



УДК 615.332.012

АНТИБИОТИК N',N'' -ДИБЕНЗИЛЭРЕМОМИЦИН С ВОССТАНОВЛЕННОЙ 1,2-ПЕПТИДНОЙ СВЯЗЬЮ

© 2002 г. С. С. Принцевская, Е. Н. Олсуфьева[#], Э. И. Лажко, М. Н. ПреображенскаяНИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН,
119867, Москва, ул. Большая Пироговская, 11

Поступила в редакцию 29.01.2001 г. Принята к печати 16.05.2001 г.

С целью выяснения роли пептидной связи между первой и второй аминокислотами гептапептидного скелета антибиотика эремомоцина в его взаимодействии с предшественниками пептидогликана клеточной стенки бактерий и проявлении антибактериальной активности осуществлен синтез производного эремомоцина, в котором аминогруппы обоих остатков эремозамина бензилированы, а N -метил- D -лейцин – первая аминокислота гептапептидного кода – замещен остатком (R)- или (S)-2-амино-4-метилпентана. Сравнение антибактериальной активности N',N'' -дибензилэремомоцина, дез-(N -метил- D -лейцил)- N',N'' -дибензилэремомоцина и его N -(2-амино-4-метилпентил)-производного (1,2-дезоксо- N',N'' -дибензилэремомоцина) показало, что отщепление первой аминокислоты или ее замещение на соответствующий аминоалкильный остаток приводит к снижению антибактериальной активности в отношении как чувствительных, так и резистентных к ванкомицину штаммов микроорганизмов.

Ключевые слова: гликопептидные антибиотики; ванкомицинустойчивые энтерококки; эремомоцин.

ВВЕДЕНИЕ

Гликопептидные антибиотики ванкомицин и тейкопланин нашли широкое применение в клинической практике как эффективные средства борьбы с инфекциями, вызванными грамположительными мультирезистентными бактериями, в том числе метициллинрезистентными штаммами *Staphylococcus aureus*. Механизм действия антибиотиков-гликопептидов заключается в образовании ими прочного комплекса с предшественником пептидогликана клеточной стенки бактерий – дихарид-пентапептидным фрагментом, имеющим C -концевую последовательность $-Lys-D-Ala-D-Ala$ [1]. Результатом этого является подавление биосинтеза пептидогликана, потеря механической прочности клеточной стенки и гибель бактериальной клетки вследствие лизиса. Главная роль в образовании комплекса принадлежит гептапептидному остову антибиотика, который образует с мишенью – лигандом пять водородных связей (рисунок). При этом боковые радикалы аминокислот формируют стенки “связывающего кармана”.

Резистентность некоторых клинических штаммов энтерококков к антибиотикам-гликопептидам вызывается модификацией мишени, заключающейся в замене ее C -концевого дипептидного фрагмента $-D-Ala-D-Ala$ на депсипептидный $-D-Ala-D-Lac$. Этот депсипептидный фрагмент спо-

собен вовлекаться в биосинтез в качестве субстрата реакции транспептидации, позволяя бактериям синтезировать нормальный пептидогликан. Однако эта замена делает невозможным образование одной из пяти водородных связей в комплексе антибиотик–мишень, что приводит к значительному ослаблению прочности комплекса. На модельных пептидах было показано, что константа связывания ванкомицина с модифицированной мишенью ($-Lys-D-Ala-D-Lac$) на три порядка ниже, чем с немодифицированной ($-Lys-D-Ala-D-Ala$) [2], что коррелирует со значениями МПК для чувствительных и резистентных к ванкомицину энтерококков [3].

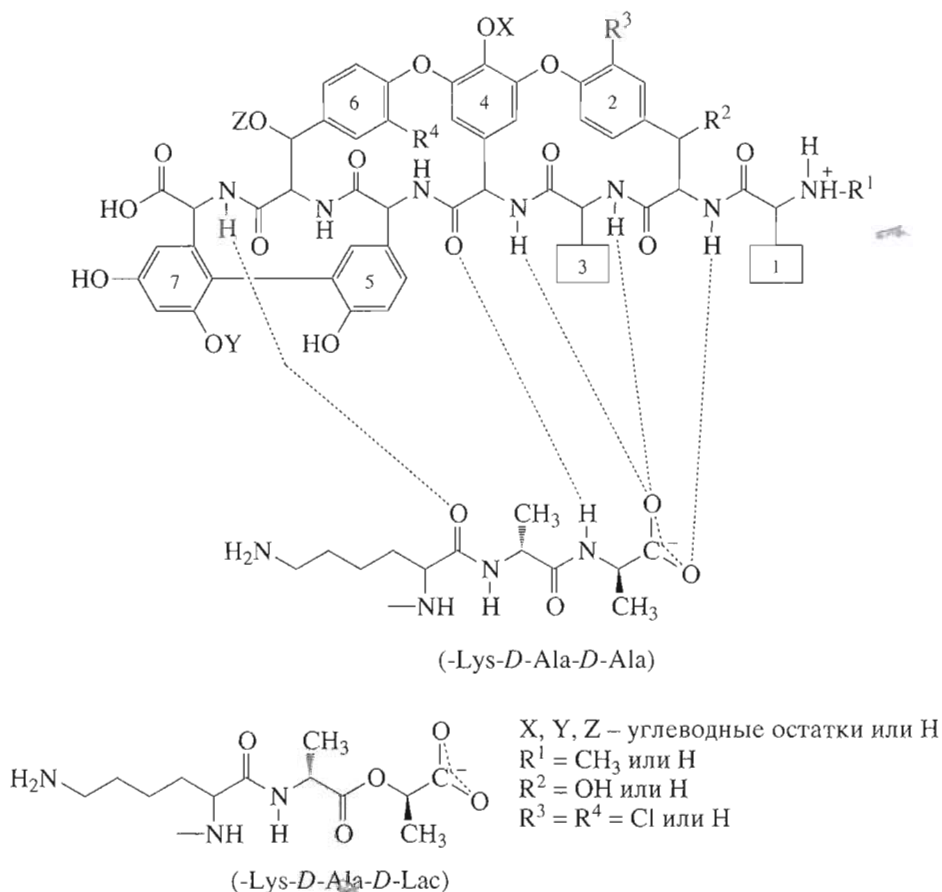
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как ранее было показано, NH -группы 2-й, 3-й и 4-й аминокислот образуют три водородные связи с C -концевым карбоксилат-анионом мишени [4]. Недавно для увеличения константы связывания антибиотик–мишень было осуществлено введение дополнительной амидной группировки по N -концевой аминогруппе агликона ванкомицина с тем, чтобы NH -группа этого амида образовывала бы 4-ю водородную связь с карбоксилат-анионом [5]. Однако такая модификация не привела к образованию дополнительной водородной связи с карбоксилат-анионом, а значение константы связывания было снижено примерно на порядок по сравнению с ванкомицином.

