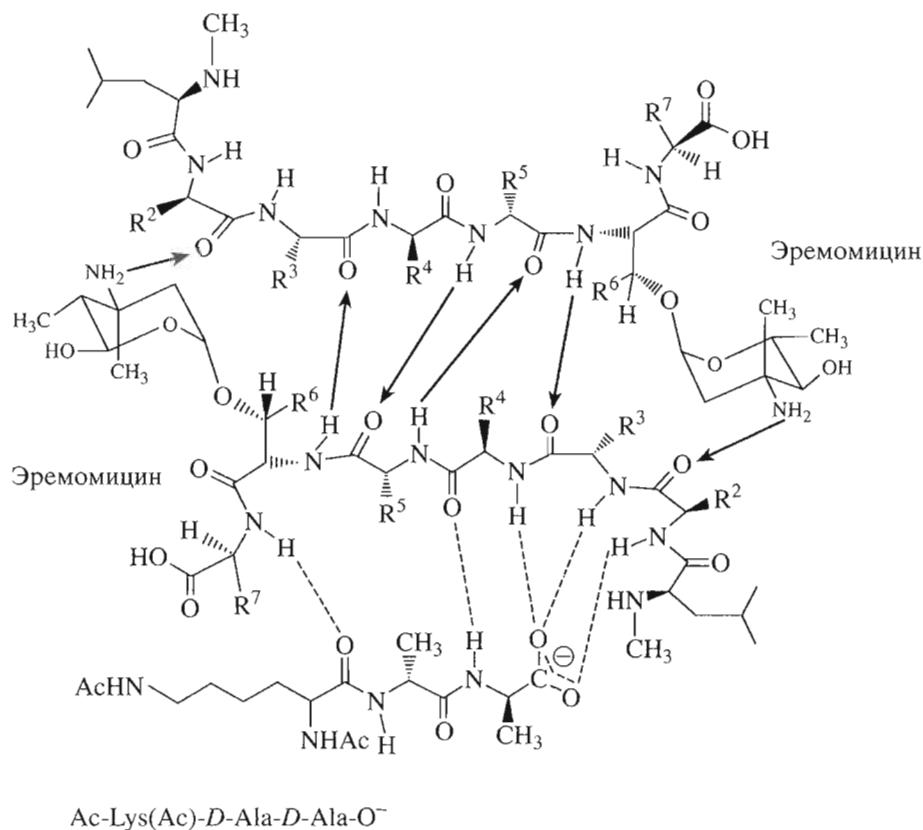


Рис. 1. Взаимодействие димера эремомицина с модельным лигандом Ac-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala (представлен только пептидный остов молекулы эремомицина, где R²-R⁷ – боковые радикалы). Пунктиром показаны водородные связи между антибиотиком и рецептором, а стрелками – между двумя молекулами антибиотика.

ты представлены в табл. 1 и 2 (см. также “Эксперимент. часть”). Как видно из этих таблиц, величины констант димеризации, определенные из данных масс-спектров, полученных на разных приборах и при разных концентрациях, очень близки и составляют $\sim 1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Величина k_{dim} для эремомицина практически совпадает со значением k_{dim} , $\sim 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, полученным методом ЯМР-спектроскопии [5]. Значения k_{dim} для ванкомицина и ристоцетина приблизительно на 3 порядка ниже и составляют 2300 и 1000 M^{-1} соответственно, что лишь втрое выше величин, полученных методом ЯМР-спектроскопии [5, 9]. Следовательно, метод ESI MS достаточно надежен для определения степени димеризации антибиотиков-гликопептидов.

С целью установления связи между способностью к димеризации и антибактериальной активностью были выбраны девять производных эремомицина различных типов: моноамиды–бензиламид (I) [6], 3-*N,N*-диметиламинопропиламид (II) [10], дециламид (III), дифенилметиламид (IV) и метоксиамид (V) (получены как в работе [10]); карбоксиэремомицин (VI) [10]; бисамиды карбоксиэремомицина – бисбензиламид (VII) и бис-

N,N-диметиламинопропиламид (VIII) [10]; а также 7*d*-дециламинометилэремомицин (основание Манниха) (IX) [11]. Полученные данные представлены в табл. 2.

Спектры ESI MS большинства представленных производных эремомицина (кроме (II) и (VIII)), так же как и спектр эремомицина, содержат заметное количество пиков, соответствующих квазимолекулярным ионам димеров (табл. 1), хотя соотношение четных и нечетных по заряду ионов колеблется для разных производных. Спектры моноамидов (III), (V) очень похожи на спектр эремомицина, так как в них содержатся преимущественно пики димерных ионов $[2M + 3H]^{3+}$ (100%), а также пики, соответствующие ионам $[M + 2H]^{2+}$, $[2M + 4H]^{4+}$ (60 и 62%). Содержание пиков, соответствующих мономерным ионам $[M + 3H]^{3+}$, также относительно невелико – 22 и 36%, пики с максимальным значением m/z $[M + H]^{1+}$ и $[2M + 2H]^{2+}$ практически отсутствуют (3 и 5%).

