

## Синтез и биологические свойства 16,17–дигидро– 16(S),17(R)–дигидрокси–16,33–O,O–диформилолигомицина А и 33–O–формилолигомицина А

О. А. Омельчук,<sup>a,b@1</sup> Н. М. Белов,<sup>a</sup> В. Б. Цветков,<sup>c,d</sup> А. М. Королев,<sup>a</sup>  
Л. Г. Деженкова,<sup>a</sup> Н. Э. Грамматикова,<sup>a,e</sup> Л. Н. Лысенкова,<sup>a</sup> О. Б. Беккер,<sup>f</sup>  
В. Н. Даниленко,<sup>f</sup> А. Е. Щекотихин<sup>a,b@2</sup>

Посвящается академику РАН Ирине Петровне Белецкой по случаю ее юбилея

<sup>a</sup>Институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, 119021 Москва, Российская Федерация.

<sup>b</sup>Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, 125047 Москва, Российская Федерация

<sup>c</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, 119435 Москва, Российская Федерация

<sup>d</sup>Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376 Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>e</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, 119991 Москва, Российская Федерация

<sup>f</sup>Институт общей генетики Российской академии наук имени Н.И. Вавилова, 119333 Москва, Российская Федерация

@<sup>1</sup>E-mail: [omelchuk.93@mail.ru](mailto:omelchuk.93@mail.ru)

@<sup>2</sup>E-mail: [shchekotikhin@mail.ru](mailto:shchekotikhin@mail.ru)

Описаны синтез и свойства новых полусинтетических производных макролидного антибиотика олигомицина А (1) – 16,17-дигидро-16(S),17(R)-дигидрокси-16,33-O,O-диформилолигомицина А (3) и 33-O-формилолигомицина А (4). Производное 3 получено эпексидированием олигомицина А (1) по реакции Прилежаева с последующей обработкой муравьиной кислотой, а производное 4 – этерификацией исходного антибиотика 1 муравьиной кислотой. Строение соединений 3, 4 доказано методами масс-спектрометрии высокого разрешения и спектроскопией ядерного магнитного резонанса. Сравнительное исследование биологических свойств олигомицина А и его полусинтетических производных 3, 4 показывает, что модификация диеновой системы олигомицина А снижает противогрибковые и цитотоксические свойства исходного антибиотика. 33-O-Формилолигомицин А сохраняет высокую антипролиферативную активность в отношении опухолевых клеток, тогда как активность в отношении нормальных клеток человека и остальных тест-культур снижена. Методами компьютерного моделирования проведено исследование комплексообразования при взаимодействии антибиотиков 1, 3, 4 с мишенью – F<sub>0</sub> субъединицей АТФ-синтазы, результаты которого согласуются с данными биологического скрининга.

**Ключевые слова:** Олигомицин А, формилпроизводные олигомицина А, полусинтетический антибиотик, противогрибковая активность, антиактиномикозная активность, антипролиферативная активность, ингибитор АТФ-синтазы, молекулярный докинг.

## Synthesis and Biological Activity of 16,33–O,O–Diformyl–16,17–dihydro–16(S),17(R)–dihydroxyoligomycin A and 33–O–Formyloligomycin A

Olga A. Omelchuk,<sup>a,b@1</sup> Nikita M. Belov,<sup>a</sup> Vladimir B. Tsvetkov,<sup>c,d</sup> Alexander M. Korolev,<sup>a</sup> Lyubov G. Dezhenkova,<sup>a</sup> Natalia E. Grammatikova,<sup>a,e</sup> Lyudmila N. Lysenkova,<sup>a</sup> Olga B. Bekker,<sup>f</sup> Valery N. Danilenko,<sup>f</sup> and Andrey E. Shchekotikhin<sup>a,b@2</sup>

<sup>a</sup>G.F Gause Institute of New Antibiotics, 119021 Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup>D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 125047 Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup>Institute for Physical-Chemical Medicine, 119435 Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup>Research Institute of Influenza, 197376 St. Petersburg, Russian Federation

<sup>e</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russian Federation

<sup>f</sup>N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russian Federation

@<sup>1</sup>Corresponding author E-mail: omelchuk.93@mail.ru

@<sup>2</sup>Corresponding author E-mail: shchekotikhin@mail.ru

The macrolide antibiotic oligomycin A (**1**), produced by actinomycetes *Streptomyces*,<sup>[1]</sup> is a well-known inhibitor of  $F_0F_1$  ATP-synthase, which is regarded as a molecular target for new drugs in the treatment of tumors and infections. Oligomycin A (**1**) exhibits antifungal and cytotoxic activities, but Gram-negative and Gram-positive bacteria are resistant to **1** except actinobacteria.<sup>[2]</sup> In micromolar concentrations, oligomycin binds to  $F_0$  c-subunit, blocks proton translocation and disrupts bioenergetic metabolism.<sup>[3]</sup> However, a clinical application of oligomycin A is limited by high cytotoxicity for mammalian cells. The searches of new derivatives of oligomycin A with more selective pharmacological activity and low toxicity for normal cells are of great interest. New semi-synthetic oligomycins also would be valuable for SAR studies and depicting the mechanism of  $F_0F_1$  ATP-synthase inhibition. The complicity of oligomycin structure and its lability in basic conditions<sup>[4]</sup> significantly impede modifications and an applicability of this antibiotic. However, previously we have managed this challenge and developed some modifications of the side chain and chemical transformations of the lactone moiety of **1**.<sup>[4-9]</sup> In this paper, throughout our research we describe synthesis and biological investigation of novel oligomycin A derivatives, namely 16,33-O,O-diformyl-16,17-dihydro-16(S),17(R)-dihydroxyoligomycin A (**3**) and 33-O-formyloligomycin A (**4**). First, we have studied Prilezhaev epoxidation of double bonds in core structure of oligomycin A. It was found that treatment **1** with *m*-CPBA at  $-17^\circ\text{C}$  in dichloromethane led to 16,17-epoxyoligomycin (**2**). Unfortunately, all attempts for isolation of product **2** were failed due to its instability on silica gel, and, consequently, we were unable to determine the structure of **2** by direct physicochemical and spectral methods. The presence of epoxide at C16-C19 positions was confirmed by tandem mass spectrometry, but its exact localization was still elusive. We assumed that it might be at C16-C17 positions, because C18-C19 double bond is hindered by ethyl side chain at C20. In order to obtain a stable oligomycin A derivative we performed an epoxide ring-opening reaction by the treatment of the crude epoxyoligomycin **2** with formic acid. This acid-catalyzed opening of the epoxide accompanied with acylation of 33-OH group and led to 16,33-O,O-diformyl-16,17-dihydro-16(S),17(R)-dihydroxyoligomycin A (**3**). The structure of **3** was confirmed by NMR spectroscopy and high resolution mass spectrometry. Configurations at C16 and C17 positions were determined by detecting correlations in  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY spectrum. Obtained results allowed to confirm an assumption about localization of the epoxide ring and establish the structure of **2** as (R,R)-16,17-epoxyoligomycin A, since inversion of configuration has taken place at the attacked carbon atom.<sup>[23]</sup> It is known that O-acyl derivatives of pharmacologically active agents are widely used as prodrugs.<sup>[24]</sup> Acylation of 2-hydroxypropyl side chain in **2** prompts us to examine the reaction of oligomycin A (**1**) with formic acid. Thus, stirring the solution of **1** in HCOOH (98 %) for 2 h at room temperature afforded 33-O-formyloligomycin A (**4**) in a good yield. The structure of **4** was confirmed by NMR-spectroscopy and high resolution mass spectrometry. Also, biological data of new derivatives were evaluated. The modification of C16-C17 positions of the macrocycle as well as acylation of C33 hydroxyl group led to the decreasing of activity against *S. fradiae*, *Candida* spp. and filamentous fungi. Obtained results were in agreement with docking studies. A simulation of an interaction of **1**, **3** and **4** with the  $F_0$  subunit of the ATP-synthase (PDB: 4f4s) revealed that these modifications led to a significant change in the solvation energy and an increase in the conformational capacity of the ligands during the binding with the target. This resulted in decrease of the binding affinity for derivatives **2**, **3**. However, 33-O-formyloligomycin A (**4**) showed similar antiproliferative activity against tumor cell lines (HCT-116 colon carcinoma, K562 myeloid leukemia cell lines and MDR K562/4 subline) as for **1**, but less cytotoxic for non-malignant human cells.