В представленной работе осуществлена замена пептидной связи между 1-й и 2-й аминокислотами отечественного гликопептидного антибиотика эремомоцина (**I**), принадлежащего к группе

Сокращения: Lac – остаток молочной кислоты; МПК – минимальная подавляющая концентрация.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 245-37-53; эл. почта: lcta@space.ru).



Связывание гликопептидных антибиотиков с C-концевым трипептидным участком дисахарид-пентапептидного фрагмента пептидогликана клеточной стенки. Внизу показан C-концевой участок депептидного фрагмента. Прямоугольниками обозначены боковые радикалы остатков аминокислот, пунктирными линиями – водородные связи.

ванкомицина, на аминоалкильную, чтобы выяснить, может ли такая замена повлиять на взаимодействие антибиотика с мишенью за счет возможного электростатического притяжения между положительно заряженной протонированной аминогруппой антибиотика и отрицательно заряженным карбоксилат-анионом мишени.

Эту модификацию планировалось осуществить отщеплением остатка 1-й аминокислоты деградацией по Эдману [6], восстановительным алкилированием N-концевой аминогруппы гексапептидного остова антибиотика N-Вос-лейциналем (2-N-Вос-амино-4-метилпентаналем) и последующим удалением Вос-защиты. На первом этапе была исследована возможность отщепления остатка 1-й аминокислоты эремомоцина деградацией по Эдману с сохранением остатков аминокислот. Были подобраны условия селективного протекания реакции эремомоцина (I) с фенилизотиоцианатом по N-концевой аминогруппе антибиотика, и в результате был получен N-фениламинотиокарбонилэремомоцин (II), циклизация которого с отщеплением концевой аминокислоты привела к образованию дез-(N-метил-D-лейцил)эремомоцина (III) (схема 1).

Однако попытка избирательного восстановительного алкилирования освободившейся N-концевой аминогруппы гексапептидного остова (III) оказалась неудачной, поскольку реакция протекала не-селективно с образованием сложной смеси N-алкилпроизводных, разделить которую не удалось.

Было принято решение перейти к N',N''-дибензилпроизводным эремомоцина, так как ранее было установлено, что такая модификация существенно не влияет на активность антибиотика [7]. Для защиты N-концевой аминогруппы антибиотика использовалась Вос-группа, возможность селективного введения которой была установлена ранее [8] (схема 2). Аминогруппы двух остатков аминокислот в составе N-Вос-эремомоцина (IV) были алкилированы бензальдегидом в присутствии NaCNBH₃. В результате был получен N-Вос-N',N''-дибензилэремомоцин (V), а после удаления Вос-защиты – N',N''-дибензилэремомоцин (VI). Производное (VI) было введено в реакцию с фенилизотиоцианатом и после стадии циклизации N-фениламинотиокарбонил-N',N''-дибензилэремомоцина (VII) получен дез-(N-метил-D-лейцил)-N',N''-дибензилэремомоцин (VIII). Затем реакцией