Для спектров соединений (I), (IV), (VI), (VII) и (IX) наблюдается иное, чем в случае эремомицина, распределение квазимолекулярных ионов. Для этих производных характерно более высокое содержание пиков с минимальными значениями

Таблица 1. Данные ESI MS-спектров гликопептидных антибиотиков и производных эремомицина (I)–(IX)

Соединение	Брутто-формула	Молекулярный вес: средний (минимальный изотопный)	Наблюдаемые группы пиков (интенсивность пика в % по отношению к интенсивности максимального пика)
Ванкомицин	C ₆₆ H ₇₅ Cl ₂ N ₉ O ₂₄	1449.28 (1447.43)	* 967.2 (28%)[2M + 3H] ³⁺ ; 725.6 (100%) [M + 2H] ²⁺
Ристоцетин	C ₉₅ H ₁₁₀ N ₈ O ₄₄	2067.95 (2066.66)	* 1379.7 (10%) [2M + 3H] ³⁺ ; 1035.0 (100%) [M + 2H] ²⁺
Эремомицин	C ₇₃ H ₈₉ ClN ₁₀ O ₂₆	1558.02 (1556.56)	** 1558.2 (4%)[M + H] ¹⁺ , [2M + 2H] ²⁺ ; 1039.2 (100%) [2M + 3H] ³⁺ ; 779.2 (28%) [M + 2H] ²⁺ , [2M + 4H] ⁴⁺ ; 519.8 (4%) [M + 3H] ³⁺ {c 4 × 10 ⁻⁵ M}
(I)	C ₈₀ H ₉₆ ClN ₁₁ O ₂₅	1647.15 (1645.63)	*** 1558.2 (<1%)[M + H] ¹⁺ , [2M + 2H] ²⁺ ; 1039.2 (100%)[2M + 3H] ³⁺ ; 779.2 (38%) [M + 2H] ²⁺ , [2M + 4H] ⁴⁺ ; 519.8 (18%) [M + 3H] ³⁺ {c 3 × 10 ⁻⁵ M}
(II)	C ₇₃ H ₈₉ ClN ₁₀ O ₂₆	1642.18 (1640.67)	*** 1647.8 (30%) [M + H] ¹⁺ , [2M + 2H] ²⁺ ; 1098.7 (100%) [2M + 3H] ³⁺ ; 824.5 (60%) [M + 2H] ²⁺ , [2M + 4H] ⁴⁺ ; 549.4 (90%) [M + 3H] ³⁺
(III)	C ₈₃ H ₁₁₀ ClN ₁₁ O ₂₅	1697.30 (1695.74)	** 1641.7 (<1%)[M + H] ¹⁺ ; 1095.5 (2%) [2M + 3H] ³⁺ ; 821.9 (100%) [M + 2H] ²⁺ ; 547.9 (46%) [M + 3H] ³⁺
(IV)	C ₈₆ H ₁₀₀ ClN ₁₁ O ₂₅	1723.25 (1721.66)	** 1697.4 (3%)[2M + 2H] ²⁺ ; 1131.9 (100%) [2M + 3H] ³⁺ ; 848.7 (60%) [M + 2H] ²⁺ , [2M + 4H] ⁴⁺ ; 566.5 (22%) [M + 3H] ³⁺
(V)	C ₇₄ H ₉₂ ClN ₁₁ O ₂₆	1587.06 (1585.59)	** 1721.6 (<1%)[M + H] ¹⁺ ; 1149.9 (22%) [2M + 3H] ³⁺ ; 862.4 (100%) [M + 2H] ²⁺ , [2M + 4H] ⁴⁺ ; 575.3 (85%) [M + 3H] ³⁺
(VI)	C ₇₃ H ₈₈ ClN ₉ O ₂₇	1559.00 (1557.54)	*** 1587.9 (5%)[M + H] ¹⁺ ; 1058.3 (100%) [2M + 3H] ³⁺ ; 794.0 (62%) [M + 2H] ²⁺ , [2M + 4H] ⁴⁺ ; 529.5 (36%) [M + 3H] ³⁺
(VII)	C ₈₇ H ₁₀₂ ClN ₁₁ O ₂₅	1737.28 (1735.67)	*** 1560.0 (27%) [M + H] ¹⁺ ; 1040.4 (100%) [2M + 3H] ³⁺ ; 780.3 (86%) [M + 2H] ²⁺ , [2M + 4H] ⁴⁺ ; 520.3 (90%) [M + 3H] ³⁺
(VIII)	C ₈₃ H ₁₁₂ ClN ₁₃ O ₂₅	1727.43 (1725.76)	*** 1737.7 (7%) [M + H] ¹⁺ ; 1158.9 (35%) [2M + 3H] ³⁺ ; 869.6 (100%) [M + 2H] ²⁺ , [2M + 4H] ⁴⁺ ; 579.4 (78%) [M + 3H] ³⁺
(IX)	C ₈₄ H ₁₁₂ ClN ₁₁ O ₂₆	1727.32 (1725.77)	*** 1152.5 (3.5%) [2M + 3H] ³⁺ ; 864.1 (87%) [M + 2H] ²⁺ ; 576.3 (100%) [M + 3H] ³⁺
			*** 1728.1 (27%) [M + H] ¹⁺ , [2M + 2H] ²⁺ ; 1152.0 (46%) [2M + 3H] ³⁺ ; 864.3 (100%) [M + 2H] ²⁺ , [2M + 4H] ⁴⁺ ; 576.3 (88%) [M + 3H] ³⁺

* Приведены уже пересчитанные из ESI MS-спектров (полученных на приборе Finnigan TSQ 700) полные интенсивности димерных и мономерных пиков; концентрации всех соединений даны в табл. 2.

