

Синтез и биологические свойства 2,3,16,17,18,19–гексагидроолигомицина А

О. А. Омельчук,^{a,b@1} Н. М. Белов,^a В. Б. Цветков,^{c,d,e} Н. Э. Грамматикова,^{a,f}
Л. Н. Лысенкова,^a А. М. Королев,^a О. Б. Беккер,^g В. Н. Даниленко,^g
А. Е. Щекотихин^{a,b@2}

^aИнститут по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, 119021 Москва, Российская Федерация

^bРоссийский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, 125047 Москва, Российская Федерация

^cИнститут нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН, 119991 Москва, Российская Федерация

^dФедеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, 119435 Москва, Российская Федерация

^eНаучно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376 Санкт-Петербург, Российская Федерация

^fПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, 119991 Москва, Российская Федерация

^gИнститут общей генетики Российской академии наук им. Н.И. Вавилова, 119333 Москва, Российская Федерация

^{@1}E-mail: omelchuk.93@mail.ru

^{@2}E-mail: shchekotikhin@mail.ru

В статье описан синтез производного олигомицина А (1) – 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицина А (3), а также его физико-химические, спектральные и биологические свойства. Гидрирование на Pd/C олигомицина А (1) в мягких условиях приводит к продукту восстановления трех двойных С=C связей. Структура пергидроолигомицина (3) доказана методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Исследованы противогрибковые, антиактиномикозные и антипролиферативные свойства нового антибиотика 3. Выявлена селективная активность пергидроолигомицина (3) в отношении ряда штаммов грибов рода *Candida*, тогда как активность для других тест-культур была в 3–20 раз ниже активности исходного олигомицина А. Методами компьютерного моделирования проведено сравнительное исследование комплексообразования при взаимодействии антибиотиков с мишенью – F₀-субъединицей АТФ-синтазы, результаты которого согласуются с результатами биологического скрининга.

Ключевые слова: Гексагидроолигомицин А, олигомицин А, полусинтетический антибиотик, макролидный антибиотик, противогрибковая активность, антиактиномикозная активность, антипролиферативная активность, ингибитор АТФ-синтазы.

Synthesis and Biological Activity of 2,3,16,17,18,19–Hexahydrooligomycin A

Olga A. Omelchuk,^{a,b@1} Nikita M. Belov,^a Vladimir B. Tsvetkov,^{c,d,e}
Natalia E. Grammatikova,^{a,f} Lyudmila N. Lysenkova,^a Alexander M. Korolev,^a
Olga B. Bekker,^g Valery N. Danilenko,^g and Andrey E. Shchekotikhin^{a,b@2}

^aGause Institute of New Antibiotics, 119021 Moscow, Russian Federation

^bD. I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 125047 Moscow, Russian Federation

^cTopchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russian Federation

^dInstitute for Physical-Chemical Medicine, 119435 Moscow, Russian Federation

^eResearch Institute of Influenza, 197376 St.-Petersburg, Russian Federation

^fI.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russian Federation

Oligomycin A (**1**) belongs to the class of highly substituted macrolide antibiotics produced by actinomycetes *Streptomyces*.^[1] Oligomycin A (**1**) has antifungal and cytotoxic activities but Gram-negative and Gram-positive bacteria are resistant to **1** except actinobacteria.^[2] At micromolar concentrations **1** inhibited F_0F_1 -ATPase by binding with subunit F_0 and blocking OSCP (oligomycin sensitivity conferring protein).^[3] Previously a series of modifications at the side chain and chemical transformation of the lactone moiety of **1** have been developed.^[4-8] However, all derivatives modified at the lactone moiety were less potent than **1**.^[7,8] Recently a new derivative, 2,3-dihydrooligomycin A (**2**), has been obtained by a microbiological method. This compound showed a higher activity against *Saccharomyces cerevisiae* than **1**.^[9] We investigated chemical reduction of double C-C bonds of **1**. Hydrogenation of **1** on Pd/BaSO₄ gives an unseparable mixture of products. Using Pd/C in the reduction of **1** in methanol led to 2,3,16,17,18,19-hexahydrooligomycin A (**3**) in a good yield. The structure of **3** was confirmed by NMR-spectroscopy and high resolution mass spectrometry. Investigations of antifungal and anti-yeast properties were evaluated against *Candida* spp. (clinical isolates and reference strains) and filamentous fungi. Hexahydrooligomycin (**3**) showed a high selective activity against *C. parapsilosis*, *C. utilis*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* and was inefficient against micromycetes. Notably, the *C. krusei* strain is resistant to fluconazole. The actinomycete *S. fradiae* ATCC-19069 exceptionally sensitive to **1** (MIC 0.5 nmol/ml) was resistant to **3**. Hexahydrooligomycin **3** was also less toxic than **1** against human K562 leukemia and HCT116 colon carcinoma cell lines. Thus, reduction of three double C=C bonds increases selectivity to *Candida* spp. with simultaneous decrease of potency against other test-cultures. A computer assisted simulation of interaction of **1** and **3** with the intracellular target (F_0 -subunit of the ATP-synthase) was performed using Molsoft ICM-Pro 3.8. The results of docking studies were in a good agreement with bioscreening data. Further development of methods of modification of **1** is needed for detailed understanding of SAR and drug optimization.

Keywords: Hexahydrooligomycin A, oligomycin A, semisynthetic antibiotics, macrolide antibiotics, antifungal activity, antiactinomycotic activity, antiproliferative activity, ATP synthase inhibitor.

Введение

Макролидный антибиотик олигомицин A (**1**) (Рисунок 1), продуцируемый актиномицетами рода *Streptomyces*,^[1] проявляет противогрибковое и цитотоксическое действие, однако высокая антибактериальная активность выражена только в отношении стрептомицетов.^[2]

В субмикромольных концентрациях олигомицин A (**1**) ингибирует F_0F_1 -АТФ-синтазу, нарушая процесс окислительного фосфорилирования и энергетический обмен в клетках про- и эукариот. Связываясь с F_0 субъединицей АТФазы, олигомицин A (**1**) блокирует работу OSCP (the oligomycin sensitivity conferring protein), что нарушает синтез АТФ.^[3]

Ранее нами был разработан ряд эффективных методов химической трансформации олигомицина A (**1**) как по боковой цепи (положение 33), так и по макролактонному кольцу.^[4-8] Установлено, что изменение структуры макролактона значительно снижает активность антибиотика.^[7,8] Однако недавние исследования биологических свойств 2,3-дигидроолигомицина A (**2**) (Рисунок 1), полученного микробиологическим путем, показали, что восстановление двойной 2С-3С связи приводит к повышению активности в отношении дрожжей *S. cerevisiae*.^[9] Нами впервые исследованы возможности химического восстановления антибиотика **1** по кратным связям углерод-углерод.