**Keywords:** Oligomycin A, formyl derivatives of oligomycin A, semi-synthetic antibiotics, antifungal activity, anti-actinomycotic activity, antiproliferative activity, ATPase inhibitor, molecular docking.

## Введение

Макролидный антибиотик олигомицин А (**1**), продуцируемый актиномицетами рода *Streptomyces*,<sup>[1]</sup> является высокоактивным ингибитором F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФазы. Его структура представляет собой высокозамещенный 26-членный α,β-ненасыщенный лактон, сочлененный с бициклической спирокетальной структурой, содержащей боковую гидроксипропильную цепь. Олигомицин А обладает выраженными противогрибковыми, антиактиномикозными и цитотоксическими свойствами, однако грамотрицательные и грамположительные бактерии, за исключением актиномицетов, устойчивы к его действию.<sup>[2]</sup> Связываясь с F<sub>0</sub> субъединицей АТФазы, олигомицин А блокирует работу OSCP (the oligomycin sensitivity conferring protein), что приводит к нарушению окислительного фосфорилирования и других процессов энергетического обмена.<sup>[3]</sup>

В настоящее время АТФ-синтаза рассматривается в качестве перспективной биологической мишени для разработки препаратов нового поколения для терапии онкологических и инфекционных заболеваний. Однако практическое применение олигомицина А ограничено его высокой токсичностью для клеток млекопитающих. Одним из возможных способов оптимизации фармакологических свойств олигомицина А является химическая модификация фармакофорных элементов его структуры. Следовательно, для поиска новых менее токсичных и более активных кандидатов необходимо исследование химических свойств олигомицина А и биологический скрининг его новых производных. Полусинтетические олигомицины также необходимы для выявления связи структура-активность и деталей механизма биологической активности антибиотиков этого ряда.

Высокая лабильность олигомицина А в щелочной среде и наличие большого количества функциональных групп значительно затрудняют разработку методов его химической трансформации. Несмотря на сложность задачи, к настоящему времени разработан ряд модификаций макролактонного кольца<sup>[4,5]</sup> и гидроксипропильного фрагмента.<sup>[6-9]</sup> Тестирование биологических свойств полученных производных свидетельствует о значительном влиянии заместителя в 33 положении боковой цепи и двойных С–С связей макроцикла на активность олигомицина А. В продолжение работ по поиску методов химической модификации олигомицина А, нами исследованы возможности окисления диеновой системы в 16-19 положении антибиотика по реакции Прилежаева, найден селективный способ формилирования гидроксильной группы в 33 положении и проведены исследования физико-химических и биологических свойств новых производных.

## Экспериментальная часть

### Химическая часть

Олигомицин А (чистота 95 %), продуцируемый штаммом *Streptomyces avermitilis* NIC B62, получен в автономном

некоммерческом исследовательском центре БИОАН (Москва, Российская Федерация). Реагенты и растворители производства Sigma-Aldrich. Для аналитической ТСХ использовались алюминиевые пластинки с закрепленным слоем силикагеля F<sub>254</sub> толщиной 0.2 мм (Merck); для колоночной хроматографии использовался силикагель 60 (Merck). Соединения обнаруживали в УФ-свете (254 нм), проявляли на ТСХ пластинах при нагревании 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 230 нм. Элюирование проводили в течение 40 мин системой MeCN–H<sub>2</sub>O: 10 мин – градиентный режим (содержание MeCN 80 → 95 %), 30 мин – изократический режим (содержание MeCN – 95 %), скорость потока – 1 мл/мин. Чистоту соединений определяли по площади пиков, используя метод внутренней нормализации.

Спектры ЯМР (Рисунки Д1–Д23, см. Дополнительные материалы) регистрировались на спектрометре «Avance III» фирмы «Bruker» с резонансной частотой на ядрах <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C 600 и 150 MHz, соответственно. В качестве растворителя использовали дейтерированный метанол и дейтерохлороформ фирмы «Merck». Химические сдвиги ядер измеряли при 25 °С, используя в качестве внутреннего стандарта остаточные сигналы протонов растворителя (остаточные сигналы метанола – 3.31 м.д. для <sup>1</sup>H и 49.2 м.д. для <sup>13</sup>C и остаточные сигналы хлороформа – 7.27 м.д. для <sup>1</sup>H и 77.0 м.д. для <sup>13</sup>C).

Масс-спектры высокого разрешения ESI (Рисунки Д24–Д30, Дополнительные материалы) регистрировали на приборе «micrOTOF-Q II» («Bruker Daltonics GmbH», Германия). Растворы образцов (0.1 мг/мл в смеси CHCl<sub>3</sub> и EtOH или в смеси MeCN и H<sub>2</sub>O) 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 соединений **3** и **4** 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 спектры (Рисунки Д31, Д32, Дополнительные материалы) регистрировали с использованием ИК-Фурье спектрометра Nicolet-iS10 (детектор DTGS, светоделиитель KBr) с приставкой Smart Performer, оснащенной ZnSe кристаллом (Nicolet, Madison, WI, USA). Измерение проводили при разрешении 4 см<sup>-1</sup>; зона спектра 4000–650 см<sup>-1</sup>. Спектр обрабатывали с использованием программы OMNIC-7.0. УФ-спектр регистрировали на двухлучевом спектрофотометре UNICO-2804 (UNICO, Dayton, NJ, USA).

*Синтез 16,17-дигидро-16(S),17(R)-дигидрокси-16,33-O,O-диформилолигомицина А (3).* Раствор олигомицина А (100 мг, 0.13 ммоль) в хлористом метиле (10 мл) охлаждают до –17 °С, прибавляют *m*-хлорнадбензойную кислоту (38 мг, 0.22 ммоль) и выдерживают 40 ч при –17 °С. Реакционную смесь выливают в воду (20 мл) и экстрагируют продукт хлороформом (2×30 мл), промывают последовательно раствором гидрокарбоната натрия и водой до pH 7. Экстракт сушат безводным сульфатом натрия, фильтруют и упаривают. Полученный неочищенный эпоксид **2** растворяют в муравьиной

кислоте (6 мл) и перемешивают 2 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляют водой и экстрагируют продукт этилацетатом (2×30 мл), промывают последовательно раствором (1 %-м) гидрокарбоната натрия и водой до нейтральной реакции. Экстракт сушат безводным сульфатом натрия, фильтруют и упаривают. Остаток очищают колоночной хроматографией (хлороформ:метанол, 10:0.1→10:0.3; гексан:ацетон, 10:3→10:4.5). Выход производного **3** – 23 мг (20 %). Аморфный порошок белого цвета.  $m/z$  (ESI) Найдено: 897.5224 (100 %)  $[M+H_2O-H]^+$ .  $C_{47}H_{77}O_{16}$ . Вычислено: 897.5217. ИК (пленка)  $\nu_{\max}$   $cm^{-1}$ : 3372 с, 2975 с, 2929 с, 2876 с, 1714 с, 1643 с, 1456 с, 1381 с, 1277 с, 1190 с, 1087 с, 1044 с, 984 с, 879 с. УФ (метанол)  $\lambda_{\max}$  (lgε) нм: 215 (1.0). ВЭЖХ  $R_f$  14.3, чистота 95 %.