** Спектр получен на приборе Micromass Q-TOF.

*** Спектр получен на приборе Finnigan TSQ 700.

Таблица 2. Степень димеризации и антибактериальная активность гликопептидных антибиотиков и производных эремомицина (I)–(IX)

Соединение	Данные, полученные из ESI MS-спектров				Антибактериальная активность (МПК, мкг/мл)	
	Исходная концентрация в 5 мМ AcONH ₄ , pH 5.0–5.1	Содержание, %		k_{dim} , M ⁻¹	стафилококк*	энтерококки** (VanA)
		димеров	мономеров			
Ванкомицин	8 × 10 ⁻⁵	22	78	~2300	0.5	>128
Ристоцетин	8 × 10 ⁻⁵	9	91	~1000	1	>128
Эремомицин	4 × 10 ⁻⁵	90	10	1.1 × 10 ⁶	0.13	>128
(I)	3 × 10 ⁻⁵	88	12	1.0 × 10 ⁶		
(II)	2 × 10 ⁻⁴	76	24	3.3 × 10 ⁴	0.13	>128
(III)	4 × 10 ⁻⁵	14	86	~1500	0.13	>128
(IV)	3.7 × 10 ⁻⁵	79	21	2.4 × 10 ⁵	0.13	2–8
(V)	4 × 10 ⁻⁵	67	33	9 × 10 ⁴	0.13	8–64
(VI)	4 × 10 ⁻⁵	76	24	1.6 × 10 ⁵	0.13	>128
(VII)	2 × 10 ⁻⁴	78	22	3.6 × 10 ⁴	4	>128
(VIII)	4 × 10 ⁻⁵	53	47	1.0 × 10 ⁵	0.5	8–64
(IX)	4 × 10 ⁻⁵	2	98	~300	0.5	32–128
	4 × 10 ⁻⁴	64	36	7.8 × 10 ⁴	0.13	8

* L 819 *St. aureus* (Smith); ** L 569 *E. faecium* (VanA) и L 560 *E. faecalis* (VanA).

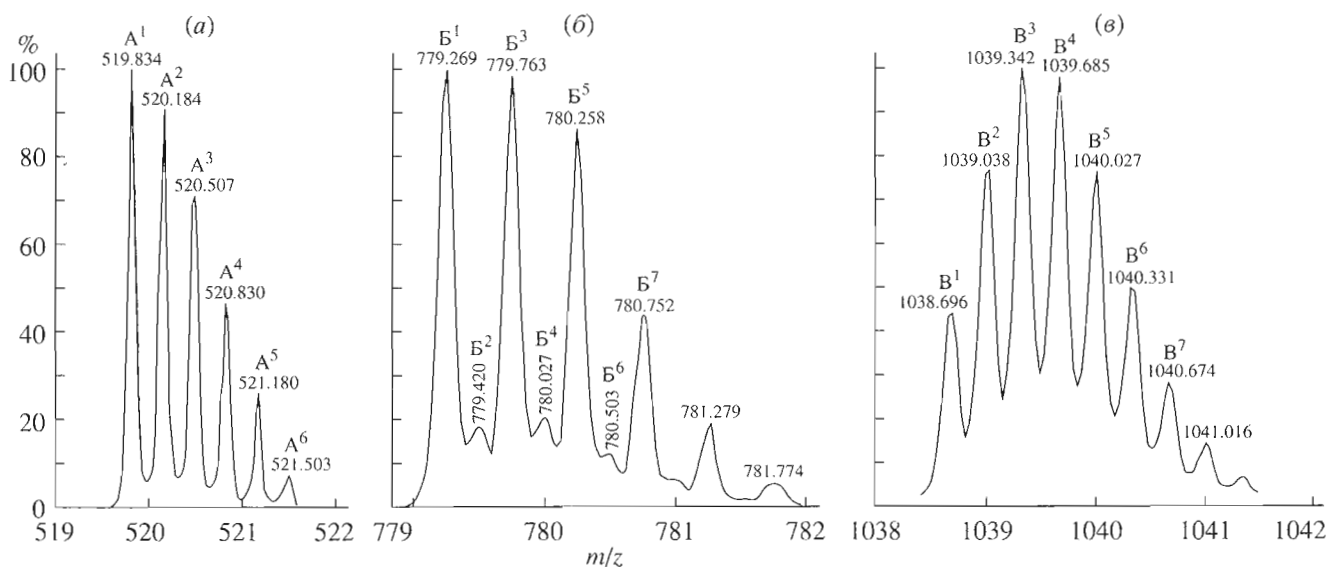
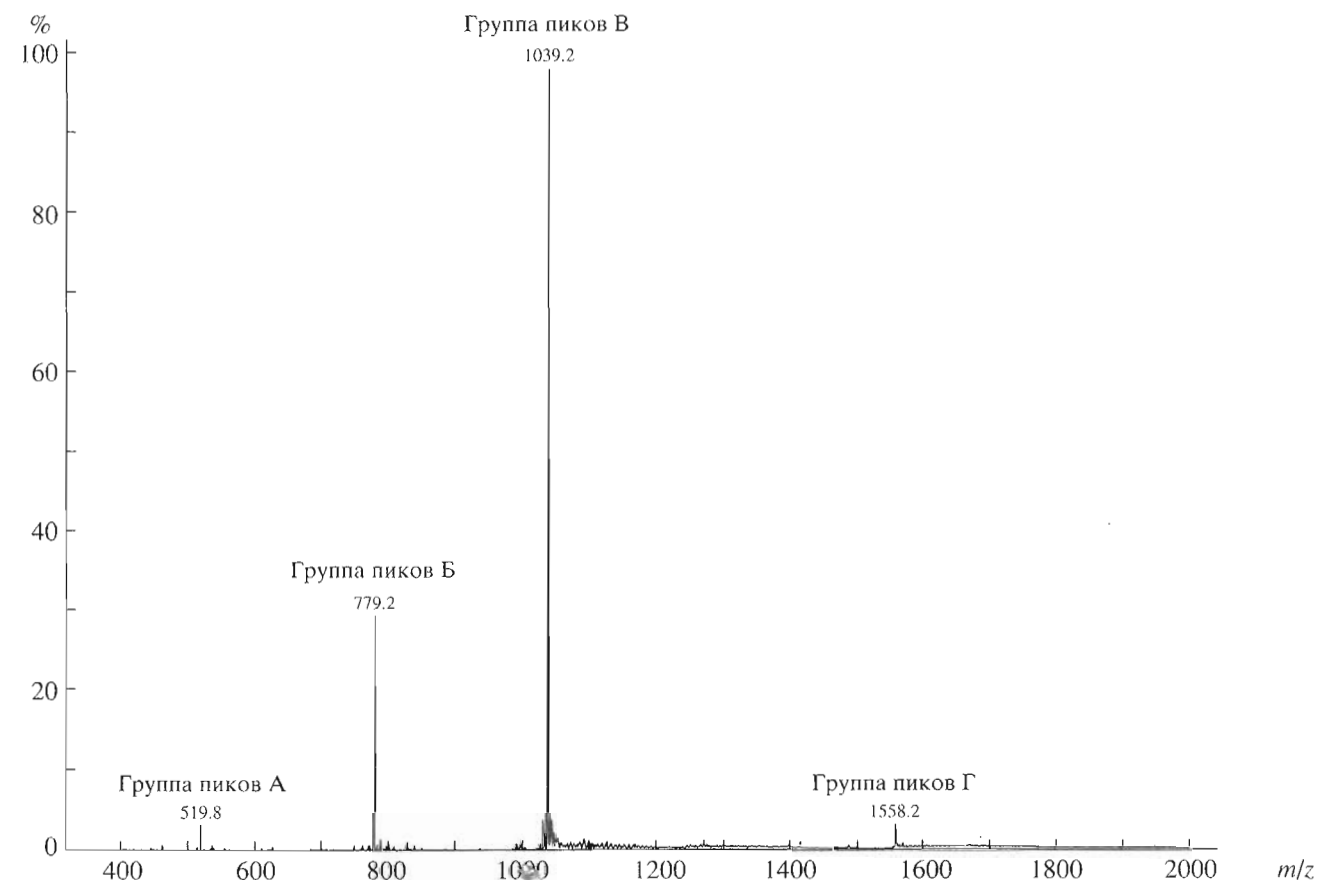