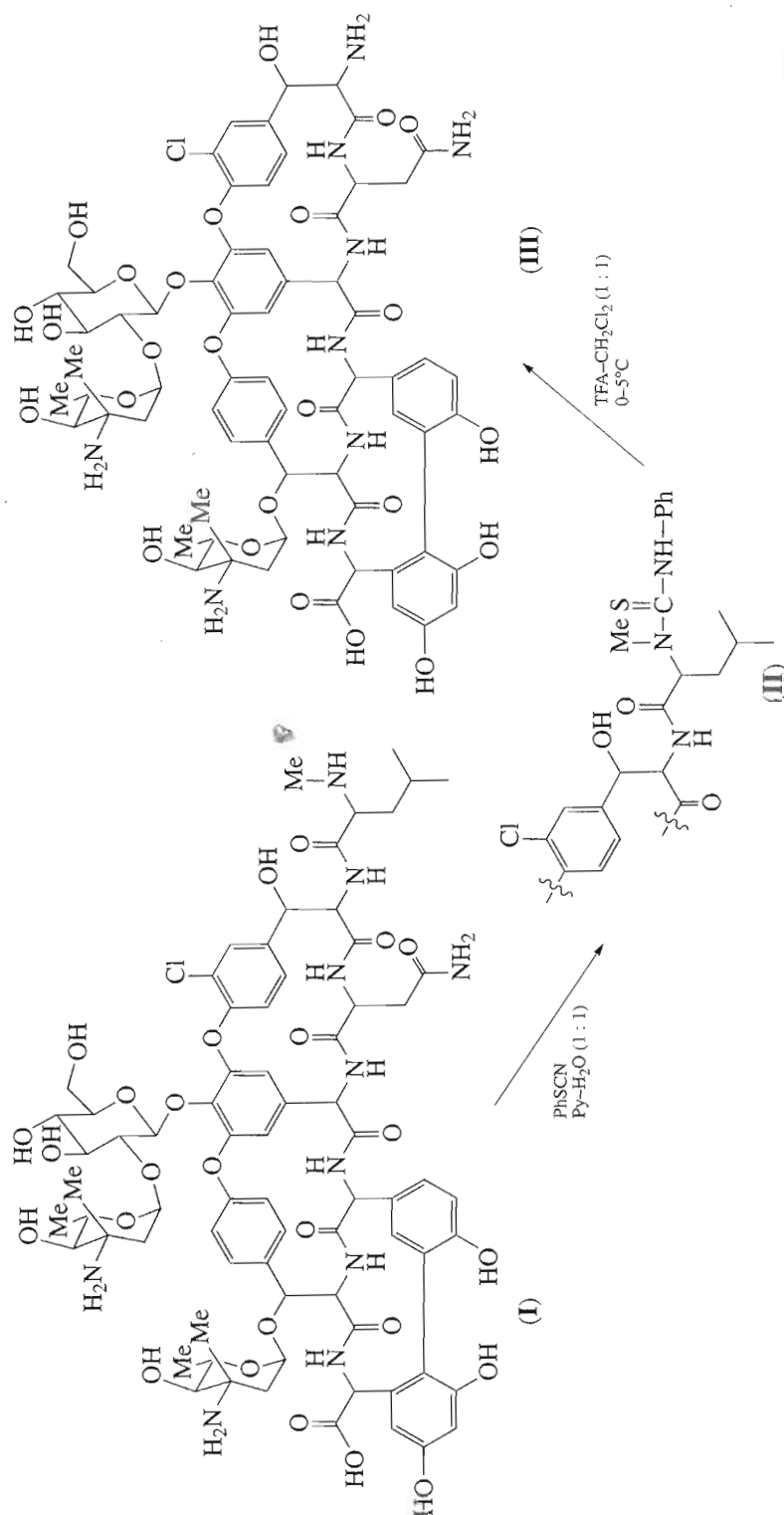


Схема 1. Получение дез-(*N*-метил-*D*-лейтил)эремомицина (III) деградацией по Эдману.

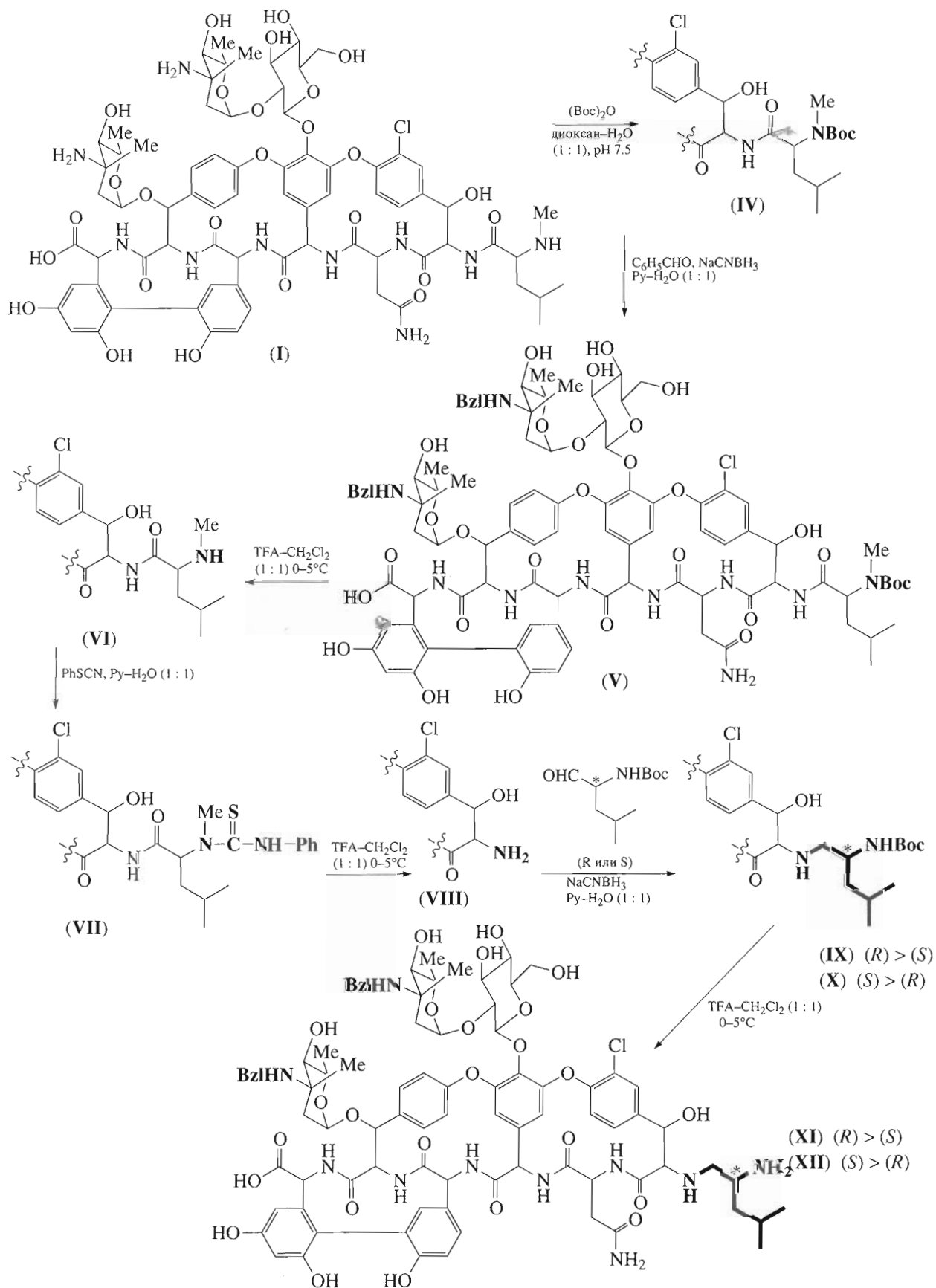


Схема 2. Получение производных эритромицина. Выделены фрагменты молекулы, подвергаемые модификации.

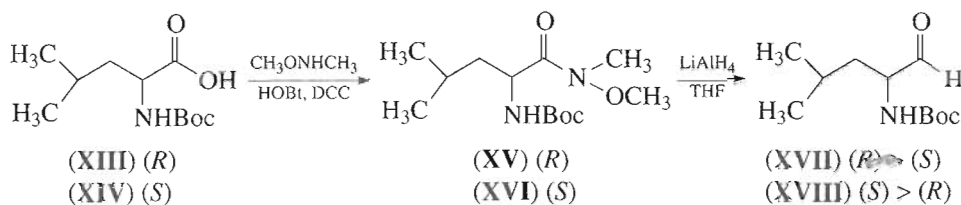


Схема 3. Получение (R)-2-N-Вос-аминопентаналь (XVII) и (S)-2-N-Вос-аминопентаналь (XVIII).