В работе получен и охарактеризован ранее не описанный 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицин A (**3**).

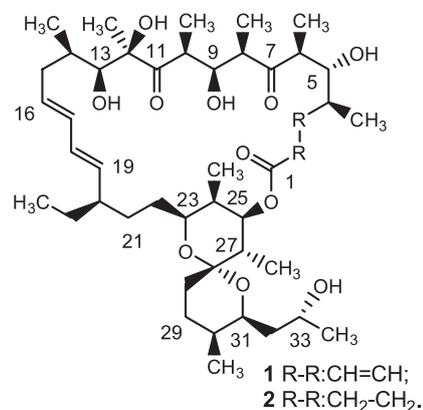


Рисунок 1. Структуры олигомицина A (**1**) и 2,3-дигидроолигомицина (**2**).

Скрининг биологических свойств нового антибиотика **3** выявил его избирательную активность против ряда штаммов дрожжевых грибов *Candida* spp.

Эксперимент

Химическая часть

Олигомицин A (чистота 95 %), продуцируемый штаммом *Streptomyces avermitilis* NIC B62, получен в автономном некоммерческом исследовательском центре БИОАН (Москва,

Российская Федерация). Катализатор и растворители производства Sigma-Aldrich.

Для аналитической ТСХ использовались алюминиевые пластинки с закрепленным слоем силикагеля F₂₅₄ толщиной 0.2 мм (Merck); для колоночной хроматографии использовался силикагель 60 (Merck). Соединения обнаруживали в УФ-свете (254 нм), проявляли реактивом, содержащим 4.5 % (об.) анисового альдегида, 3.0 % (об.) концентрированной серной кислоты, 1.5 % (об.) ледяной уксусной кислоты в EtOH.

Аналитическую ВЭЖХ выполняли с использованием хроматографа Shimadzu LC-20 AD (Shimadzu Corporation) на колонке Kromasil-100-C18 размером (4×250 мм, 5 мкм) (Knauer, Германия). Объем петли инжектора 20 мкл. Детектирование осуществляли при длине волны 210 нм. Элюирование проводили в течение 40 мин системой MeCN-H₂O: 10 мин – градиентный режим (содержание MeCN 80→95 %), 30 мин – изократический режим (содержание MeCN – 95 %), скорость потока – 1 мл/мин.

Спектры ЯМР (Рисунки Д1–Д9, см. Дополнительные материалы) регистрировались на спектрометре «Avance III» фирмы «Bruker» с резонансной частотой на ядрах ¹H и ¹³C 600 и 150 MHz, соответственно. В качестве растворителя использовали дегидрированный метанол фирмы «Merck». Химические сдвиги ядер измеряли при 25 °С, используя в качестве внутреннего стандарта сигнал остаточного метанола (3.31 м.д. для ¹H и 49.2 м.д. для ¹³C).

Масс-спектры высокого разрешения ESI (Рисунки Д10–Д13) регистрировали на приборе «micrOTOF-Q II» («Bruker Daltonics GmbH», Германия). Растворы образцов (0.1 мг/мл в смеси CHCl₃ и EtOH) прямо вводили в ESI-источник с помощью шприцевого насоса со скоростью потока 3 мкл/мин и анализировали положительно и отрицательно заряженные ионы при следующих условиях детектирования: напряжение на капилляре 4 кВ, давление азота в небулайзере 0.4 Бар (5.8 psi), скорость потока осушающего газа 4.0 л/мин и температура источника 180 °С. Для измерений использовали растворители с содержанием более 98 %, предназначенные для LC-MS. Фрагментацию пергидроолигомицина (**3**) проводили методом tandemной масс-спектрометрии в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) при энергии соударений исходной молекулы с молекулами азота 20–90 эВ в ячейке с диссоциацией, индуцируемой соударением (CID).

ИК-спектр (Рисунок Д14) регистрировали с использованием ИК-Фурье спектрометра Nicolet-iS10 (детектор DTGS, светодетектор KBr) с приставкой Smart Performer, оснащенной ZnSe кристаллом (Nicolet, Madison, WI, USA). Измерение проводили при разрешении 4 см⁻¹; зона спектра 4000–650 см⁻¹. Спектр обрабатывали с использованием программы OMNIC–7.0. УФ-спектр (Рисунок Д15) регистрировали на спектрометре Hitachi-U2000. Оптическое вращение измеряли на поляриметре AA55 Polarimeter, Optical Activity Ltd (Великобритания).

Синтез 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицина (3). К раствору 60.0 мг (0.075 ммоль) олигомицина **А** (**1**) в 4.0 мл метанола добавляют 48.0 мг (0.0225 ммоль) 5% Pd/C и гидрируют при избыточном давлении водорода (0.4 атм) при комнатной температуре 1 ч. Реакционную смесь фильтруют, промывают катализатор метанолом и концентрируют в вакууме. Остаток очищают колоночной хроматографией (гексан:ацетон 10:3→10:4, хлороформ:метанол 10:0.2→10:0.3). Выход 42.0 мг (69 %). Аморфный порошок белого цвета. Т. пл. 83 °С. Найдено: *m/z* ESI 797.5593 (100 %) [M+H]⁺. C₄₅H₈₀O₁₁. Вычислено 796.5701. ИК (пленка) ν_{\max} см⁻¹: 3416 с, 2971 с, 2928 с, 2857 с, 1731 с, 1698 с, 1458 с, 1382 с, 1340 с, 1264 с, 1222 с, 1191 с, 1169 с, 1135 с, 1089 с, 1048 с, 982 с, 882 с, 844 с, 802 с. УФ (метанол) λ_{\max} (lgε) нм: 207(3.7), 268 (2.8). ЯМР, HRMS, ИК и УФ спектры пергидроолигомицина **3** приведены на Рисунках Д1–Д15 (дополнительные материалы). [α]_D²⁰ (с 0.1, метанол) –80°. ВЭЖХ: R_f=23.2, чистота 95.2 %.