Рис. 2. Полный ESI MS-спектр антибиотика эремомидина (прибор Micromass Q-TOF) в концентрации 4×10^{-5} М в 5 мМ водном растворе AcONH_4 , pH 5.0 и фрагменты этого спектра с высоким разрешением: группы пиков А, Б, В (соответственно рис. 2а–2в).

m/z , соответствующих мономерным ионам $[M + 3H]^{3+}$ (78–90%). Содержание пиков с максимальным значением m/z , соответствующих ионам $[M + H]^{1+}$ и $[2M + 2H]^{2+}$, колеблется от 1 и 7% (для со-

единений (IV) и (VII)) до 22–30% (для соединений (I), (VI) и (IX)). Для этих соединений отмечено более равномерное распределение димерных форм по всем ионам с различными зарядами, причем

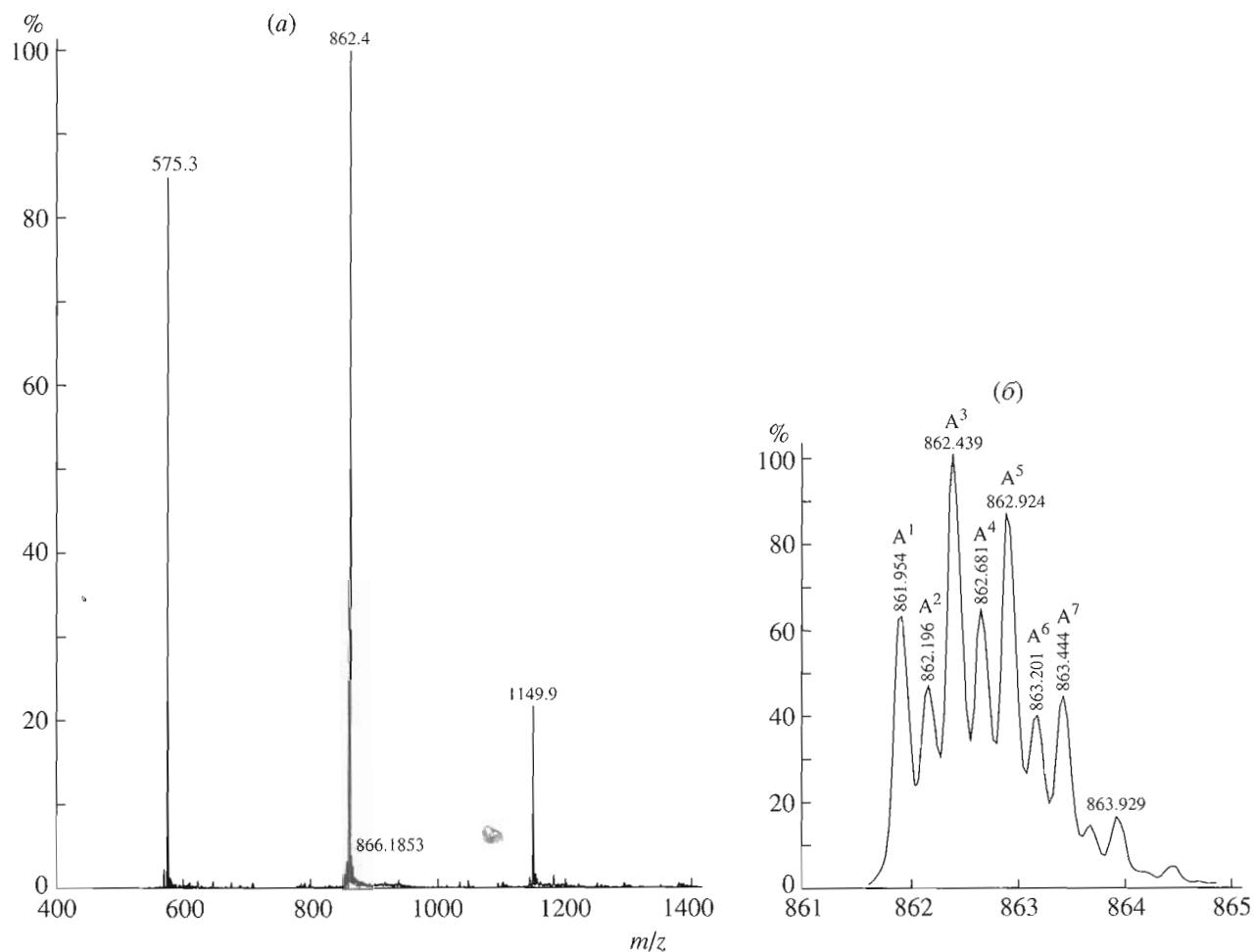


Рис. 3. Полный ESI MS-спектр дифенилметиламида эремомицина (IV) в концентрации 4×10^{-4} М в 5 мМ водном растворе AcONH_4 , pH 5, (a) и фрагмент этого спектра с высоким разрешением (группа пиков с m/z 862.4) (б).

содержание димерных ионов в смешанных пиках с четным зарядом может быть достаточно высоким. Так, например, в отличие от спектра эремомицина, в котором пик с четным зарядом и с m/z 779.2 представлен преимущественно мономерным ионом $[M + 2H]^{2+}$ (рис. 2б), в спектре дифенилметиламида эремомицина (IV) (рис. 3а) группа пиков с четным зарядом и с m/z 862.4 состоит преимущественно из пиков димерных ионов $[2M + 4H]^{4+}$ (A¹, A², A³, A⁴, A⁵, A⁶, A⁷, рис. 3б), на которые накладываются пики мономерных ионов $[M + 2H]^{2+}$ (A¹, A³, A⁵, A⁷).

Таким образом, все вышеперечисленные производные эремомицина в водных растворах существуют преимущественно (67–79%) в димерной форме (табл. 2). Рассчитанные для них значения констант димеризации k_{dim} располагаются в интервале от 3.3×10^4 до 2.4×10^5 М⁻¹. Это позволяет сделать вывод о том, что образующиеся димеры достаточно устойчивы, хотя и несколько уступают по прочности димеру родительского антибиотика ($k_{\text{dim}} \sim 1 \times 10^6$ М⁻¹).

Принципиально иной характер имеют спектры ESI MS соединений с малой степенью димеризации, т.е. ванкомицина, ристоцетина (рисунки спектров приведены в работе [12]), *N,N*-диметиламинопропиламида (II) и бис-*N,N*-диметиламинопропиламида карбоксиэремомицина (VIII) (табл. 1). Спектр соединения (II) (рис. 4) состоит из пиков, характерных для мономерных ионов с m/z : 821.9 (100%) $[M + 2H]^{2+}$ и 547.9 (46%) $[M + 3H]^{3+}$. Группа пиков с m/z 1095.5, соответствующая димерам $[2M + 4H]^{4+}$ и характерная для рассмотренных выше производных эремомицина, содержится в незначительном (3%) количестве. Эти соединения (II) и (VIII) так же, как ванкомицин и ристоцетин, существуют в водных растворах преимущественно в мономерной форме и имеют низкие значения $k_{\text{dim}} \sim 1500$ М⁻¹ (для соединения (II)) и ~ 300 М⁻¹ (для соединения (VIII)) (табл. 2).

Ранее нами изучена *in vitro* антибактериальная активность серии производных эремомицина (II)–(VII) [6, 10, 11] в отношении различных клинических штаммов грамположительных бакте-