восстановительного алкилирования (R)-2-N-Вос-амино-4-метилпентаналем в присутствии NaCNBH_3 соединение (VIII) было превращено в N-[(R)-2-Вос-амино-4-метилпентил]-дез-(N-метил-D-лейцил)-N',N''-дибензилэремомицин (IX), который можно рассматривать как N-Вос-дез-(N-метил)-N',N''-дибензил-1,2-дезоксэремомицин.

(R)-2-N-Вос-Амино-4-метилпентаналь (D-Вос-лейциналь) (XVII) был предварительно получен восстановлением метоксиметиламида N-Вос-D-лейцина (амида Вайнреба) (XV) алюмогидридом лития (схема 3) [9]. После удаления Вос-защиты в соединении (IX) был получен N-[(R)-2-амино-4-метилпентил]-дез-(N-метил-D-лейцил)-N',N''-дибензилэремомицин (XI), который можно рассматривать как (R)-производное дез-(N-метил)-N',N''-дибензил-1,2-дезоксэремомицина. Ранее на примере ванкомицина показано, что отсутствие N-концевой метильной группы не снижает антибактериальную активность антибиотика [10].

Однако нельзя исключить возможности по крайней мере частичной рацемизации (R)-2-N-Вос-амино-4-метилпентаналь (XVII) при его получении [11] и, особенно, в реакции восстановительного алкилирования соединения (VIII). Сделать вывод об оптической чистоте соединения (XI) по данным

^1H -ЯМР трудно, поскольку в спектре ^1H -ЯМР этого соединения сигналы протонов уширены. В связи с этим, исходя из соединения (VIII) и (S)-2-N-Вос-амино-4-метилпентаналь (XVIII), полученного из амида Вайнреба N-Вос-L-лейцина (XVI), был синтезирован N-[(S)-2-амино-4-метилпентил]-дез-(N-метил-D-лейцил)-N',N''-дибензилэремомицин (XII). Параметры его ^1H -ЯМР-спектра и данные электрофореза совпадали с соответствующими данными для соединения (XI). Нам не удалось найти условия разделения соединений (XI) и (XII) методом ВЭЖХ, что, возможно, связано с их гомо- и гетеродимеризацией [12].

Антибактериальная активность соединений (XI) и (XII) была практически одинакова (см. табл. 2). Можно предположить, что соединения (XI) и (XII) – производные дез-(N-метил-D-лейцил)-N',N''-дибензилэремомицина, содержащие (R)- и (S)-2-амино-4-метилпентильный остаток, возможно, с преобладанием (R)- или (S)-изомеров соответственно в соединениях (XI) и (XII).

Гомогенность соединений (II)–(XII) была проверена методами ТСХ, ВЭЖХ и методом электрофореза на бумаге (табл. 1). Наличие дополнительной аминогруппы в соединениях (XI) и (XII) привело к увеличению их электрофоретической

Таблица 1. Производные эремомицина и их свойства

Соединение	Выход, %	ТСХ R_f	ВЭЖХ Время выхода RT, мин (система)	Молекулярная формула	Молекулярная масса		E_e^{***} в системах	
					вычисл.	$[M + H]^+$ найден.*	Д1	Д2
(II)	68	0.12	19.17 (B1)	$\text{C}_{80}\text{H}_{94}\text{ClN}_{11}\text{O}_{26}\text{S}$	1691.58	1692	0.85	0.86
(III)	82	0.02	2.94 (B1)	$\text{C}_{66}\text{H}_{76}\text{ClN}_9\text{O}_{25}$	1429.46	1431	0.96	0.94
(IV)	50	0.17	11.02 (B2)	$\text{C}_{78}\text{H}_{97}\text{ClN}_{10}\text{O}_{28}$	1656.62	**	0.89	0.88
(V)	95	0.38	18.24 (B2)	$\text{C}_{92}\text{H}_{109}\text{ClN}_{10}\text{O}_{28}$	1836.71	1838	0.74	0.74
(VI)	70	0.32	17.67 (B1)	$\text{C}_{87}\text{H}_{101}\text{ClN}_{10}\text{O}_{26}$	1736.66	1738	0.87	0.83
(VII)	98	0.35	16.03 (B2)	$\text{C}_{94}\text{H}_{106}\text{ClN}_{11}\text{O}_{26}\text{S}$	1871.67	1873	0.75	0.74
(VIII)	73	0.17	17.67 (B1)	$\text{C}_{80}\text{H}_{88}\text{ClN}_9\text{O}_{25}$	1609.56	1610	0.91	0.76
(IX)	97	0.35	17.96 (B2)	$\text{C}_{91}\text{H}_{109}\text{ClN}_{10}\text{O}_{27}$	1808.72	1810	0.84	0.72
(X)	91	0.35	17.43 (B2)	$\text{C}_{91}\text{H}_{109}\text{ClN}_{10}\text{O}_{27}$	1808.72	1810	0.84	0.73
(XI)	55	0.32	20.46 (B1)	$\text{C}_{86}\text{H}_{101}\text{ClN}_{10}\text{O}_{25}$	1708.66	1709	0.96	0.86
(XII)	50	0.32	20.49 (B1)	$\text{C}_{86}\text{H}_{101}\text{ClN}_{10}\text{O}_{25}$	1708.66	1710	0.97	0.86

* ESI MS.