Биологическая часть

Методика определения антифунгальной активности

Оценку активности исследуемых образцов проводили в соответствии со стандартом^[10] и рекомендациями.^[11,12] Для определения значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) использовали микрометод серийных разведений в среде RPMI 1640 (с глутамином, производства ПанЭко) с добавлением глюкозы в готовую среду до концентрации 0.2%.

Анализ осуществляли в отношении контрольных штаммов дрожжевых культур *C. albicans* ATCC 24433, *C. parapsilosis* ATCC 22019, клинических изолятов *Candida spp.* и филаментозных грибов *A. niger* 137а, дерматофитов *M. canis* В-200, *T. rubrum* 2002.

Для получения основных растворов изучаемых образцов **1** и **3** с концентрацией 10000 мкг/мл навески растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Для получения рабочих растворов с концентрацией 64 мкг/мл основные растворы в количестве 0.064 мл переносили в 9.93 мл питательного бульона RPMI 1640 с глюкозой 0.2 %, конечная концентрация ДМСО не превышала 0.3 %.

Тест-микроорганизмы сохраняли в условиях низкой температуры (–75 °С) в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 10–15 % глицерина.

Для получения посевного материала, штаммы выращивали на агаризованной среде Сабуро (ГРМ 2 ВФС 42-3068-98, Биохолд, Россия) при 35 °С *Candida spp.* в течение 48 ч, филаментозные грибы около 2 недель.

Посевную суспензию *Candida spp.* приготавливали в среде RPMI с 0.2 % глюкозой по стандарту мутности 0.5 McFarland (~5·10⁶ КОЕ/мл для дрожжевых культур), оценивали денситометрически (Densimat, Biomerieux), разводили 1:1000 до ~5·10³ КОЕ/мл в среде RPMI с 0.2 % глюкозой. Для каждого тест-штамма филаментозных грибов инокулят получали растиранием части колонии в физиологическом растворе в пробирке со стеклянными бусами. Сбор конидий и спор производили пипеткой через марлевый фильтр. Подсчет конидий и спор осуществляли с использованием камеры Горяева. Каждый инокулят доводили до рабочего титра в среде RPMI. В результате получали суспензию, содержащую 1.5–3.2·10⁴ КОЕ/мл. Для контроля титра жизнеспособных колониеобразующих единиц (КОЕ), 10 мкл инокулята переносили на агаризованную питательную среду Сабуро.

В работе использовали 96 луночные планшеты для иммунологических исследований (Медполимер, С-Петербург). В лунки планшета вносили 100 мкл суспензии дрожжевых культур в питательной среде и образцы в диапазоне концентраций 32–0.25 мкг/мл. Каждый образец анализировали в трех повторениях.

Для наблюдения точности процедуры определения значений минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в качестве внутреннего стандарта использовали флуконазол (Синерджин Эктив Ингредиентс (Пи) ЛТД), диапазон активности которого в отношении эталонного штамма *Candida parapsilosis* ATCC 22019 составляет 1–4 мкг/мл.^[10] Для контроля роста все тест-культуры засеивали в питательную среду без образцов.

Оценку чувствительности проводили визуально, после инкубации при 35 °С в течение 24 и 48 ч для *Candida spp.* и 48–96 ч для *A. niger*, *M. canis* В, *T. rubrum*, сравнивая с плотностью роста в контроле без препарата. За МИК принимали наименьшую концентрацию образца, при которой видимый рост подавлен не менее чем на 80 % в сравнении с контролем роста.

Методика определения антибактериальной активности

Анализ осуществляли в отношении актинобактерии *S. fradiae* ATCC-19069. Чашки с агаризованной (2 % агара) средой

МГ,^[13] содержащие различные концентрации олигомицина **1** или его производного **3**, засеивали споровой суспензией 10⁵ КОЕ, смешанной с полужидким агаром (0.8 %) МГ, содержащим те же концентрации веществ. После застывания верхнего слоя чашки выдерживали 3 суток в термостате при 28 °С. Фиксировали результат. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) (нмоль/мл) была определена как концентрация вещества, при которой на чашках отсутствует газонный рост.

Методика определения антипролиферативной активности

Цитотоксичность определяли в МТТ-тесте в отношении клеток хронической миелоидной лейкемии человека K-562 и аденокарциномы кишечника НСТ-116. Готовился 10 мМ раствор тестируемых соединений **1** и **3** в ДМСО, затем осущестлялась серия разведений водой непосредственно перед экспериментом. Клетки (5·10³ в 190 мл культуральной жидкости) сеяли в 96-луночный планшет (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) и добавляли 0.1 % ДМСО (контрольная лунка) или растворы тестируемых соединений с возрастающей концентрацией, затем культивировали 72 ч. Для каждой концентрации эксперименты были выполнены в трех повторностях. По окончании воздействия соединений в каждую лунку добавляли 50 мкг бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия и дополнительно инкубировали планшет 2 ч. Формазан растворяли в ДМСО, и измеряли поглощение при 540 нм. Цитотоксичность при каждой концентрации тестируемых соединений определялась как процентное отношение величины поглощения в лунке с тестируемым соединением к величине поглощения в контрольной лунке (100 %). Величина полуингибирующей концентрации (IC₅₀) была определена как концентрация соединения, при которой конверсия МТТ ингибируется на 50 %.