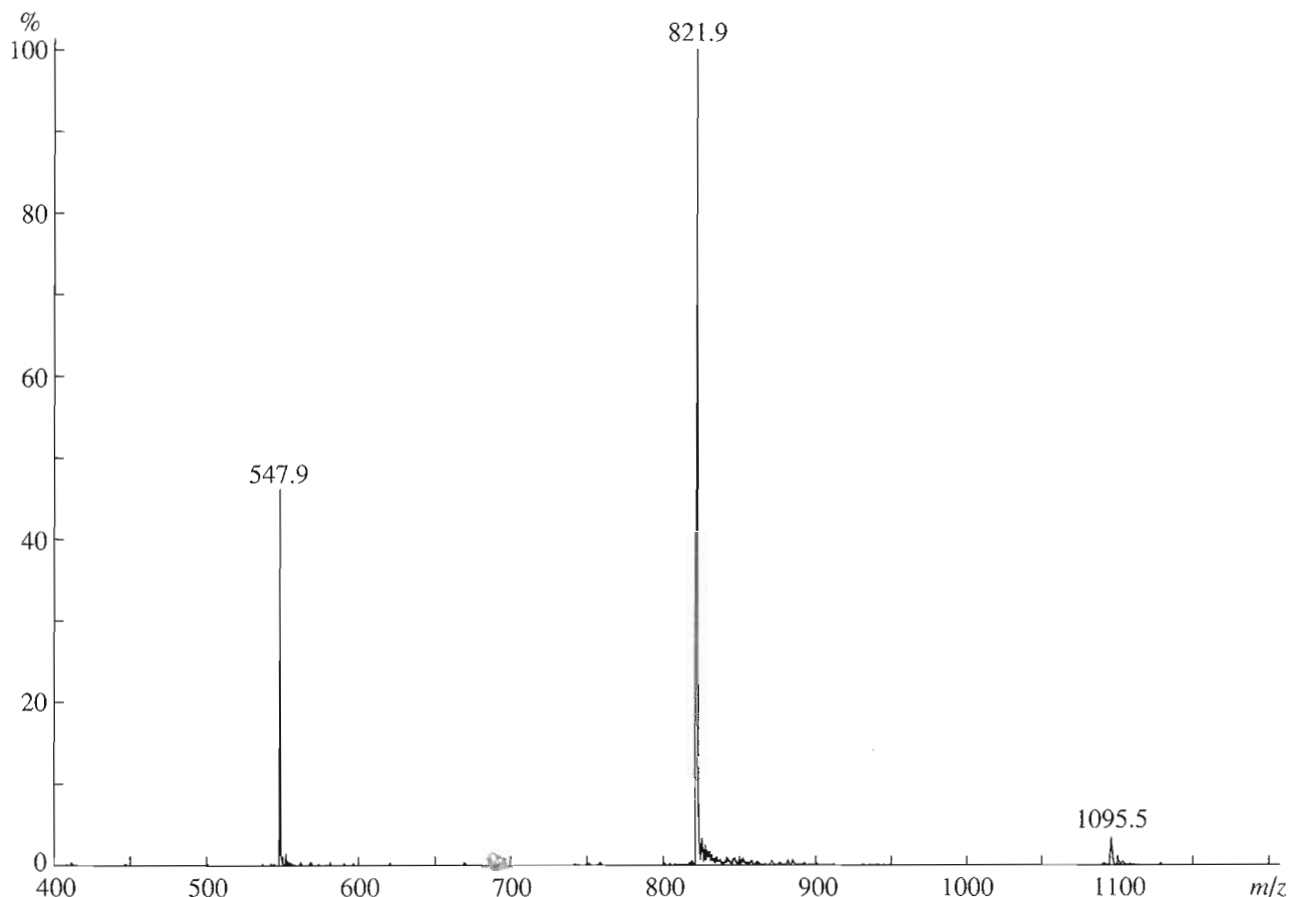


Рис. 4. ESI MS-спектр *N,N*-диметиламинопропиламида эремомицина (II) в концентрации 4×10^{-4} М в 5 мМ водном растворе AcONH_4 , pH 5.0.

рий – чувствительных к гликопептидным антибиотикам стафилококков, стрептококков и энтерококков, а также устойчивых к ванкомицину энтерококков (VanA). Поскольку значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) для чувствительных микроорганизмов хорошо согласуются между собой, в табл. 2 приведены данные лишь для наиболее типичного штамма – L 819 *Staphylococcus aureus* (Smith), а также для устойчивых штаммов VanA-энтерококков – L 569 *Enterococcus faecium* и L 560 *E. faecalis*. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Сопоставление констант димеризации и данных МПК для природных антибиотиков ванкомицина, ристоцетина и эремомицина казалось давало основание предполагать, что антибиотики, в большей степени склонные к димеризации, обладают большей антибактериальной активностью (табл. 2). Однако внимательное сопоставление констант димеризации и значений МПК для полученных производных эремомицина показывает, что прямая связь между этими параметрами отсутствует. Так, у высокоактивных в отношении штамма L 819 *St. aureus* (Smith) соединений (I),

(IV), (V), (IX) (МПК 0.13 мкг/мл), значения k_{dim} составляют 10^4 – 10^5 M^{-1} , но столь же высокое значение k_{dim} имеет значительно менее активное соединение (VI) (МПК 4 мкг/мл). И, наоборот, производные (II) и (VIII) с относительно низкими значениями k_{dim} (1500 и 300 M^{-1} соответственно) имеют достаточно выраженную активность в отношении штамма L 819 *St. aureus* (Smith) (МПК 0.13 и 0.5 мкг/мл, табл. 2).

В ряде работ [5, 7, 13] высказывается предположение, что способность гликопептидных антибиотиков к димеризации особенно важна для проявления антибактериальной активности в отношении штаммов энтерококков, резистентных к ванкомицину (VanA). Однако сопоставление констант димеризации природных антибиотиков и соединений (II)–(IX) (табл. 2) обнаруживает, что высокие значения k_{dim} наблюдаются у соединений как с большими, так и с малыми величинами МПК в отношении VanA-энтерококков.

Важным фактором, определяющим высокую антибактериальную активность в отношении резистентных патогенных микроорганизмов, является наличие в молекуле антибиотика липофиль-

ных фрагментов определенного типа. Резистентность энтерококков может быть преодолена путем введения в молекулу антибиотика объемных липофильных радикалов [7, 10, 11, 13]. Из табл. 2 видно, что производные, не имеющие такого рода заместителей, но образующие прочные димеры (эремомоцин, соединения (I), (II), (V), (VI)), не обладают активностью в отношении VanA-энтерококков. Вместе с тем заметную антибактериальную активность в отношении этих же штаммов проявляют только соединения (III), (IX), содержащие объемные липофильные алкильные радикалы или соединения арильного типа (IV), (VII), МПК которых составляют 2–8 и 8–64 мкг/мл, соответственно.

В настоящее время обсуждаются две гипотезы механизма антибактериального действия гликопептидных антибиотиков, активных в отношении устойчивых к ванкомицину энтерококков (VanA), у которых мишень, концевой фрагмент *D*-Ala-*D*-Ala, заменен на фрагмент *D*-Ala-*D*-Lactate, слабо связывающийся с антибиотиком [14]. Согласно первой гипотезе, слабое связывание таких производных гликопептидных антибиотиков с измененной мишенью может быть значительно усилено, если антибиотик образует димер, который дополнительно заякоривается на мембране [7, 15]. Такой комплекс ингибирует реакции транспептидации и трансгликозилирования, необходимые для построения клеточной стенки бактерий. Согласно второй гипотезе, первичное связывание с измененной мишенью необязательно, образование димеров антибиотика также не существенно, а решающим фактором служит взаимодействие липофильного антибиотика с мембраной бактериальной клетки, следствием чего является ингибирование реакции трансгликозилирования [16, 17].