** Соединение было охарактеризовано ранее [8].

*** Электрофоретическая подвижность относительно эремомицина.

Таблица 2. Антибактериальная активность производных эремомоцина

Микроорганизм	МПК, мкг/мл			
	(VI)	(VIII)	(XI)	(XII)
L 819 <i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0.5	64	16	8
L 613 <i>St. aureus</i> клин. изолят (MRSA)	0.5	64	16	16
L 147 <i>St. epidermidis</i> ATCC 12228	0.25	32	16	16
L 49 <i>Streptococcus pyogenes</i> C203	<0.13	16	8	16
L 1139 <i>Enterococcus faecalis</i>	4	64	64	64
L 559 <i>E. faecalis</i> (изогенный L 560)	0.25	32	16	64
L 560 <i>E. faecalis</i> VanA	>128	>128	128	>128
L 568 <i>E. faecium</i> (изогенный L 569)	<0.13	16	16	128
L 569 <i>E. faecium</i> клин. изолят VanA	>128	>128	>128	>128

подвижности по сравнению с *N,N'*-дибензилэремомоцином (VI). Строение полученных соединений подтверждено методами ¹H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии (ESI MS). Так, ¹H-ЯМР-спектр *N*-фениламинотиокарбонилэремомоцина (II) содержал все протонные сигналы, присутствующие в спектре эремомоцина (I) [13] и, кроме того, проявлял в области δ 6.9–7.0 м.д. дополнительный мультиплет протонов фенильного ядра. В ¹H-ЯМР-спектре дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)эремомоцина (III) по сравнению с эремомоцином (I) отсутствовали сигналы остатка *N*-метиллейцина, т.е. двух метильных групп в области δ 0.9–1.0 м.д., протонов CH₂-группы при δ 1.6 м.д., протона Cα-группы при δ 1.7 м.д. и *N*-концевой метильной группы при δ 2.9 м.д. В ¹H-ЯМР-спектре *N,N'*-дибензилэремомоцина (VI) присутствовали все протонные сигналы, характерные для молекулы эремомоцина (I) и, кроме того, в области δ 7.3–7.6 м.д. наблюдался мультиплет протонов ароматических ядер двух введенных бензильных групп. В ¹H-ЯМР-спектре дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)-*N,N'*-дибензилэремомоцина (VIII) отсутствовали сигналы протонов остатка *N*-метил-*D*-лейцина и присутствовали сигналы протонов двух введенных бензильных групп. В ¹H-ЯМР-спектрах изомерных дез-(*N*-метил)-*N,N'*-дибензил-1,2-дезоксоэремомоцинов (XI) и (XII) присутствовали десятипротонные мультиплеты протонов ароматических колец двух введенных бензильных групп, сигналы всех протонов остатка 2-амино-4-метилпентана (δ, м.д.: 0.93 [6H, д, *J* 6.6 Гц, (CH₃)₂CH]; 1.63 [2H, м, CH₂CH–]; 1.72 [1H, м, CH(CH₃)₂]; 3.5 [3H, м, NHCHCH₂NH]; 3.0 [2H, м, NHCHCH₂NH]) и отсутствовали сигналы протонов *N*-концевой метильной группы.

Антибактериальную активность производных дез-(*N*-метил)-*N,N'*-дибензил-1,2-дезоксоэремомоцинов (XI) и (XII) изучали в сравнении с исходным *N,N'*-дибензилэремомоцином (VI) и дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)-*N,N'*-дибензилэремомоцином (VIII) в отношении грамположительных микроорганизмов (табл. 2). *N,N'*-Дибензилэремомоцин (VI) проявил достаточно высокую активность в отношении стафилококков, в том числе метициллин-

устойчивых, а также в отношении ванкомицинчувствительных энтерококков, но не подавлял рост ванкомицинрезистентных энтерококков. Отщепление остатка *N*-метиллейцина (соединение (VIII)) привело к резкому снижению активности в отношении стафилококков и ванкомицинчувствительных энтерококков, соединение (VIII) оставалось неактивным в отношении ванкомицинустойчивых энтерококков. Введение аминоалкильного остатка (соединения (XI) и (XII)) практически не привело к повышению антибиотической активности по сравнению с соединением (VIII). (*R*)- и (*S*)-Производные 2-амино-4-метилпентил-дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)-*N,N'*-дибензилэремомоцина (XI) и (XII) были на 2 и более порядка менее активны, чем *N,N'*-дибензилэремомоцин (VI). Таким образом, замена первой аминокислоты на аминоалкильный остаток сопровождалась снижением активности, что, по-видимому, связано с ослаблением взаимодействия антибиотика с мишенью -Lys-*D*-Ala-*D*-Ala.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали препарат сульфат эремомоцина (I), полученный на опытной установке НИИ по изысканию новых антибиотиков РАМН.

Полноту прохождения реакций, процессы очистки и выделения, а также индивидуальность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ и ВЭЖХ. ТСХ проводили на пластинках с силикагелем 60F₂₅₄ (Merck, Германия) в системе EtOAc-PrOH-25% NH₄OH, (1.5 : 1 : 1). Пятна веществ на хроматограммах обнаруживали в УФ-свете. Аналитическую ВЭЖХ осуществляли на хроматографе LC-10 (Shimadzu, Япония) с использованием детектора SPD-10 и колонки Dia-sorb C16, 7 мкм, 4.0 × 250 мм (АО БиоХимМак, СНГ). Подвижной фазой служили системы, состоящие из двух компонентов. Система (В1): (0.1 М NH₄H₂PO₄, pH 3.75) и (MeCN), линейный градиент концентрации MeCN 5–45%, скорость потока 1 мл/мин, время хроматографирования 30 мин; система (В2): (0.2% HCOONH₄) и (MeCN), линейный градиент концентрации MeCN 20–60%, ско-

рость потока 1 мл/мин, время хроматографирования 40 мин. Запись велась при длине волны 280 нм.

Анализ производных эремомицина методом горизонтального электрофореза проводили на бумаге Filtrak FN-12 (Германия), используя 2 н. уксусную кислоту рН 2.4, 700 В, 3 ч (система (Д1)) или смесь муравьиной кислоты–уксусной кислоты–воды (10 : 24 : 86), рН 1.8, 260 В, 4 ч (система (Д2)). Для проявления веществ на электрофореграммах использовали реактив Паули. Препаративное выделение и очистку соединений осуществляли на колонках с карбоксиметилцеллюлозой CM-32 (Whatman, Великобритания) или силанизированным силикагелем (Merck, Германия), используя детектор Uvicord 2138 и самописец Recorder 2065 (LKB, Швеция). Для обессоливания использовали ионообменную смолу XAD-2 (H⁺-форма) (Serva, Германия), а также анионит ЭД-10 (OH⁻-форма) (Нижний Тагил, Россия). Содержание производных в водных растворах определяли по УФ-поглощению, которое регистрировали при длине волны 280 нм на спектрофотометре Hitachi U-2000 (Япония).