Молекулярный докинг

Координаты для 3D моделей мишени были взяты из PDB: 4f4s. 3D-модели лигандов и мишени были построены с использованием Molsoft ICM-Pro версии 3.8-3.^[14] При построении 3D модели мишени были проведены следующие процедуры: добавлены атомы водорода и отсутствующие тяжелые атомы в боковых группах аминокислот, назначены типы атомов и заряды из силового поля ECEPP/3^[15] для мишени и из силового поля MMFF (Merck Molecular Force Field)^[16] для лигандов, была произведена оценка заряженных состояний всех His, Asp, Glu, Arg, Lys и Cys, входящих в состав мишени, с учетом pH 7.0, трансформация декартовых координат во внутренние и MM оптимизация с помощью метода сопряженных градиентов для устранения возможно имеющегося сильного Ван-дер-Ваальсового отталкивания атомов. Для определения наиболее вероятного сайта связывания на поверхностях мишеней и оценки энергии связывания использовали процедуру докинга с применением вышеуказанной программы. Процедура докинга была осуществлена в два этапа. Вначале был реализован докинг с «жесткой» мишенью, в течение которого при поиске возможных положений лиганда учитывалась только конформационная, позиционная и вращательная подвижность лиганда, а геометрия мишени оставалась неизменной. Затем геометрия комплексов, полученных на первом этапе, была оптимизирована с применением ВРМС процедуры. На этом этапе оптимизации подвергались как конформации лиганда, так и конформации боковых групп аминокислот, расположенных в области с радиусом 4 Å. Описание ВРМС процедуры и оценки энергии связывания описано ранее.^[17] Финальный конформационный стек, полученный на второй стадии, был отсортирован по значению оценки энергии связывания. Свободная энергия комплексообразования рассчитывалась как сумма энергии комплексообразования в вакууме и разница

между энергией сольватации комплекса и суммой энергией сольватации несвязанных мишени и лиганда ΔG_{solv} , по формуле:

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{eq} + \Delta G_{vdW} + \Delta G_{hbond} + \Delta U - T\Delta S + \Delta G_{solv}$$

Энергия комплексообразования в вакууме оценивалась как сумма изменения электростатической ΔG_{eq} и Ван-дер-Ваальсовой ΔG_{vdW} составляющих, энергии формирования водородных связей ΔG_{hbond} , энергии напряжений связей, валентных и двугранных углов ΔU , изменения энтропии за счёт потери конформационной подвижности как мишени, так и лиганда $T\Delta S$. Энергия сольватации оценивалась по методу Вессона-Айзенберга.^[18]

Обсуждение результатов

Олигомицин **1** содержит в своей структуре диеновую систему (16-19 положения) и α,β -ненасыщенную связь лактона (2,3 положения), способных к восстановлению. Микробиологический способ, предложенный корейскими исследователями,^[9] позволяет селективно восстановить акриловую 2С-3С связь, не затрагивая сопряженную систему в положениях 16-19. Нами исследованы возможности каталитических методов восстановления олигомицина **1**. Подобрать условия для избирательного восстановления одной или двух С=С связей олигомицина **1** нам не удалось. Гидрирование антибиотика **1** на катализаторе Роземунда (Pd/BaSO₄, 5 %) как в протонных растворителях (метанол, этанол), так и в неполярных (толуол, циклогексан) дает смесь продуктов. Выделение и очистка индивидуальных соединений из полученной смеси затруднены их близкой хроматографической подвижностью. В условиях катализа на Pd/C (5 %) гидрирование протекает более активно, но неселективно и затрагивает как сопряженные связи в 16-19 положениях, так и α,β -ненасыщенную связь лактона в положениях 2, 3. Так, гидрирование в мягких условиях олигомицина **1** на Pd/C в метаноле дает 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицин (**3**) с хорошим выходом (Схема 1). Следует отметить, что при контроле протекания реакции методом тонкослойной хроматографии (элюент гексан:ацетон 1.7:1) при неполной конверсии олигомицина **1** пробы реакционной смеси содержали только исходное соединение **1** ($R_f=0.43$) и продукт реакции **3** ($R_f=0.48$), а образование промежуточных продуктов гидрирования практически не наблюдалось.

Строение пергидроолигомицина (**3**) доказано данными ¹H и ¹³C спектров ядерного магнитного резонанса, методами масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS ESI).

Масс-спектр высокого разрешения содержал пик, соответствующий молекулярному иону лактона **3** – 797.5593 [M+H]⁺. Структура 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицина **1** (**3**) подтверждена tandemной масс-спектрометрией (МС / МС, CID) при низкой энергии квадруполь (20–90 эВ). При энергии соударений 20–35 эВ в масс-спектрах **3** преобладал ион m/z 451, образующийся при раскрытии лактона и ретроальдольного расщепления по положению 13. Дальнейшая фрагментация приводит к элиминированию молекулы воды в положении 33. Так, в спектрах наблюдался преимущественно ион m/z 433, а также ион m/z 391, соответствующий второй половине

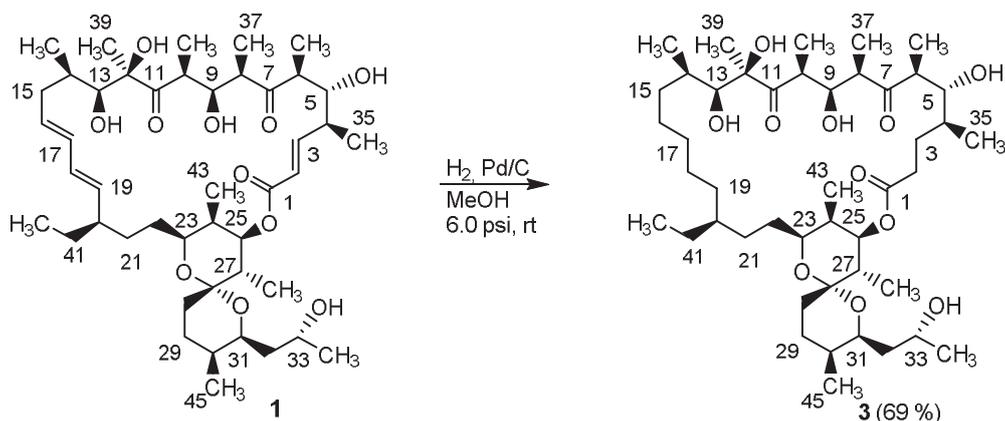


Схема 1. Синтез 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицина *A* (**3**).