**Синтез 33-О-формилолигомицина А (4).** Олигомицин А (100 мг, 0.13 ммоль) растворяют в муравьиной кислоте (8 мл) и перемешивают при комнатной температуре 2 ч. Протекание реакции контролируют методом ТСХ (элюирующая система – хлороформ:метанол 10:0.5). Реакционную массу разбавляют водой и экстрагируют продукт этилацетатом (2×30 мл), промывают последовательно раствором (1%-м) гидрокарбоната натрия и водой до нейтральной реакции. Экстракт сушат безводным сульфатом натрия, фильтруют и упаривают. Остаток очищают колоночной хроматографией (хлороформ:метанол, 10:0.1→10:0.3). Выход производного **4** – 61 мг (57 %). Аморфный порошок белого цвета.  $m/z$  (ESI) Найдено: 841.5110 (100 %)  $[M+Na]^+$ .  $C_{46}H_{74}O_{12}Na$ . Вычислено: 841.5072. ИК (пленка)  $\nu_{\max}$   $cm^{-1}$ : 3346 с, 2974 с, 2878 с, 1703 с, 1641 с, 1455 с, 1379 с, 1327 с, 1274 с, 1088 с, 1045 с, 986 с, 880 с, 804 с. УФ (метанол)  $\lambda_{\max}$  (lgε) нм: 220 (2.5), 225 (2.5), 235 (2.5), 243 (2.3). ВЭЖХ  $R_f$  16.69, чистота 97 %.

## Биологическая часть

### Методика определения антифунгальной активности

Оценку активности исследуемых образцов проводили в соответствии со стандартом<sup>[10]</sup> и рекомендациями.<sup>[11,12]</sup> 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, филаментозных грибов *A. niger* 137a и дерматофитов *M. canis* B-200, *T. rubrum* 2002.

Для получения основных растворов изучаемых образцов **1**, **3** и **4** 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* готовили в среде RPMI с 0.2 % глюкозой по стандарту мутности 0.5 McFarland (~5·10<sup>6</sup> КОЕ/мл для дрожжевых культур), оценивали денситометрически (Densimat, Biomerieux), разводили 1:1000 до ~5·10<sup>3</sup> 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. Под-

счет конидий и спор осуществляли с использованием камеры Горяева. Каждый инокулят доводили до рабочего титра в среде RPMI. В результате получали суспензию, содержащую 1.5–3.2·10<sup>4</sup> 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 повторностях.

Для соблюдения точности процедуры определения значений минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в качестве внутреннего стандарта использовали флуконазол (Синерджин Эктив Инградисентс (Пи) ЛТД), диапазон активности которого в отношении эталонного штамма *Candida parapsilosis* ATCC 22019 составляет 1–4 мкг/мл.<sup>[11]</sup> 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 препаратов. 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 проводили в отношении актинобактерии *S. fradiae* ATCC-19069. Определение антибактериальной активности осуществляли методом наложения дисков, сущность которого заключалась в определении зоны подавления роста штамма, засеянного газоном на агаризованной среде, вокруг бумажных дисков, содержащих олигомицин А (**1**) (контроль) или его производные **3** и **4** в различных концентрациях. Для приготовления газона спорую суспензию, полученную путем смыва с агаризованной полноценной среды и пропущенную через ватный фильтр, смешивали с агаризованной средой МГ<sup>[13]</sup> (0.7 % агара) при pH 7.5 в соотношении 1:10<sup>7</sup> спор на чашку Петри и засеивали чашки с агаризованной средой МГ (2.0 % агара). После застывания агаризованной споровой суспензии на чашки наносили стандартные бумажные (Whatman ЗММ) диски диаметром 6 мм, пропитанные 10 мкл раствора с различной концентрацией тестируемых соединений. Выращивание газона производили в течение 24 часов при +28 °С. Среда МГ следующего состава: 0.5 % мальтэкстракта (Sigma), 0.4 % дрожжевого экстракта (Difco), 0.05 % NaCl, 0.05 % MgSO<sub>4</sub>, 0.05 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0001 % FeSO<sub>4</sub>, 0.1 % KNO<sub>3</sub>, 2 % глюкозы, pH 7.5. Все эксперименты проводили в трех повторностях. МИК, нмоль/диск, определяли как минимальную концентрацию вещества на диске, при которой происходило образование гало 8±1 мм.

### Методика определения антипролиферативной активности

Цитотоксичность определяли в МТТ-тесте в отношении клеток хронической миелоидной лейкемии человека K-562, резистентной сублинии K562/4, аденокарциномы кишечника HCT-116 и первичных фибробластов человека. Готовили 10 мМ раствор тестируемых соединений **1**, **3** и **4** в ДМСО, затем осуществляли серию разведений водой непосредственно перед экспериментом. Клетки (5·10<sup>3</sup> в 190 мкл 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 повтор-

ностях. По окончании воздействия соединений в каждую лунку добавляли 50 мкг бромиды 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 определяли как процентное отношение величины поглощения в лунке с тестируемым соединением к величине поглощения в контрольной лунке (100 %). Величина полуингибирующей концентрации ( $IC_{50}$ ) была определена как концентрация соединения, при которой конверсия МТТ ингибируется на 50 %.

#### Молекулярный докинг

При моделировании комплексообразования олигомицина **1** и его производных **3**, **4** с  $F_o$  субъединицей АТФазы (PDB: 4f4s) 3D модель мишени, параметры для процедуры докинга, а также методика оценки энергии связывания использовались те же, что и в ранних работах.<sup>[5,9]</sup>

### Результаты и их обсуждение

Реакции окисления являются одним из важнейших методов трансформации в медицинской химии.<sup>[14]</sup> Особый интерес методы окисления представляют для поиска путей химической модификации природных биологически активных соединений. Так, реакции эпоксилирования двойных связей применялись для модификации макролидных антибиотиков, таких как бафиломицин  $B_1$ ,<sup>[15]</sup> авермектин  $B_1$ ,<sup>[16]</sup> милбемицин.<sup>[17]</sup> При исследовании физико-химических и биологических свойств 8,9-эпоксиавермектина  $B_1$  было обнаружено, что эпоксилирование двойной С–С связи повышает фотостабильность антибиотика и практически не оказывает влияния на его активность.<sup>[18]</sup> В ходе работ по изучению химических свойств олигомицина **1** и получению его новых полусинтетических производных для исследования связи структура-активность<sup>[4-9]</sup> и установления их внутриклеточных мишеней,<sup>[19]</sup> были предприняты поиски селективных методов окисления, в результате которых была выявлена высокая лабильность данного антибиотика к действию ряда окислителей ( $CrO_3$ , периодидан Десса-Мартина, ДМСО/оксалилхлорид).<sup>[9]</sup> Модификация гидроксильной группы в 33 положении в кетогруппу была реализована путем окисления по Корнблему 33-*O*-мезилолигомицина **1** до 33-дегидроолигомицина **1**.<sup>[9]</sup>