Полученные нами результаты также свидетельствуют в пользу того, что способность гликопептидных антибиотиков и их производных к димеризации не является фактором, определяющим антибактериальную активность. Большее значение, особенно в отношении ванкомицинустойчивых бактерий, имеет липофильный характер и, по видимому, размер введенного заместителя, обеспечивающего связывание антибиотика с мембраной бактериальной клетки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гидрохлорид ванкомицина – коммерческий препарат (Sigma). Сульфаты ристоцетина и эремомоцина были получены на опытной установке НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН. Производные эремомоцина (II)–(IX) синтезированы и очищены как описано в работах [6, 10, 11].

Условия получения масс-спектров методом ESI MS. Масс-спектры получены в режиме анализа положительных ионов на приборе Micromass Q-TOF (Манчестер, Великобритания), оснащенном наноспреем, разрешение 5000; или на приборе Finnigan TSQ 700, триквадрупольном масс-спектрометре, оснащенном наноспреем Protana (Оденсе, Дания). Пробы подавались (распылялись) в масс-спектрометр с использованием одноразовых капилляров, покрытых тонким слоем серебра производства Protana (Оденсе, Дания) со скоростью 30 нл/мин. К капилляру было приложено напряжение 800–1200 В, ускоряющее напряжение 40 В, напряжение на микроканальных пластинах детектора 2800 В. Температура в источнике 40°C. В качестве газа использовался сухой азот.

Навески антибиотиков и производных эремомоцина растворяли в минимальном объеме воды и разводили 5 мМ водным раствором AcONH_4 (рН 5.0–5.1) до концентраций $\sim 10^{-4}$ – 10^{-5} М.

Расчет константы димеризации (k_{dim}) на примере эремомоцина. Для расчета константы димеризации был сделан ряд допущений: интенсивности всех пиков ионов эремомоцина как в мономерной, так и в димерной форме пропорциональны исходным концентрациям антибиотика, баланс по концентрации эремомоцина учитывает включение двух молекул антибиотика в димер, что приводит к уменьшению исходной молярной концентрации эремомоцина.

При оценке вклада каждого из типов (мономерных и димерных) ионов в суммарную интенсивность учитывались все изотопные пики каждого квазимолекулярного иона. При этом исходили из того, что в соответствии с брутто-формулой для каждого соединения известно распределение и положение максимального изотопного пика (компьютерная программа Interactive Chemical Information System (ICIS) (Finnigan Mat)). Таким образом истинная интенсивность каждой группы пиков может быть рассчитана из площади максимального отдельного изотопного пика каждой серии ионов: для мономерной формы эремомоцина, независимо от зарядности, площадь максимального моноизотопного пика составляет 30.2% суммы интенсивностей всех относящихся к данному типу ионов (например, см. рис. 2а – пик А¹ для $[M + 3H]^{3+}$). Для димерной формы площади максимальных третьего и четвертого пиков примерно равны и составляют 20.6 и 20.0% соответственно (например, см. рис. 2в – пики В³ и В⁴, для ионов $[2M + 3]^{3+}$). Для группы пиков, состоящей из димерной и мономерной форм с распределением ионов с четным зарядом $[M + 2H]^{2+}$ и $[2M + 4H]^{4+}$ (рис. 2б), а также аналогично для группы пиков Г ионов $[M + H]^{1+}$ и $[2M + 2H]^{2+}$, по площади максимальных мономерного и димерного изотопных

пиков учитывается содержание каждой группы пиков.

Пример расчета: по данным ESI MS эремомидина, приведенного на рис. 2 и 2а–2в (в табл. 1 отмечены **):

группа пиков А: m/z 519.8 (4%);

группа пиков Б: m/z 779.2 (28%);

группа пиков В: m/z 1039.2 (100%);

группа пиков Г: m/z 1558.2 (4%).

Истинную интенсивность каждой группы пиков $[M + H]^{1+}$ обозначаем как $M + 1$, аналогично обозначаем остальные пики.

Группа пиков А: $(M + 3) 4/0.302 = 13.2$;

группа пиков Б: $(M + 2) 28/0.302 = 92.7$ (расчет по пику Б¹ на рис. 2б),

$(2M + 4) 5.3/0.20 = 26.5$ (расчет по пику Б⁴ на рис. 2б);

группа пиков В: $(2M + 3) 100/0.206 = 485.4$ (расчет по пику В³ на рис. 2в);

группа пиков Г: $(M + 1) 2/0.302 = 6.6$,

$(2M + 2) 4/0.206 = 19.4$.

Суммарная интенсивность мономерных пиков I (М):

$$(M + 3) + (M + 2) + (M + 1) = \\ = 13.2 + 92.7 + 6.6 = 112.5.$$

Суммарная интенсивность димерных пиков I (2М):

$$(2M + 4) + (2M + 3) + (2M + 2) = \\ = 26.5 + 485.4 + 19.4 = 531.3.$$

Из баланса концентраций эремомидина: I (М) + I (2М) = 100%: $112.5 + 2 \times 531.3 = 1175.1$, тогда доля мономеров (М) составляет $(112.5 \times 100)/1175.1 = 9.57\%$, т.е. ~ 10%, а доля димеров (2М) составляет $(100 - 10)/2 = 45\%$.