молекулы. Возможные структуры фрагментации иона **3** (m/z 797.6) изображены на Схеме 2. Следует отметить, что гидрирование кратных связей повышает лабильность цикла в условиях тандемной масс-спектрометрии. Так, заметная фрагментация макроцикла пергидропроизводного **3** наблюдается при энергии соударений 20 эВ, в то время как деструкция аналогов, содержащих присутствующие олигомицину три двойные связи, происходит лишь при энергии соударений 70 эВ.^[6]

Для пергидроолигомицина (**3**) зарегистрированы спектры ЯМР ^1H и ^{13}C , а также корреляционные спектры ЯМР ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC. Спектр ЯМР ^{13}C соединения **3** содержит 45 сигналов, из которых 11 соответствуют CH_3 -группам,

13 – CH_2 -группам, 16 – CH -группам (на основании анализа спектра ^1H - ^{13}C HSQC), 2 – группам $\text{C}=\text{O}$, 1 – группе $\text{O}=\text{C}=\text{O}$, 1 – группе $\text{O}-\text{C}-\text{O}$, 1 – группе $\text{C}-\text{O}$ (на основании анализа спектра ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC). В спектре ЯМР ^{13}C пергидроолигомицина *A* (**3**) отсутствуют сигналы олефиновых ядер ^1H и ^{13}C , что подтверждает восстановление всех связей $\text{C}=\text{C}$ исходного олигомицина *A* (**1**). Отнесение химических сдвигов на основании анализа спектров ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, приведены в Таблице 1.

Для нового производного олигомицина **3** проведено исследование противогрибковых, антиактиномикозных и антипролиферативных свойств в сравнении с исходным

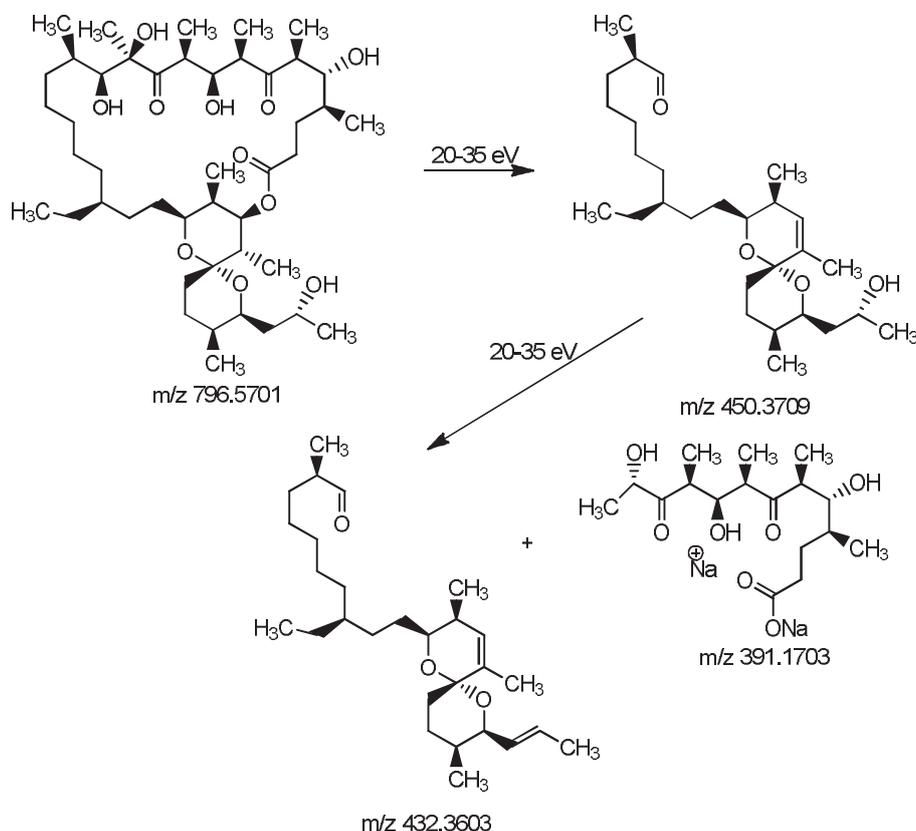


Схема 2. Фрагментация соединения **3** методом тандемной масс-спектрометрии при энергии соударения 20–35 эВ.

Таблица 1. Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР пергидроолигомицина A (3) и олигомицина A (1).