¹H-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Varian VXR-400 (США) для соединений (II), (III), (XI), (XII) – в D₂O, для соединений (V)–(X) – в DMSO при 400 МГц. Отнесение химических сдвигов проводили на основе данных, полученных для эремомицина, в том числе с использованием DQCOSY-экспериментов (корреляция химических сдвигов протонов с двухквантовой фильтрацией).

Масс-спектры при ионизации электрораспылением (ESI MS) получали на приборе API III PE-Sciex (Канада). Антибактериальную активность *in vitro* 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 10⁵ микробных тел в 1 мл. Инкубацию проводили 24 ч при 37°C.

N-Фениламинотиокарбонилэремомицин (III). К раствору 1000 мг (0.6 ммоль) сульфата эремомицина (I) в 100 мл воды прибавляли 500 мг смолы ЭД-10 (OH⁻-форма) и оставляли при комнатной температуре на 3 ч. После фильтрации раствор эремомицина (I) в форме основания упаривали в вакууме с BuOH до минимального объема и прибавляли к 100 мл ацетона. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали ацетоном и сушили в вакууме. Полученные 820 мг (0.52 ммоль) эремомицина (I) в форме основания растворяли в 20 мл смеси пиридин–вода (1 : 1), колбу наполняли аргонном и прибавляли 0.04 мл (0.4 ммоль) фенилизоцианата. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 16 ч, затем упаривали с BuOH в вакууме до минимального объема и наносили на хроматографическую колонку с силанизированным силикагелем (2 × 100 см), предварительно уравновешенную 1 mM водным раствором CH₃COOH. Элюцию со скоростью 30 мл/ч осу-

ществляли 1 mM водным раствором CH₃COOH, при этом собирали фракции, содержащие непрореагировавший эремомицин (I), а затем 20% MeOH в 1 mM водном растворе CH₃COOH. Фракции, содержащие целевой продукт (II), объединяли, упаривали с BuOH в вакууме до минимального объема, прибавляли 50 мл ацетона, выпавший осадок отфильтровывали, промывали ацетоном и высушивали в вакууме. Выход 606 мг (~68%) белого аморфного порошка N-фениламинотиокарбонилэремомицина (II).

Дез-(N-метил-D-лейцил)эремомицин (III). Раствор 550 мг (0.32 ммоль) N-фениламинотиокарбонилэремомицина (II) в 5 мл смеси CH₂Cl₂–TFA (1 : 1), охлажденной до температуры 0–5°C, перемешивали при той же температуре в течение 1 ч, прибавляли 5 мл воды и нейтрализовали 25% NH₄OH. Далее смесь экстрагировали EtOAc (7 мл × 3), упаривали с BuOH в вакууме до минимального объема, прибавляли к 50 мл ацетона, выпавший осадок отфильтровывали, промывали ацетоном и высушивали в вакууме. Выход дез-(N-метил-D-лейцил)эремомицина (III) 480 мг (~82%) белого аморфного порошка.

N-Вос-Эремомицин (IV). К раствору 2.0 г (1.2 ммоль) сульфата эремомицина (I) в 30 мл смеси диоксан–вода (1 : 1) добавляли 1 н. раствор NaOH до рН 7.5 и прибавляли к нему 132 мг (0.6 ммоль) Вос₂O в 0.5 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. После того как рН реакционной смеси снижалось до 6, добавляли еще 1 н. NaOH до рН 7.5 и 132 мг Вос₂O в 0.5 мл диоксана. Эту операцию повторяли 4 раза до тех пор, пока содержание целевого продукта в реакционной смеси по данным ТСХ не достигало 70–80%. Реакционную смесь разбавляли 300 мл ацетона, выпавший осадок отфильтровывали, промывали ацетоном 2 раза и высушивали в вакууме. Полученное вещество растворяли в 10 мл смеси 0.2 M водного раствора CH₃COONH₄ и EtOH (9 : 1) (рН 6.7) и наносили на хроматографическую колонку (4 × 25 см) с CM-целлюлозой, которая была предварительно уравновешена той же буферной смесью. Элюцию осуществляли смесью 0.1 M CH₃COONH₄–EtOH (9 : 1), при этом вымывали N,N,N'-три-Вос-эремомицин и N,N'-ди-Вос-эремомицин, а затем смесью 0.15 M CH₃COONH₄–EtOH (9 : 1), при этом собирали фракции, содержащие N-Вос-эремомицин (IV). Фракции, содержащие целевой продукт (IV), объединяли, прибавляли 25% NH₄OH до рН 8, 700 мл влажной смолы XAD-2 (H⁺-форма) и перемешивали 2 ч на магнитной мешалке. Смолу отфильтровывали, промывали на фильтре 1.5 л воды и продукт элюировали 1.5 л смеси BuOH–ацетон–вода (1 : 1 : 1). Элюат упаривали с BuOH в вакууме досуха, остаток растворяли в минимальном объеме MeOH, осаждали N-Вос-эремомицин (IV) 50 мл эфира, осадок промывали в эфире и высушивали в вакууме. Выход 1.01 г (~50%) белого аморфного порошка.

***N*-Вос-*N,N'*-Дибензилэремомицин (V).** К раствору 1 г (0.6 ммоль) *N*-Вос-эремомицина (IV) в 5 мл смеси пиридин–вода (1 : 1) прибавляли 200 мкл (1.6 ммоль) бензальдегида и 50 мг (0.8 ммоль) NaCNBH₃. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 2 ч, затем добавляли 200 мкл бензальдегида и 50 мг NaCNBH₃. Операцию повторяли 5 раз до тех пор, пока, по данным ТСХ, в реакционной смеси весь *N*-Вос-эремомицин (IV) не превращался в целевой продукт. Затем реакционную смесь разбавляли 100 мл ацетона, выпавший осадок *N*-Вос-*N,N'*-дибензилэремомицина (V) отфильтровывали, промывали ацетоном и сушили в вакууме. Выход 1.121 г (~95%) белого аморфного порошка.