Продолжая поиск методов окисления для получения полусинтетических производных олигомицина **1**, в настоящей работе впервые показаны возможности реакции Прилежаева для эпоксилирования двойных С–С связей этого антибиотика. Взаимодействие олигомицина **1** с *m*-хлорпероксибензойной кислотой (*m*-CPBA) в хлористом метиле при комнатной температуре протекает с низкой избирательностью, приводя к трудноразделимой смеси продуктов окисления. Однако снижение температуры реакции до  $-17^\circ C$  позволяет провести эпоксилирование олигомицина более селективно по одной из двойных С–С связей (Схема 1). С учетом стерических препятствий, наиболее вероятно окисление протекает по 16, 17 положениям олигомицина **1**, так как С18–С19 двойная связь экранирована вторичной алкильной группой в положении 20. Кроме того, описанное ранее бромирование олигомицина **1** также протекает по положениям 16, 17,<sup>[4]</sup> что свидетельствует о большей доступности и реакционной способности С16–С17 двойной связи олигомицина **1** по сравнению с сопряженной с ней С18–С19 связью. Контроль протекания реакции методом ТСХ ( $CHCl_3$ –MeOH 10:0.5) показывает, что в реакции образуется преимущественно один продукт окисления **2** ( $R_f$  0.51) с небольшим количеством неидентифицированных примесей.

При выделении индивидуального 16,17-эпоксиолигомицина **2** было обнаружено, что это соединение неустойчиво, как в условиях нормально-фазовой колоночной хроматографии, так и в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ, и в результате разложения приводит к трудноразделимой смеси продуктов. Соответственно, наработка и выделение соединения **2** в количествах и с чистотой, приемлемыми для проведения анализа структуры методами ЯМР-спектроскопии и изучения биологических свойств оказались невозможными. Наличие эпоксидного фрагмента в структуре **2** доказано методами масс-спектрометрии, в частности, тандемной масс-спектрометрией (МС/МС, CID) при низкой энергии квадруполя (20–90 эВ). Масс-спектр высокого разрешения содержал пик, соответствующий молекулярному иону эпоксилированного лактона **2** – 841.5294 [ $M+2H_2O-H$ ] (Рисунок Д24, Дополнительные материалы). При энергии соударений  $-30$ – $40$  эВ в масс-спектрах **2** преобладает ион  $m/z$  589 (Рисунки Д25, Д26), образующийся при отщеплении С6–С12 поликетидного

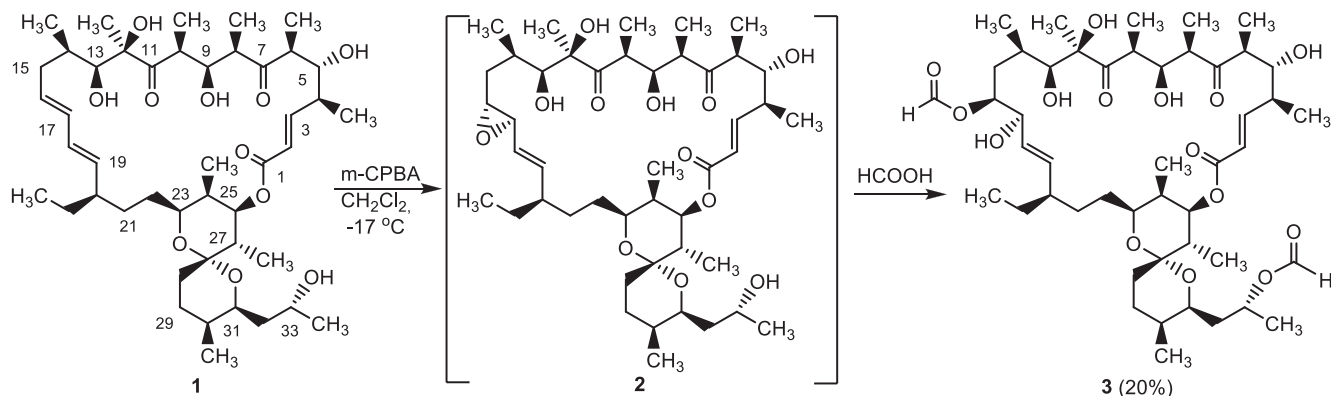


Схема 1. Синтез 16,17-дигидро-16(*S*),17(*S*)-дигидрокси-16,33-*O,O*-диформилолигомицина **3**).

фрагмента за счет ретроальдольного распада макроцикла. В этих условиях также наблюдается отщепление одной из концевых альдегидных групп (ион  $m/z$  561). При увеличении энергии соударений происходит разрыв сложноэфирной связи и элиминирование молекулы воды от 33 положения. Так, в масс-спектре наблюдаются ионы  $m/z$  479 и  $m/z$  461, подтверждающие наличие эпоксидной группы в положениях 16-19 (Рисунки Д.27, Д.28). Возможные структуры фрагментации иона **2** ( $m/z$  841) методом МС/МС изображены на Схеме 2.

Низкая устойчивость 16,17-эпоксиолигомицина А (**2**) обусловлена, по всей видимости, наличием в его структуре эпоксидного цикла. Поэтому, для установления его точного строения были проведены поиски эффективного способа раскрытия эпоксида и получения его стабильного производного. С учетом того, что макролактон олигомицина А (**1**) легко подвергается ретроальдольному расщеплению в основных условиях,<sup>[20]</sup> тогда как в кислой среде его макроцикл относительно устойчив, нами были исследованы возможности раскрытия эпоксидного цикла полученного производного **2** в кислой среде. Обнаружено, что сольволиз продукта **2** в муравьиной кислоте при комнатной температуре приводит не только к раскрытию эпоксидного цикла, но и сопровождается формилированием гидроксигруппы в положении 33, приводя к 16,17-дигидро-16(*S*),17(*R*)-дигидрокси-16,33-*O,O*-диформилолигомицину А (**3**) с умеренным выходом (Схема 1). Строение производного олигомицина **3** доказано методами ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS ESI).

Для 16,17-дигидро-16(*S*),17(*R*)-дигидрокси-16,33-*O,O*-диформилолигомицина А (**3**) зарегистрированы спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , а также корреляционные спектры ЯМР  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (Рисунки Д1-Д13). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  соединения **3** содержит 47 сигналов, из которых 11 соответствуют  $\text{CH}_3$ -группам, 7 –  $\text{CH}_2$ -группам, 22 –  $\text{CH}$ -группам (на основании анализа спектра  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  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  $\text{C}-\text{O}$ , 2-группе  $\text{HCOO}$  (на основании анализа спектра  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC). В спектрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  соединения **3** в 16, 17 положениях наблюдается смещение сигналов в сильное поле ( $\delta_{\text{C-16}}$  71.2 м.д.,  $\delta_{\text{C-17}}$  78.3 м.д.,  $\delta_{\text{H-16}}$  4.85 м.д.,  $\delta_{\text{H-17}}$  4.38 м.д.) по сравнению с исходным антибиотиком ( $\delta_{\text{C-16}}$  129.3 м.д.,  $\delta_{\text{C-17}}$  132.3 м.д.,  $\delta_{\text{H-16}}$  5.42 м.д.,  $\delta_{\text{H-17}}$  6.0 м.д.), а также появление сигналов в области слабого поля, соответствующих двум формильным группам ( $\delta_{\text{C}}$  160.6 м.д.,  $\delta_{\text{H}}$  8.11 м.д. ( $\text{HCOO}$  в положении 16),  $\delta_{\text{C}}$  160.4 м.д.,  $\delta_{\text{H}}$  8.04 м.д. ( $\text{HCOO}$  в положении 33)). Анализ спектра  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY показал пространственное сближение протонов  $\text{H}18-\text{H}16$ ,  $\text{H}19-\text{H}17$ ,  $\text{H}19-\text{H}16$ ,  $\text{H}17-\text{CH}_340$ ,  $\text{O}3\text{OH}16-\text{CH}_340$ , на основании чего было однозначно установлено расположение функциональных групп в положениях 16 и 17 продукта **3** и стереохимия его новых асимметрических центров – 16(*S*),17(*R*) (Рисунок 1).