Поз.	Олигомицин A (1)			Пергидроолигомицин (3)		
	Тип	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (J в Hz)	Тип	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (J в Hz)
1	O=CO	165.0	–	O=CO	175.1	–
2	CH	122.6	5.80, дд (15.6, 0.7)	CH ₂	33.1	2.46, ддд (15.7, 6.6, 0.8); 2.37, ддд (15.7, 6.6, 0.8)
3	CH	148.3	6.62, дд (15.6, 10.1)	CH ₂	30.1	1.78, м; 1.49, м
4	CH	40.1	2.36, ткв (10.0, 6.6)	CH	36.5	1.53, м
5	CH	72.9	3.75, дд (10.1, 1.3)	CH	75.9	3.65, ткв (6.3, 4.7)
6	CH	46.4	2.70, дкв (1.3, 7.4)	CH	48.3	3.02, дкв (6.9, 6.7)
7	C=O	220.2	–	C=O	218.4	–
8	CH	41.9	3.59, дкв (8.6, 6.9)	CH	49.9	2.71, дкв (4.0, 7.1)
9	CH	72.6	3.94, дд (8.6, 3.1)	CH	72.9	4.16, дд (7.4, 4.0)
10	CH	45.6	2.74, дкв (3.0, 7.1)	CH	44.1	3.51, дкв (7.1, 6.9)
11	C=O	219.9	–	C=O	221.5	–
12	C-O	82.9	–	C-O	84.5	–
13	CH	72.2	3.89, д (1.9)	CH	75.8	3.90, д (2.0)
14	CH	33.4	1.88, м	CH	34.8	1.77, м
15	CH ₂	38.3	2.17, бд; 1.98 дт	CH ₂	28.9	1.43, м; 1.23, м
16	CH	129.3	5.42, ддд (14.8, 10.5, 4.1)	CH ₂	27.0	1.43, м; 1.30, м
17	CH	132.3	6.00, ддд (14.7, 10.4, 1.4)	CH ₂	27.1	1.43, м; 1.30, м
18	CH	130.2	5.90, дд (14.9, 10.5)	CH ₂	27.6	1.43, м; 1.30, м
19	CH	137.7	5.21, дд (14.8, 9.6)	CH ₂	29.2	1.43, м; 1.30, м
20	CH	45.9	1.85, м	CH	40.0	1.32, м
21	CH ₂	31.4	1.52, м; 1.35, м	CH ₂	36.2	1.44, м; 1.23, м
22	CH ₂	30.9	1.59, ддд	CH ₂	30.5	1.43, м; 1.23, м
23	CH	68.9	3.78, ддд (9.8, 2.7, 2.4)	CH	70.6	3.85, ддд (5.9, 0.9, 2.0)
24	CH	35.7	2.11, дкв (5.0, 2.2, 6.9)	CH	36.7	2.11, дкв (2.0, 0.9, 7.2)
25	CH	76.1	4.91, дд (11.4, 5.0)	CH	77.7	4.99, дкв (11.8, 4.5)
26	CH	37.6	1.78, дкв (11.4, 6.6)	CH	39.3	1.78, м
27	OCO	99.1	–	OCO	100.6	–
28	CH ₂	25.9	1.90, м; 1.23, м	CH ₂	27.5	1.93, м; 1.23, м
29	CH ₂	26.4	2.07, м; 1.38, м	CH ₂	27.8	2.16, м; 1.41, м
30	CH	30.4	1.54, м	CH	31.8	1.56, м
31	CH	67.1	3.96, дт (10.3, 2.5)	CH	68.8	4.03, дт (10.1, 2.8)
32	CH ₂	42.4	1.55, м; 1.25 м	CH ₂	43.7	1.54, м; 1.31, м
33	CH	64.6	4.00, дкв (9.2, 3.1, 6.2)	CH	65.4	3.93, дкв (9.3, 3.7, 6.2)
34	CH ₃	24.6	1.21, д (6.2)	CH ₃	25.1	1.19, д (6.2)
35	CH ₃	17.8	1.16, д (6.6)	CH ₃	13.3	0.94, д (6.6)
36	CH ₃	8.2	1.05, д (7.3)	CH ₃	11.0	1.13, д (6.9)
37	CH ₃	14.0	1.09, д (6.9)	CH ₃	14.2	1.14, д (7.1)
38	CH ₃	9.2	1.01, д (7.0)	CH ₃	14.4	1.14, д (6.9)
39	CH ₃	20.9	1.11, с	CH ₃	22.4	1.21, с
40	CH ₃	14.4	0.98, д (6.6)	CH ₃	14.8	0.97, д (6.9)
41	CH ₂	28.4	1.35, м; 1.25, м	CH ₂	32.6	1.29, м
42	CH ₃	12.0	0.80, т (7.4)	CH ₃	12.3	0.89, т (7.1)
43	CH ₃	6.0	0.82, д (6.9)	CH ₃	6.4	0.91, д (7.2)
44	CH ₃	11.7	0.95, д (6.6)	CH ₃	11.9	0.93, д (6.9)
45	CH ₃	11.1	0.88, д (6.9)	CH ₃	12.1	0.94, д (6.9)

Таблица 2. Активность олигомицина **А** (**1**) и пергидроолигомицина (**3**) в отношении *Candida spp.* и филаментозных грибов.

Производное	МИК, мкг/мл				
	<i>C. albicans</i> ATCC 24433	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>A. niger</i> 137a	<i>M. canis</i> B 200	<i>T. rubrum</i> 2002
Пергидроолигомицин (3)	16	1	32	>32	>32
Олигомицин А (1)	2–4	1–2	0.5	2–4	2–4
Флуконазол	4	4	32	>32	>32

Таблица 3. Активность олигомицина **А** (**1**) и пергидроолигомицина (**3**) в отношении клинических изолятов *Candida spp.*

Производное	МИК, мкг/мл					
	<i>C. utilis</i> 84	<i>C. tropicalis</i> 3019	<i>C. krusei</i> 432M	<i>C. glabrata</i> 61L	<i>C. albicans</i> 604M (R)	<i>C. albicans</i> 80 (R)
Пергидроолигомицин (3)	1–2	2	4–8	>32	>32	>32
Олигомицин А (1)	1	1	2	>32	32	16–32
Флуконазол	2	2	>32	32	>32	>32

олигомицином **1**. Антифунгальная активность изучена в отношении контрольных штаммов дрожжевых культур *Candida albicans* ATCC 24433, *C. parapsilosis* ATCC 22019, филаментозных грибов *Aspergillus niger* 137a, дерматофитов *Microsporum canis* B-200, *Trichophyton rubrum* 2002 (Таблица 2) и клинических изолятов *Candida spp.* (Таблица 3). При выборе штаммов учитывали чувствительность *Candida spp.* к противогрибковым препаратам. Так, *C. krusei* обладает природной устойчивостью к флуконазолу, применяемого для системного и местного лечения грибковых инфекций. Большинство клинических изолятов *C. albicans* чувствительны к флуконазолу, *C. tropicalis* занимает промежуточное положение, а 15 % изолятов *C. glabrata* устойчивы к флуконазолу.

Результаты исследования противогрибкового спектра выявили полную потерю активности пергидроолигомицина **3** в отношении *A. niger* и других микромицетов, в то время как активность в отношении штаммов *Candida spp.* сохраняется (Таблицы 2, 3). Стоит отметить, что олигомицины **1** и **3** проявили активность в отношении резистентного штамма *C. krusei* (Таблица 3). Устойчивые к действию флуконазола клинические изоляты *C. glabrata* и *C. albicans* обладают перекрестной резистентностью как к исходному олигомицину **А** (**1**), так и к его производному **3** (Таблица 3).

Антиактиномикозная активность 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицина (**3**) была изучена на актинобактерии *Streptomyces fradiae* ATCC-19069 (штамм, сверхчувствительный к олигомицину **А** и его производным и являющийся патогеном, вызывающим актиномикозы) на разработанной ранее тест-системе.^[13] Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидрирование кратных связей олигомицина приводит к потере антиактиномикозной активности (Таблица 4).

Таблица 4. Активность олигомицина **А** (**1**) и пергидроолигомицина (**3**) в отношении *S. fradiae* ATCC-19069.