От исходной концентрации 4×10^{-5} (в пересчете на основе эремомидина):

$$c$$
 (М) = $0.1 \times 4 \times 10^{-5}$ и c (2М) = $0.45 \times 4 \times 10^{-5}$,

$$k_{\text{dim}} = 2M/M^2 = 0.45 \times 4 \times 10^{-5} / (0.1 \times 4 \times 10^{-5})^2 = \\ = 1.125 \times 10^6 \text{ M}^{-1} = \sim 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}.$$

Аналогично, исходя из рассчитанного содержания мономерных и димерных пиков и соответствующих концентраций, были получены k_{dim} для всех остальных соединений (табл. 2).

Антибактериальная активность. МПК для всех бактерий были определены методом серийных разведений на питательной среде Oxford Iso-Sensitest (как в работе [11]). Бактериальные суспензии наносили штампом-репликатором на поверхность среды. Величина микронагрузки составляла 10^5 микробных тел в 1 мл, инкубацию проводили 24 ч при 37°C.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Lepetit Research Center (Италия) за изучение антибактериальной активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barna J.C.J., Williams D.H. // Ann. Rev. Microbiol. 1984. V. 38. P. 339–357.
2. Gause G.F., Brazhnikova M.G., Lomakina N.N., Berdnikova T.F., Fedorova G.B., Tokareva N.L., Borisova V.N., Batta G.Y. // J. Antibiot. 1989. V. 42. P. 1790–1799.
3. Good V.M., Gwinn M.N., Knowles D.J.C. // J. Antibiot. 1990. V. 43. P. 550–555.
4. Batta G., Sztaricskai F., Kover K.E., Rudel C., Berdnikova T.F. // J. Antibiot. 1991. V. 44. P. 1208–1221.
5. Mackey J.P., Gerhard U., Beauregard D.A., Westwell M.S., Searle M.S., Williams D.H. // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 4581–4590.
6. Pavlov A.Y., Berdnikova T.F., Olsufyeva E.N., Miroshnikova O.V., Filipposianz S.T., Preobrazhenskaya M.N., Sottani C., Colombo L., Goldstein B.P. // J. Antibiot. 1996. V. 49. P. 194–198.
7. Allen N.E., LeTourneau D.L., Hobbs J.N. // J. Antibiot. 1997. V. 50. P. 677–684.
8. Преображенская М.Н., Мирошникова О.В., Павлов А.Ю., Олсуфьева Е.Н. // Химия гетероцикл. соед. 1998. № 12. С. 1605–1631.
9. Gerhard U., Mackay J.P., Malpestone R.A., Williams D.H. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 232–237.
10. Olsufyeva E.N., Berdnikova T.F., Miroshnikova O.V., Reznikova M.I., Preobrazhenskaya M.N. // J. Antibiot. 1999. V. 52. P. 319–324.
11. Pavlov A.Y., Lazhko E.I., Preobrazhenskaya M.N. // J. Antibiot. 1996. V. 50. P. 509–513.
12. Lim H.-K., Hsieh Y.L., Ganem B., Heinion J. // J. Mass Spectrom. 1995. V. 30. P. 708–714.
13. Rodrigues M.J., Snyder N.J., Zweifel M.J., Wilkie S.C., Stack D.R., Cooper D.G., Nicas T.I., Mullen D.L., Butler T.F., Thompson R.C. // J. Antibiot. 1998. V. 51. P. 560–569.
14. Bugg T.D.H., Wright G.D., Dutka-Malen S., Arthur M., Courvalin P., Walsh C.T. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 10408–10415.
15. Sharman G.J., Williams D.H. // Chem. Commun. 1997. V. 1997. P. 723–724.
16. Ge M., Chen Z., Onishi H.R., Kohler J., Kerns R., Fukuzawa S., Thompson C., Khane D. // Science. 1999. V. 284. P. 507–511.
17. Goldman R.C., Baizman E.R., Longley C.B., Branstrom A.A. // FEB Micro Lett. 2000. V. 183. P. 209–214.

The Dimerization of Semisynthetic Eremomycin Derivatives Studied by the Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Its Effect on Their Antibacterial Activity

O. A. Mirgorodskaya*, E. N. Olsufyeva***, D. E. Kolome***, T. J. D. Joergensen***, P. Roepstorff***, A. Yu. Pavlov**, O. V. Miroshnikova**, and M. N. Preobrazhenskaya**

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

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

***Department of Molecular Biology, Odense University, Campusvej 55, DK-5230, Odense M, Denmark

The dimerization constants for glycopeptide antibiotics vancomycin, ristocetin, and eremomycin and nine semisynthetic eremomycin derivatives were determined by the electrospray ionization mass spectrometry; the constants for natural antibiotics turned out to be close to those previously determined by NMR. No correlation between these dimerization constants and antibacterial activities of all the compounds toward the clinical strains of Gram-positive bacteria was found.

Key words: antibacterial activity, dimerization, electrospray ionization mass spectrometry, eremomycin, ESI MS, glycopeptide antibiotics, vancomycin

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 245-3753; fax: +7 (095) 245-0295; e-mail: lcta@space.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 8. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.

Сдано в набор 26.04.2000 г.	Подписано к печати 03.07.2000 г.	Формат бумаги 60 × 88 ¹ / ₈		
Офсетная печать	Усл. печ. л. 10.0 + 1 вкл.	Усл. кр.-отт. 2.7 тыс.	Уч.-изд. л. 10.9	Бум. л. 5.0
	Тираж 256 экз.	Зак. 3791		

Свидетельство о регистрации № 0110214 от 08.02.93 г. в Министерстве печати и информации Российской Федерации
Учредители: Российская академия наук, Отделение физико-химической биологии,
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Адрес издателя: 117864, Москва, Профсоюзная ул., 90
Отпечатано в ППП "Типография "Наука", 121099, Москва, Шубинский пер., 6