Определение строения производного **3** позволило подтвердить сделанное ранее предположение о локализации эпоксидного цикла в 16, 17 положениях, а также установить его абсолютную конфигурацию. Согласно общему стереохимическому правилу рас-

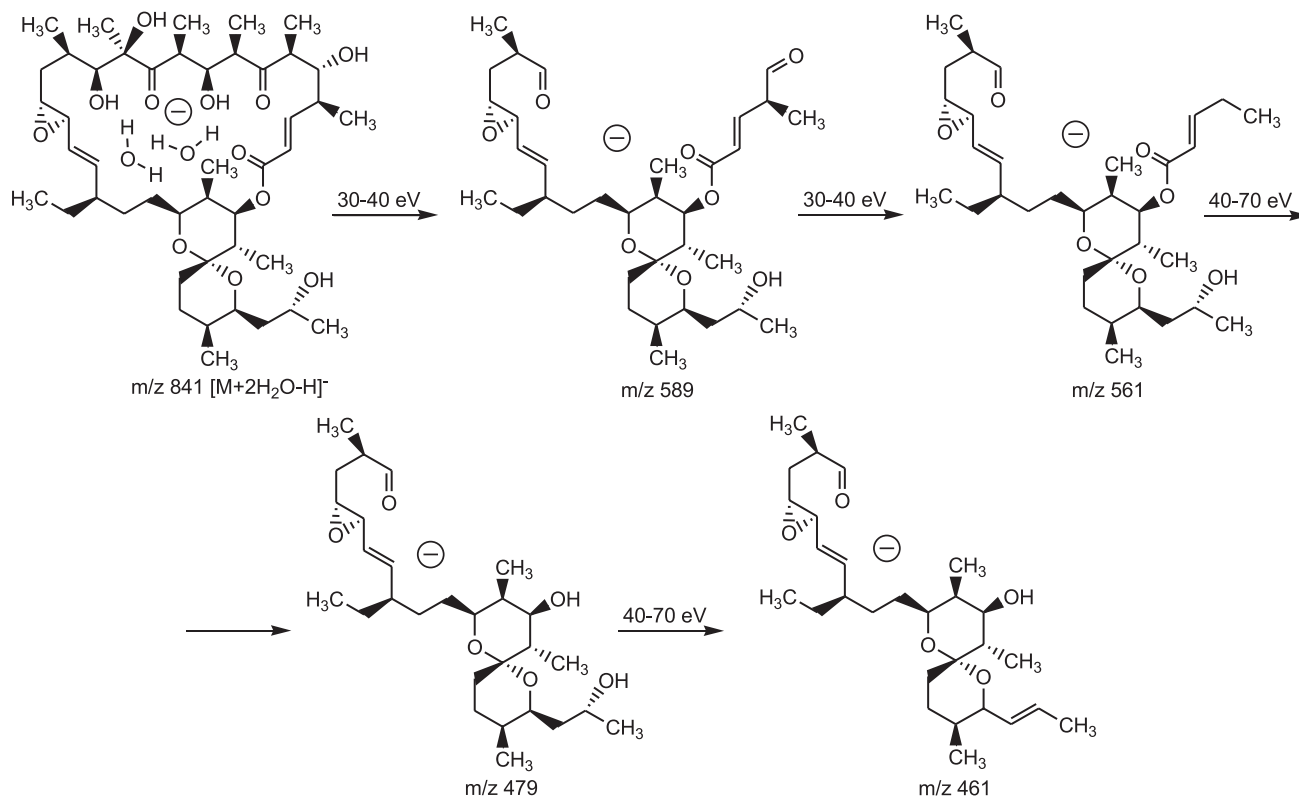
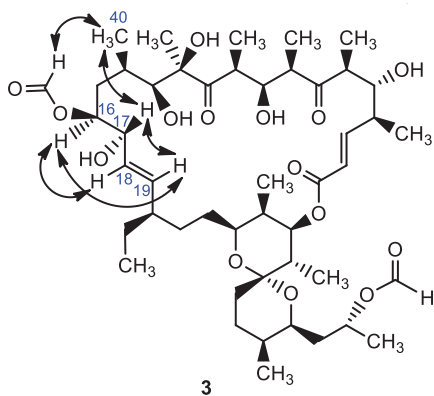


Схема 2. Фрагментация 16,17-эпоксиолигомицина А (**2**) методом тандемной масс-спектрометрии при энергии соударении 30–70 эВ.



**Рисунок 1.** Корреляционные пики, наблюдаемые в спектре  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY 16,17-дигидро-16(*S*),17(*R*)-дигидрокси-16,33-*O,O*-диформилолигомицина **3**.

крытия эпоксидного цикла в кислой среде,<sup>[21]</sup> протекающему как анти-присоединение, при взаимодействии 16,17-эпоксиолигомицина **2** с муравьиной кислотой происходит обращение конфигурации у C16 атома и, таким образом, эпоксидный цикл в промежуточном производном **2** имеет 16(*R*),17(*R*)-конфигурацию. Это согласуется с результатами квантово-химического моделирования структуры олигомицина<sup>[9]</sup> и данными РСА,<sup>[22]</sup> в соответствии с которыми в предпочтительной конформации олигомицина плоскость диеновой системы располагается практически перпендикулярно плоскости макроцикла (Рисунок 2А). Таким образом, с учетом наименьших стерических препятствий, атака диенового фрагмента реагентами будет происходить предпочтительно с внешней стороны макроцикла по двойной связи в положениях 16, 17 и, например, в случае реакции Прилежаева, преимущественно должен образовываться эпоксид с  $\alpha$ -конфигурацией.