Производное	МИС, нмоль/мл
Пергидроолигомицин (3)	>10
Олигомицин А (1)	0.5

Антипролиферативная активность олигомицинов **1** и **3** была изучена на клетках хронической миелоидной лейкемии человека К-562 и на клетках аденокарциномы кишечника НСТ-116. Сравнение ингибирующих концентраций (IC_{50}) олигомицина **А** (**1**) и его аналога (**3**) показывает, что восстановление двойных связей приводит к снижению цитотоксичности в несколько раз (Таблица 5).

Таблица 5. Цитотоксичность олигомицина **А** (**1**) и пергидроолигомицина (**3**) в отношении линии клеток К-562 и НСТ-116.

Производное	IC_{50} , мкМ	
	К-562	НСТ-116
Пергидроолигомицин (3)	1.7±0.2	3.3±0.2
Олигомицин А (1)	0.20±0.03	0.9±0.1

Обобщая результаты тестирования биологических свойств, можно сделать вывод, что гидрирование двойных связей макролактонового цикла олигомицина **А** вызывает снижение активности, как в отношении актинобактерий, так и клеток грибов и млекопитающих. Низкая активность производного **3** может быть связана с потерей конформационной жёсткости и изменением оптимальной для взаимодействия с мишенью (F_0F_1 -АТФ-синтазой) геометрии макроцикла, вызванными разрушением диеновой системы исходного антибиотика **1**. Поэтому мы провели сравнительное исследование взаимодействия олигомицина **1** и его производного **3** методом молекулярного моделирования, с использованием программы ICM-Pro 3.8.

Докирование проводилось на поверхности F_0 субъединицы АТФ-синтазы в области связывания олигомицина **А** с использованием кристаллической структуры с разрешением 1.5 Å, взятой из PDB (4f4s). Сравнение геометрии расположения лучшей по энергии связывания конформации олигомицина **А** (**1**), полученной в результате докинга с кристаллографическими данными (PDB: 4f4s^[19]), показывает почти полное совпадение структуры комплексов (Рисунок Д16, см. Дополнительные матери-

алы). Эти результаты указывают на то, что используемая программа и параметры, выбранные для процедуры докинга, хорошо подходят для моделирования связывания олигомицина A с исследуемой мишенью, а значит пригодны для прогнозирования взаимодействия его производных.

Сравнительный анализ геометрии расположения, (Рисунки 2А,В и Д.17), а также данные об энергии связывания (ΔG_{bind}) олигомицина A (1) и 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицина A (3) и на поверхности F_0 -субъединицы АТФ-синтазы (Таблица 6), полученные в результате докинга, показывают, что основной вклад в энергию связывания обоих лигандов вносит гидрофобная составляющая. Кулоновский вклад для обоих антибиотиков перекрывается энергией сольватации, однако стоит отметить, что гидрирование макроцикла олигомицина A приводит к увеличению значения кулоновского вклада в энергию связывания.

Количество аминокислот, расположенных на расстоянии 3 Å от лиганда (Рисунки 2С,Д) для олигомицина 1 почти в два раза выше, чем для прегидропроизводного 3. Область, в которой происходит взаимодействие антибиотиков с мишенью, состоит преимущественно из остатков гидрофобных аминокислот (Рисунок 2), поэто-

му Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия при комплексообразовании олигомицина A (1) с F_0 -субъединицей АТФ-синтазы существенно выше, чем в случае связывания с мишенью его производного 3. Гидрирование двойных связей олигомицина A (1) приводит к значительному увеличению конформационной ёмкости производного 3. Поскольку при связывании обоих антибиотиков с F_0 -субъединицей АТФ-синтазы происходит соприкосновение большей части их структуры с поверхностью мишени, комплексообразование ведёт к уменьшению энтропии за счёт потери конформационной подвижности в силу возникающего ограничения вращения вокруг двугранных углов, образованных атомами, входящих в контакт с мишенью. Как следствие, потеря энтропии в случае связывания производного 3 с мишенью значительно превосходит снижение энтропии в случае связывания исходного олигомицина A (1), что подтверждается значениями изменения энтропии (Таблица 6).

Таким образом, результаты моделирования взаимодействия с внутриклеточной мишенью, свидетельствующие о существенном снижении энергии связывания пергидроолигомицина 3 (по сравнению с олигомицином 1), согласуются со снижением активности производного 3 в отношении большинства тест-культур.

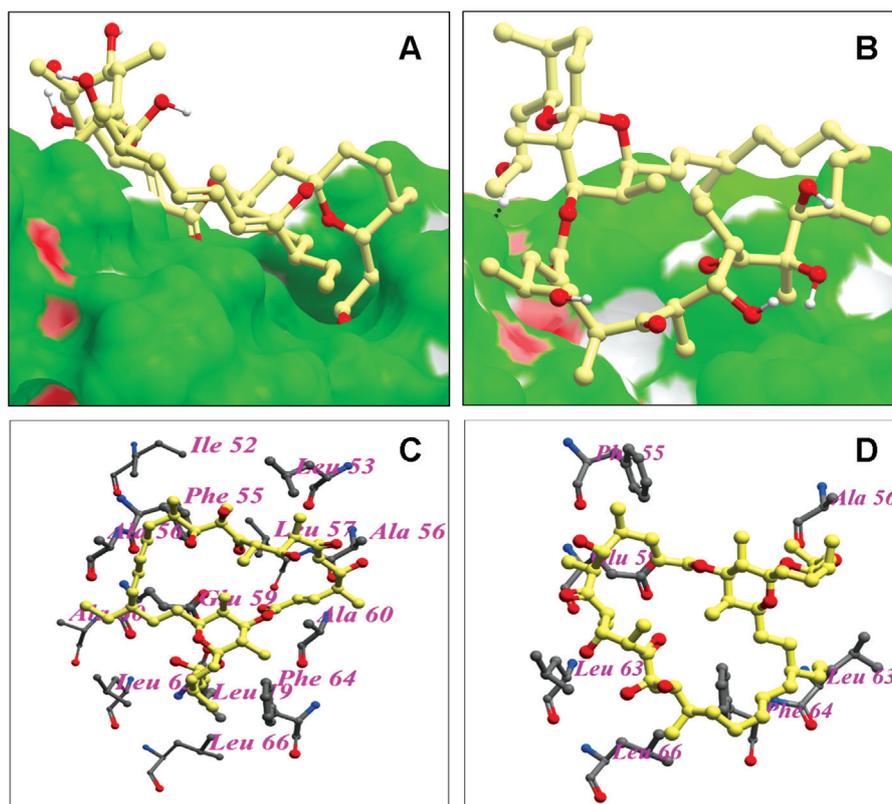


Рисунок 2. Структура комплексов олигомицина 1 (А, С), пергидроолигомицина 3 (В, Д) и F_0 -субъединицы АТФ-синтазы (PDB: 4f4s), полученных в результате докинга с помощью ICM-Pro.