***N,N'*-Дибензилэремомицин (VI).** Раствор 1.1 мг (0.6 ммоль) *N*-Вос-*N,N'*-дибензилэремомицина (V) в 10 мл смеси CH₂Cl₂–TFA (1 : 1), охлажденной до температуры 0–5°C, перемешивали при той же температуре в течение 1 ч, после чего прибавляли 5 мл воды и 25% NH₄OH до pH 5. Смесь экстрагировали EtOAc (7 мл × 2) и BuOH (7 мл × 4). Бутанольный экстракт упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 4 мл MeOH, прибавляли небольшое количество сухого силанизированного силикагеля, упаривали досуха и силикагель с нанесенным на него веществом вносили в колонку с силанизированным силикагелем (2 × 100 см), предварительно уравновешенную 1 mM водным раствором CH₃COOH. Элюцию осуществляли 1 mM водным раствором CH₃COOH, а затем 20% MeOH в 1 mM водном растворе CH₃COOH со скоростью 20 мл/ч. Фракции, содержащие целевой продукт (VI), объединяли, упаривали с BuOH в вакууме досуха, остаток растворяли в минимальном объеме MeOH, осаждали *N,N'*-дибензилэремомицин (VI) 150 мл эфира, осадок промывали эфиром и высушивали в вакууме. Выход 728 мг (~70%) белого аморфного порошка.

***N*-Фениламинотиокарбонил-*N,N'*-дибензилэремомицин (VII).** К раствору 700 мг (0.4 ммоль) *N,N'*-дибензилэремомицина (VI) в 5 мл смеси пиридин–вода (1 : 1) прибавляли 0.04 мл (0.4 ммоль) фенилизотиоцианата и 0.55 мл (4 ммоль) Et₃N. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 16 ч, затем разбавляли 100 мл ацетона, выпавший осадок *N*-фениламинотиокарбонил-*N,N'*-дибензилэремомицина (VII) отфильтровывали, промывали ацетоном и высушивали в вакууме. Выход 739 мг (~98%) белого аморфного порошка.

Дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)-*N,N'*-дибензилэремомицин (VIII). Раствор 870 мг (0.46 ммоль) *N*-фениламинотиокарбонил-*N,N'*-дибензилэремомицина (VII) в 5 мл смеси CH₂Cl₂–TFA (1 : 1), охлажденной до температуры 0–5°C, перемешивали при той же температуре в течение 1 ч, после чего добавляли 4 мл воды и нейтрализовали 25% NH₄OH. Смесь экстрагировали EtOAc (7 мл × 2) и BuOH (7 мл × 4). Бутанольный экстракт упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 3 мл

MeOH, прибавляли небольшое количество сухого силанизированного силикагеля, упаривали досуха и силикагель с нанесенным на него веществом вносили в колонку с силанизированным силикагелем (2 × 100 см), предварительно уравновешенную 1 mM водным раствором CH₃COOH. Элюцию осуществляли 1 mM водным раствором CH₃COOH, а затем 10% MeOH в 1 mM водном растворе CH₃COOH со скоростью 20 мл/ч. Фракции, содержащие целевой продукт (VIII), объединяли, упаривали с BuOH в вакууме досуха, остаток растворяли в минимальном объеме MeOH, осаждали дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)-*N,N'*-дибензилэремомицин (VIII) 80 мл эфира, осадок промывали эфиром и высушивали в вакууме. Выход 445 мг (~73%).

***N*-[(*R*)-2-*N*-Вос-Амино-4-метилпентил]-дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)-*N,N'*-дибензилэремомицин (IX).** К раствору 200 мг (0.124 ммоль) дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)-*N,N'*-дибензилэремомицина (VIII) в 4 мл смеси пиридин–вода (1 : 1) прибавляли 150 мг (0.65 ммоль) (*R*)-2-*N*-Вос-амино-4-метилпентанала (XVII) и 15 мг (0.24 ммоль) NaCNBH₃. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 3 ч, затем добавляли еще 150 мг (*R*)-2-*N*-Вос-амино-4-метилпентанала (XVII), 15 мг NaCNBH₃ и перемешивали при той же температуре 4 ч. Далее реакционную смесь разбавляли 100 мл ацетона, выпавший осадок *N*-[(*R*)-2-*N*-Вос-амино-4-метилпентил]-дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)-*N,N'*-дибензилэремомицина (IX) отфильтровывали, промывали ацетоном и сушили в вакууме. Выход 218 мг (~97%) белого аморфного порошка.

***N*-[(*S*)-2-*N*-Вос-Амино-4-метилпентил]-дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)-*N,N'*-дибензилэремомицин (X).** Продукт (X) был получен аналогично продукту (IX), но в реакцию был введен (*S*)-2-*N*-Вос-амино-4-метилпентаналь (XVIII). Выход 204 мг (91%) белого аморфного порошка *N*-[(*S*)-2-*N*-Вос-амино-4-метилпентил]-дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)-*N,N'*-дибензилэремомицина (X).

***N*-[(*R*)-2-Амино-4-метилпентил]-дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)-*N,N'*-дибензилэремомицин (XI)** получали аналогично *N,N'*-дибензилэремомицину (VI). Выход 103 мг (~55%) белого аморфного порошка *N*-[(*R*)-2-амино-4-метилпентил]-дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)-*N,N'*-дибензилэремомицина (XI).

***N*-[(*S*)-2-Амино-4-метилпентил]-дез-(*N*-метил-*D*-лейцил)-*N,N'*-дибензилэремомицин (XII)** был получен из соединения (X) аналогично соединению (XI). Выход 95 мг (~50%) белого аморфного порошка.

(*R*)-2-*N*-Вос-Амино-4-метилпентаналь (XVII). К раствору 2.3 г (10 ммоль) *N*-Вос-*D*-Leu-OH (XIII) в 100 мл сухого CH₂Cl₂, охлажденному до температуры 0–2°C, прибавляли 3.02 г (20 ммоль) гидроксидбензотриазола, 1.94 г (20 ммоль) метокси-метиламина гидрохлорида, 3.45 мл (25 ммоль) Et₃N и охлажденный до температуры 0–2°C раствор 3.09 г (15 ммоль) DCC в 10 мл сухого CH₂Cl₂.