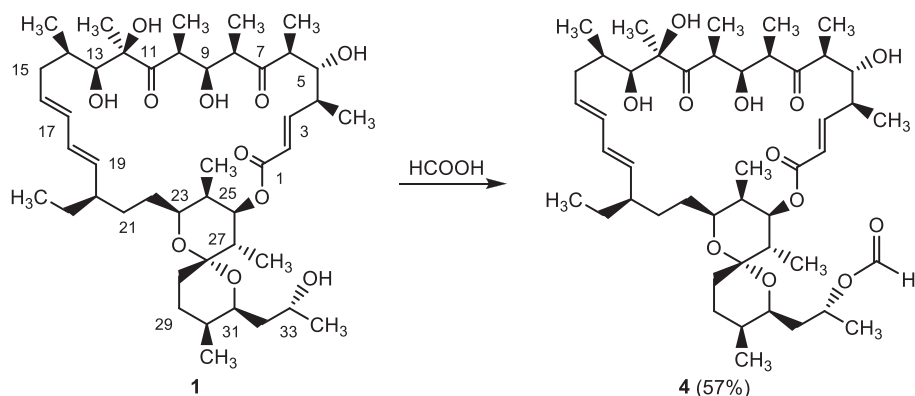
К настоящему времени возможности селективного ацилирования олигомицина **А** относительно малоизучены. Так, в литературе описаны два полиацетильных производных олигомицина – 5,9,33-три-*O*-ацетилолигомицин **А** и 5,9,13,33-тетра-*O*-ацетилолигомицин **А**.<sup>[23]</sup> Введение нескольких ацетильных групп привело к потере активности антибиотика в отношении культуры грибов *A. niger*.<sup>[23]</sup> Однако

*O*-ацильные производные биологически активных соединений зачастую рассматриваются в качестве пролекарств с улучшенными фармакологическими свойствами.<sup>[24]</sup> Вследствие того, что раскрытие эпоксидного цикла 16,17-эпоксиолигомицина **2** в муравьиной кислоте сопровождается формилированием гидроксигруппы в 33 положении, нами исследовано взаимодействие исходного олигомицина **1** с муравьиной кислотой. Установлено, что при обработке антибиотика **1** муравьиной кислотой (98 %) при комнатной температуре в течение 2 ч преимущественно происходит этерификация *ОН*-группы в 33 положении и основным продуктом в этих условиях является ранее неизвестное производное олигомицина – 33-*O*-формилолигомицин **А** (**4**, Схема 3). Следует отметить, что контроль протекания реакции методом ТСХ показывает образование в этих условиях незначительного количества примесей продуктов полиформилирования.

Строение соединения **4** подтверждено методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

Для производного олигомицина **4** зарегистрированы спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , а также корреляционные спектры ЯМР  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (Рисунки Д14-Д23). В спектрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  производного **4** в 33 положении наблюдается смещение сигналов в сторону слабого поля ( $\delta_{\text{C-33}}$  69.0 м.д.,  $\delta_{\text{H-33}}$  5.10 м.д.) по сравнению с исходным антибиотиком ( $\delta_{\text{C-33}}$  64.6 м.д.,  $\delta_{\text{H-33}}$  4.00 м.д.), а также появление сигналов в области слабого поля, соответствующих формильной группе ( $\delta_{\text{C}}$  160.7 м.д.,  $\delta_{\text{H}}$  8.05 м.д.). Отнесение химических сдвигов для олигомицинов **1**, **3** и **4** на основании анализа спектров  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, приведены в Таблице 1.

Для новых производных олигомицина **3** и **4** проведено исследование противогрибковых, антиактинозных и антипролиферативных свойств в сравнении с исходным олигомицином **1**. Антифунгальная активность изучена в отношении 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). Результаты исследования противогрибкового спектра выявили потерю активности 16,17-дигидро-16(*S*),17(*R*)-дигидрокси-16,33-*O,O*-



**Схема 3.** Синтез 33-*O*-формилолигомицина **А** (**4**).

Таблица 1. Данные спектров  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР олигомицинов 1, 3 и 4.

Поз.	Олигомицин А (1)			Производное 3		33-О-Формилолигомицин А (4)	
	Тип	$\delta_{\text{C}}$ , м.д.	$\delta_{\text{H}}$ , м.д., мульти. ( $J$ , Гц)	$\delta_{\text{C}}$ , м.д.	$\delta_{\text{H}}$ , м.д., мульти. ( $J$ , Гц)	$\delta_{\text{C}}$ , м.д.	$\delta_{\text{H}}$ , м.д., мульти. ( $J$ , Гц)
1	O=CO	165.0	–	165.1	–	165.0	–
2	CH	122.6	5.80, дд (15.6, 0.7)	122.9	5.86, дд (15.5, 0.6)	122.8	5.85, д (15.6)
3	CH	148.3	6.62, дд (15.6, 10.1)	148.9	6.63, дд (15.6, 10.2)	148.3	6.65, дд (15.7, 9.9)
4	CH	40.1	2.36, ткв (10.0, 6.6)	40.0	2.42, ткв (10.0, 6.4)	40.0	2.41, ткв (9.9, 6.5)
5	CH	72.9	3.75, дд (10.1, 1.3)	72.9	3.79, дд (10.2, 1.0)	72.6	3.80, дд (10.4, 1.0)
6	CH	46.4	2.70, дкв (1.3, 7.4)	46.4	2.69, дкв (7.6, 0.9)	46.7	2.75, дкв (7.3, 0.9)
7	C=O	220.2 <sup>a)</sup>	–	219.9	–	220.4	–
8	CH	41.9 <sup>b)</sup>	3.59, дкв (8.6, 6.9)	45.6	2.72, дкв (7.0, 2.4)	45.7	2.80, дкв (7.0, 3.0)
9	CH	72.6	3.94, дд (8.6, 3.1)	72.6	3.88, дд (9.3, 2.4)	72.2	3.97, дд (3.0, 1.4)
10	CH	45.6 <sup>b)</sup>	2.74, дкв (3.0, 7.1)	41.7	3.66, дкв (9.3, 6.9)	41.8	3.62, дкв (7.0, 1.4)
11	C=O	219.9 <sup>a)</sup>	–	219.0	–	219.8	–
12	C-O	82.9	–	82.9	–	83.0	–
13	CH	72.2	3.89, д (1.9)	73.0	3.80, д (1.4)	73.0	3.79, м
14	CH	33.4	1.88, м	27.0	2.0, м	33.5	1.92, м
15	CH <sub>2</sub>	38.3	2.17, бд; 1.98 дт	31.3	2.20, м; 1.83, м	38.5	2.21, м; 2.01, м
16	CH	129.3	5.42, ддд (14.8, 10.5, 4.1)	71.2	4.85, ддд (3.5, 2.9, 1.3)	129.5	5.48, ддд (15.2, 10.7, 4.0)
17	CH	132.3	6.00, ддд (14.7, 10.4, 1.4)	78.3	4.38, дд (7.4, 1.3)	132.4	6.04, ддд (14.6, 10.5, 1.6)
18	CH	130.2	5.90, дд (14.9, 10.5)	124.8	5.60, дд (15.4, 7.4)	130.5	5.96, дд (14.8, 10.5)
19	CH	137.7	5.21, дд (14.8, 9.6)	139.8	5.43, дд (15.4, 8.1)	137.5	5.60, дд (15.0, 9.7)
20	CH	45.9	1.85, м	43.6	1.94, м	45.8	1.89, м
21	CH <sub>2</sub>	31.4	1.52, м; 1.35, м	29.7	1.40, м; 1.25, м	31.6	1.40, м; 1.25, м
22	CH <sub>2</sub>	30.9	1.59, ддд	29.2	1.44, м; 1.32, м	30.6	1.40, м; 1.25, м
23	CH	68.9	3.78, ддд (9.8, 2.7, 2.4)	69.3	3.64, м	69.1	3.66, ддд (10.0, 3.7, 2.1)
24	CH	35.7	2.11, ддкв (5.0, 2.2, 6.9)	35.2	2.16, м	35.7	2.13, м
25	CH	76.1	4.91, дд (11.4, 5.0)	75.3	5.13, дд (11.4, 5.0)	75.9	4.98, дд (11.4, 5.0)
26	CH	37.6	1.78, дкв (11.4, 6.6)	38.0	1.81, м	37.8	1.81, дкв (11.4, 6.5)
27	OCO	99.1	–	99.4	–	99.3	–
28	CH <sub>2</sub>	25.9	1.90, м; 1.23, м	25.9	1.93, м; 1.22, м	26.0	1.91, м; 1.24, м
29	CH <sub>2</sub>	26.4	2.07, м; 1.38, м	28.0	2.08, м; 1.44, м	26.4	2.09, м; 1.41, м
30	CH	30.4	1.54, м	30.3	1.60, м	30.2	1.59, м
31	CH	67.1	3.96, дт (10.3, 2.5)	67.7	3.78, м	67.6	3.78, м
32	CH <sub>2</sub>	42.4	1.55, м; 1.25, м	39.9	1.71, м; 1.64, м	39.8	1.67, м; 1.60, м
33	CH	64.6	4.00, ддкв (9.2, 3.1, 6.2)	69.3	5.14, м	69.0	5.10, квд (6.4, 1.4)
34	CH <sub>3</sub>	24.6	1.21, д (6.2)	21.0	1.35, д (6.4)	21.0	1.35, д (6.4)
35	CH <sub>3</sub>	17.8	1.16, д (6.6)	17.6	1.20, д (6.2)	17.9	1.20, д (6.5)
36	CH <sub>3</sub>	8.2	1.05, д (7.3)	8.3	1.10, д (7.3)	8.3	1.09, д (7.3)
37	CH <sub>3</sub>	14.0	1.09, д (6.9)	8.7	1.05, д (6.9)	9.4	1.05, д (7.0)
38	CH <sub>3</sub>	9.2	1.01, д (7.0)	14.0	1.07, д (6.9)	14.0	1.12, д (7.0)
39	CH <sub>3</sub>	20.9	1.11, с	20.1	1.15, с	21.0	1.15, с
40	CH <sub>3</sub>	14.4	0.98, д (6.6)	15.9	1.26, д (6.6)	14.5	1.02, д (6.6)
41	CH <sub>2</sub>	28.4	1.35, м; 1.25, м	26.4	1.27, м; 1.43, м	28.4	1.32, м; 1.25, м
42	CH <sub>3</sub>	12.0	0.80, т (7.4)	11.6	0.82, т (7.4)	11.8	0.83, т (7.4)
43	CH <sub>3</sub>	6.0	0.82, д (6.9)	6.5	0.91, д (7.0)	6.0	0.94, д (7.2)
44	CH <sub>3</sub>	11.7	0.95, д (6.6)	11.7	0.99, д (6.6)	11.8	0.98, д (6.5)
45	CH <sub>3</sub>	11.1	0.88, д (6.9)	11.0	0.93, д (6.9)	11.0	0.91, д (6.9)
46	HCOO(16)	–	–	160.6	8.11, с	–	–
47	HCOO(33)	–	–	160.4	8.04, с	160.7	8.05, с