А, В: Локализация лучших по энергии связывания конформаций антибиотиков 1 и 3 на поверхности мишени. Рендеринг моделей: атомы углерода лигандов окрашены жёлтым цветом, атомы кислорода – красным; на поверхности АТФ-синтазы гидрофобные области окрашены в зелёный цвет, доноры водородных связей – в голубой, а акцепторы – в красный цвет; водородные связи лигандов с мишенью выделены пунктирной чёрной линией.

С, Д: Аминокислотные остатки F_0 -субъединицы АТФ-синтазы, расположенные на расстоянии 3 Å от лучших по энергии связывания конформаций соединений 1 и 3. Рендеринг моделей лигандов и аминокислот: атомы углерода окрашены в жёлтый цвет (у лигандов) и тёмно-серый (у мишени), атомы кислорода – в красный, атомы азота – в синий.

Таблица 6. Значения энергии связывания (ΔG_{bind} , ккал/моль) с АТФ-синтазой и вкладов, её формирующих, для лучших по энергии связывания конформаций олигомицина **А** (**1**) и 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицина **А** (**3**), полученных в результате докинга с помощью ICM-Pro (Рисунок 2).

Соединение	ΔG_{bind}	ΔG_{eq}	ΔG_{solv}	ΔG_{vdw}	ΔG_{hbond}	$-T\Delta S$	ΔU
1	-22.1	-1.5	1.9	-33.8	0	10.5	0.8
3	-5.6	-5.6	6.7	-20.4	-1.26	13.4	1.4

Заключение

Изучено каталитическое восстановление олигомицина **А** (**1**) и получено новое производное – пергидроолигомицин **3**. Восстановление двойных С-С связей приводит к существенному изменению спектра биологического действия олигомицина. В целом, для пергидроолигомицина **3** наблюдается значительное снижение (по сравнению с исходным антибиотиком **1**) антиактиномикозной и противогрибковой активности, а также цитотоксичности для клеток млекопитающих. Однако для нового производного **3** характерна специфическая активность в отношении некоторых штаммов дрожжевых грибов рода *Candida*, которая в отдельных случаях превосходит препарат сравнения флуконазол. Несмотря на то, что антифунгальная активность пергидроолигомицина **3** несколько снижена в отношении *Candida spp.* по сравнению с исходным антибиотиком **1**, проведенная модификация макроцикла повышает избирательность действия на *Candida spp.* при одновременном снижении высокой цитотоксичности, характерной для олигомицина **А**.

Снижение активности пергидроолигомицина **3** в отношении большинства тест-культур хорошо коррелирует с результатами компьютерного моделирования взаимодействия антибиотиков с мишенью – F_0 -субъединицей АТФ-синтазы. Сохранение активности пергидропроизводного **3** в отношении *Candida spp.*, по-видимому, объясняется различием в структуре F_0 -субъединицы или наличием дополнительных мишеней в клетках дрожжей этого рода.

Существенное изменение спектра биологических свойств пергидропроизводного **3** свидетельствует о перспективности дальнейшего поиска селективных методов восстановления олигомицина **А** (**1**) для модулирования биологической активности производных и исследования связи структура-активность в ряду олигомицинов.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 15-15-00141).

Список литературы

References

- Smith R.M., Peterson W.H., McCoy E. *Antibiot. Chemother.* **1954**, 4, 962–970.
- Bibikova M.V., Grammatikova N.E., Kabanov A.E. et al. *Antibiotiki Khimioterapiya* **2003**, 48, 33–39 (in Russ.).
- Jonckere A.L., Speitink J.A.M., Rodenburg R.J.T. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2012**, 35, 211–225.
- Lysenkova L.N., Turchin K.F., Korolev A.M. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 2918–2924.
- Lysenkova L.N., Godovikov I.A., Korolev A.M. et al. *Macroheterocycles* **2015**, 8, 424–428.
- Lysenkova L.N., Saveljev O.Y., Korolev A.M. *Macroheterocycles* **2016**, 9, 307–313.
- Lysenkova L.N., Turchin K.F., Danilenko V.N. et al. *J. Antibiot.* **2010**, 63, 17–22.
- Lysenkova L.N., Turchin K.F., Korolev A.M. et al. *J. Antibiot.* **2012**, 65, 223–225.
- Park J.W., Park S.R., Han A.R. et al. *J. Antibiot.* **2011**, 64, 155–157.
- State Standard of Russian Federation (GOST ISO 16256-2015). Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems. Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against yeast fungi involved in infectious diseases.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. **2008**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd ed., M27-A3.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. **2008**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, 2nd ed., M38-A2.
- Alekseeva M.G., Elizarov S.M., Bekker O.B. et al. *Biochemistry (Moscow) Suppl. A Membr. Cell. Biol.* **2009**, 3–16.
- Abagyan R., Totrov M., Kuznetsov D. *J. Comput. Chem.* **1994**, 15(5), 488–506.
- Arnautova Y.A., Jagielska A., Scheraga H.A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 5025–5044.
- Halgren T.A. *J. Comput. Chem.* **1996**, 490–519.
- Totrov M., Abagyan R. Protein-Ligand Docking as an Energy Optimization Problem. In: *Drug-Receptor Thermodynamics: Introduction and Applications* (Raffa R.B., Ed.), John Wiley & Sons, Ltd., **2001**. p. 603–624.
- Wesson L., Eisenberg D. *Protein Sci.* **1992**, 1, 227–235.
- Symersky J., Osowski D., Walters D.E. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 13961–13965.

Received 30.09.2016

Accepted 21.11.2016