Реакционную смесь перемешивали при охлаждении 2 ч, затем при комнатной температуре 16 ч, охлаждали до 5°C и отфильтровывали осадок дициклогексилмочевины. Маточник промывали 5 раз 0.1 н. HCl, 2 раза водой, затем 6 раз 5% раствором NaHCO₃, водой 2 раза, фильтровали через слой K₂CO₃, упаривали до объема 20 мл, охлаждали, выпавший осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, раствор упаривали до образования масла, которое высушивали в вакууме. Выход 2.24 г (~80%) *N*-Вос-*D*-Leu-*N*(CH₃)OCH₃ (XV). 1.0 г (3.45 ммоль) полученного метоксиметиламида (XV) растворяли в 20 мл сухого THF, раствор охлаждали до температуры 0–2°C и прибавляли порциями 180 мг (4.7 ммоль) LiAlH₄ в течение 1 ч. Прибавляли по каплям 24 мл 0.35 М раствора KHCO₃ так, чтобы температура реакционной смеси не поднималась выше 5°C, реакционную смесь фильтровали, осадок промывали на фильтре EtOAc, фильтраты упаривали в вакууме до объема ~75 мл, промывали 3 раза 0.1 н. HCl, 1 раз водой, затем 5 раз 5% раствором NaHCO₃, водой 2 раза, фильтровали через слой K₂CO₃ и упаривали. Маслообразный остаток высушивали в вакууме, получили 628 мг (85%) (*R*)-2-*N*-Вос-амино-4-метилпентаналь (XVII), *R*_f 0.51, этилацетат–петролейный эфир, 1 : 3, [α]_D+18° (*c* 1, метанол), по литературным данным [14] [α]_D+44.4° (*c* 0.5, метанол). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃), δ, м.д.: 0.95 [6H, д, *J* 4.25 Гц ((CH₃)₂CH)]; 1.36 и 1.63 [2H, 2 м, CH₂]; 1.43 [9H, с, (CH₃)₃C]; 1.75 [1H, м, CH(CH₃)₂]; 4.23 [1H, м, α-CH]; 4.92 [1H, м, NH]; 9.57 [1H, с, CHO].

(*S*)-2-*N*-Вос-Амино-4-метилпентаналь (XVIII) получали аналогично (*R*)-2-*N*-Вос-амино-4-метилпентаналю (XVII), через метоксиметиламид *N*-Вос-*L*-Leu (XVI), но в качестве исходного брали *N*-Вос-*L*-Leu-OH (XIV). *R*_f 0.51, этилацетат–петролейный эфир, 1 : 3, [α]_D-20° (*c* 1, метанол), по литературным данным [9] [α]_D-45.7° (*c* 1, метанол).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.б.н. М.И. Резниковой (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе РАМН) за выполнение ВЭЖХ, д-ру Л. Коломбо (Biosearch Italia S.p.A, Италия) за получение ESI-масс-спектров и Г. Романо (Biosearch Italia S.p.A., Италия) за изучение антибактериальной активности производных эремомоцина.

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-Mallen S., Arthur M., Courvalin P., Walsh C.T. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 10408–10415.
3. Courvalin P. // Antimicrob. Agents and Chemoth. 1990. V. 31. P. 2291–2296.
4. Williams D.H., Waltro J.P. // Biochem. Pharm. 1988. V. 37. P. 133–144.
5. Gortlitzer J., Gale J.F., Williams D.H. // J. Chem. Soc. Perkin Trans 1. 1999. P. 3253–3257.
6. Edman P. // Acta Chem. Scand. 1950. V. 4. P. 277.
7. Pavlov A.Y., Miroshnikova O.V., Printsevskaya S.S., Olsufyeva E.N., Preobrazhenskaya M.N., Goldman R.C., Branstrom A.A., Baizman E.R., Longley C.B. // J. Antibiot. 2001. V. 54. P. 455–459.
8. Pavlov A.Y., Berdnikova T.F., Olsufyeva E.N., Lazhko E.I., Malkova I.V., Preobrazhenskaya M.N. // J. Antibiot. 1993. V. 46. P. 1731–1739.
9. Fehrentz J.-A., Castro B. // Synthesis Communication. 1983. P. 676–678.
10. Yan H., Qi D., Cheng X., Song Z., Li W., He B. // J. Antibiot. 1998. V. 51. P. 750–756.
11. Rittle K.E., Homnick C.F., Pontichello G.S., Evans B.E. // J. Org. Chem. 1982. V. 47. P. 3016–3018.
12. Olsufyeva E.N., Joergensen T.J.D., Mirgorodskaya O.A., Pavlov A.Y., Miroshnikova O.V., Preobrazhenskaya M.N. // Program and Abstracts of 1st International Conference on Chemistry of Antibiotics and Related Microbial Products. Bologna, Italy, 1998. PC 12.
13. Batta G., Sztaricskai F., Kover K.E., Rudel C., Berdnikova T.F. // J. Antibiot. 1991. V. 44. P. 1208–1221.
14. Soucek M., Urban J. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1995. V. 60. P. 693–696.

Antibiotic *N,N'*-Dibenzylereomycin with the Reduced 1,2-Peptide Bond

S. S. Printsevskaya, E. N. Olsuf'eva[#], E. I. Lazhko, and M. N. Preobrazhenskaya

[#]Phone: +7 (095) 245-3753; e-mail: lcta@space.ru

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

Eremomycin derivatives with benzylated amino groups of both residues of eremosamine and with (*R*) or (*S*)-2-amino-4-methylpentyl substituted for *N*-methyl-*D*-Leu, the first amino acid residue of its heptapeptide, were synthesized to study the role of the peptide bond between the first and the second amino acid residues of the heptapeptide moiety of the antibiotic in its interaction with the precursors of the bacterial cell wall peptidoglycan and exhibition of its antibacterial activity. Comparison of the antibacterial activities of *N,N'*-dibenzylereomycin, de-(*N*-methyl-*D*-Leu)-*N,N'*-dibenzylereomycin, and its *N*-(2-amino-4-methylpentyl)-derivative (1,2-deoxo-*N,N'*-dibenzylereomycin) demonstrated that cleavage or replacement of the first amino acid residue by the corresponding aminoalkyl residue results in a decrease in its antibacterial activity towards both vancomycin-sensitive and vancomycin-resistant strains of microorganisms. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

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