**Таблица 2.** Противогрибковая активность олигомицина А (1) и его производных 3, 4.

Соединение	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
16,17-Дигидро-16( <i>S</i> ),17( <i>R</i> )-дигидрокси-16,33- <i>O,O</i> -диформилолигомицин А (3)	0.5–1	4–8	>32	>32	>32
33- <i>O</i> -Формилолигомицин А (4)	>32	16	>32	32	>32
Олигомицин А (1)	2–4	1–2	0.5	2–4	2–4
Флуконазол	4	4	32	>32	>32

диформилолигомицина А (3) в отношении *A. niger* и других микромицетов, в то время как активность в отношении некоторых штаммов *Candida spp.* сохраняется (Таблица 2). Стоит отметить, что для ранее описанного 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицина наблюдалось схожее изменение спектра противогрибковой активности при восстановлении двойных С–С связей макролактонного цикла.<sup>[6]</sup> Для 33-*O*-формилолигомицина (4) также наблюдается значительное снижение активности, как в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*, так и в отношении филаментозных грибов.

Антибактериальная активность олигомицинов 3 и 4 была изучена на стерптомичетах *S. fradiae* ATCC-19069 на разработанной ранее тест-системе.<sup>[13]</sup> Результаты исследования говорят о том, что проведенные модификации приводят к значительному снижению антиактиномикозной активности олигомицина А (1). Формилирование гидроксигруппы в 33 положении снижает активность в 50 раз, тогда как изменение структуры макролактонного цикла (положения 16, 17) снижает активность на 4 порядка, что свидетельствует о важной роли диеновой системы в антиактиномикозном действии антибиотика 1 (Таблица 3).

Сравнительное исследование цитотоксических свойств олигомицина А (1) и его новых производных 3, 4 было проведено на культуре клеток хронической миелоидной лейкемии К-562 (Таблица 4). Формилирование гидроксигруппы в положении 33 оказало незначительное влияние на антипролиферативную активность производного 4, тогда как модификация 16,17-положений привела к 4-х кратному снижению

активности соединения 3 по сравнению с исходным антибиотиком 1. Эти данные коррелируют с активностью в отношении тест-культуры *S. fradiae*. Вследствие высокой активности 33-*O*-формилолигомицин А (4) был дополнительно протестирован на сублинии клеток миелоидной лейкемии с множественной лекарственной устойчивостью К-562/4, линии клеток карциномы кишечника человека НСТ-116, а также на линии первичных фибробластов человека (ПФЧ) (Таблица 4). Результаты скрининга показывают, что формилирование гидроксильной группы олигомицина (1) в 33-положении вызывает более чем 2-х кратное снижение цитотоксичности формиата 4 для неопухолевых клеток ПФЧ, при сохранении активности на опухолевые клетки и, таким образом, эта модификация приводит к увеличению терапевтического индекса полусинтетического производного. Кроме того, как сам олигомицин А (1), так и его формиат 4 способны эффективно преодолевать множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток, обусловленную экспрессией трансмембранного транспортера р-гр на их поверхности.<sup>[25]</sup>

Данные о биологических свойствах новых производных 3 и 4, показывают, что введение гидроксильной группы в положение 17 и формильных групп в положения 16 и 33 негативно сказывается на биологической активности олигомицина А. Вероятно, наблюдаемое снижение биоактивности обусловлено нарушением оптимальной геометрии макроцикла при связывании антибиотика с мишенью. Для обоснования данного предположения, а также для установления влияния формильной группы в боковой цепи на связывание

**Таблица 3.** Активность олигомицина А (1) и его производных 3, 4 в отношении *S. fradiae* ATCC-19609.

Соединение	МИК, нмоль/диск
16,17-Дигидро-16( <i>S</i> ),17( <i>R</i> )-дигидрокси-16,33- <i>O,O</i> -диформилолигомицин А (3)	10
33- <i>O</i> -Формилолигомицин А (4)	0.05
Олигомицин А (1)	0.001

**Таблица 4.** Антипролиферативная активность олигомицина А (1) и его производных 3, 4.

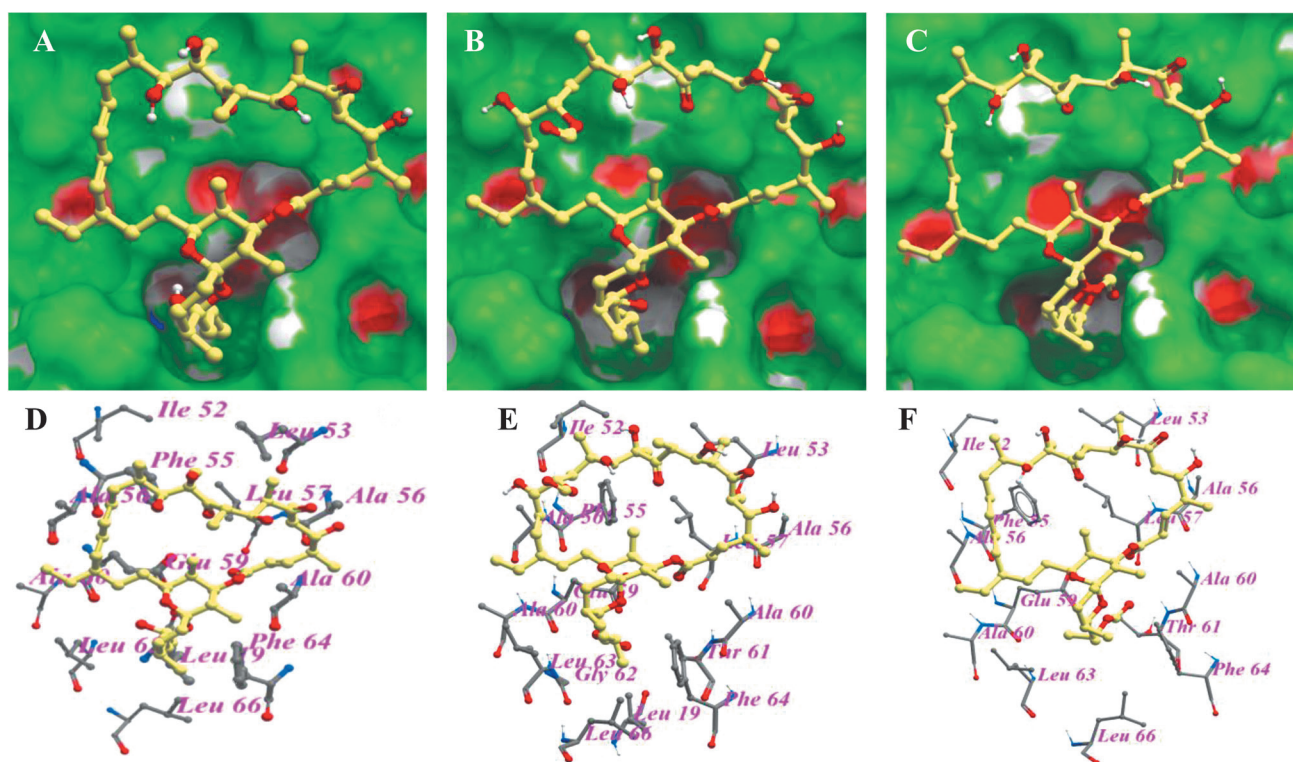
Соединение	IC <sub>50</sub> , мкМ			
	К-562	К-562/4	НСТ-116	ПФЧ
Олигомицин А	0.2±0.04	0.25±0.1	0.9±0.2	3.0±0.2
16,17-Дигидро-16( <i>S</i> ),17( <i>R</i> )-дигидрокси-16,33- <i>O,O</i> -диформилолигомицин А (3)	0.8±0.1	–	–	–
33- <i>O</i> -Формилолигомицин А (4)	0.2±0.05	0.25±0.1	1.0±0.1	8.0±0.3

олигомицина А с его основной биомишенью, было проведено моделирование взаимодействия исходного антибиотика **1** и его производных **3** и **4** с АТФ-синтазой с использованием процедуры докинга в программе 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 лучшей по энергии связывания конформации олигомицина А (**1**), полученной в результате докинга с кристаллографическими данными (PDB: 4f4s<sup>[22]</sup>), показывает почти полное совпадение структуры комплексов.<sup>[5]</sup> Поэтому используемые программа и параметры докинга подходят для моделирования связывания олигомицина А с исследуемой мишенью, а значит пригодны для прогнозирования взаимодействия его производных.

В результате процедуры докинга была определена локализация лучших по энергии связывания конформаций олигомицина А (**1**), 16,17-дигидро-16(*S*),17(*R*)-дигидрокси-16,33-*O,O*-диформилолигомицина А **3** и 33-*O*-формилолигомицина А **4** на поверхности  $F_0$  субъединицы АТФ-синтазы (Рисунок 2), а также проведена оценка энергии связывания ( $\Delta G_{bind}$ , Таблица 5). Сравнительный анализ полученных данных указывает

на то, что новые производные **3** и **4** имеют меньшее сродство к мишени, чем исходный антибиотик **1**. Наиболее значительное падение энергии связывания (~7 ккал/моль по сравнению с исходным олигомицином А) наблюдается для производного **3**: разрушение диеновой системы и введение новых гидрофильных групп в макроцикл приводит к изменению энергии сольватации и увеличению конформационной емкости лиганда. Поскольку при связывании рассматриваемых антибиотиков с  $F_0$  субъединицей АТФ-синтазы происходит соприкосновение большей части их структуры с поверхностью белка, комплексообразование ведёт к уменьшению энтропии за счёт потери конформационной подвижности в силу возникающего ограничения вращения вокруг двугранных углов, образованных атомами, входящими в контакт с мишенью. Как следствие, потеря энтропии в случае связывания производных **3** и **4** с мишенью превосходит снижение энтропии в случае связывания исходного олигомицина А (**1**), что подтверждается значениями изменения энтропии (Таблица 5). Основной вклад в энергию связывания олигомицина **1** и его производных **3** и **4** вносит гидрофобная составляющая. Количество остатков гидрофобных аминокислот, расположенных на расстоянии 3 Å от лиганда (Рисунок 2 D,E,F), практически одинаково как для олигомицина **1**, так и для его произво-



**Рисунок 2.** Структура комплексов олигомицина **1** (A, D), 16,17-дигидрокси-16,33-*O,O*-диформилолигомицина **3** (B, E), формилолигомицина **4** (C, F) и  $F_0$  субъединицы АТФ-синтазы (PDB: 4f4s), полученных в результате докинга с помощью ICM-Pro. A, B, C: Локализация лучших по энергии связывания конформаций антибиотиков **1**, **3** и **4** 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.

D, E, F: Аминокислотные остатки  $F_0$  субъединицы АТФ-синтазы, расположенные на расстоянии 3Å от лучших по энергии связывания конформаций соединений **1**, **3** и **4**. Рендеринг моделей лигандов и аминокислот: атомы углерода окрашены в жёлтый цвет (у лигандов) и тёмно-серый (у мишени), атомы кислорода – красный, атомы азота – синий.

**Таблица 5.** Значения энергии связывания ( $\Delta G_{bind}$ , ккал/моль) с АТФ-синтазой и вклады её составляющих, для лучших по энергии связывания конформаций олигомицина А (**1**), 16,17-дигидро-16(S),17(R)-дигидрокси-16,33-*O,O*-диформилолигомицина А (**3**) и 33-*O*-формилолигомицина А (**4**), полученных в результате докинга с помощью ICM - Pro.

№ соед.	$\Delta G_{bind}$	$\Delta G_{eq}$	$\Delta G_{solv}$	$\Delta G_{vdW}$	$\Delta G_{hbond}$	$-T\Delta S$	$\Delta U$
<b>1</b>	-22.1	-1.5	1.9	-33.8	0	10.5	0.8
<b>3</b>	-15.2	-0.5	1.9	-32.3	0	14.7	1.1
<b>4</b>	-19.6	-0.9	-0.2	-32.6	0	13.5	0.7

дных **3**, **4**, поэтому Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия при комплексообразовании рассматриваемых соединений с  $F_o$  субъединицей АТФ-синтазы примерно равны.

## Выводы

Исследованы возможности эпоксицирования и формилирования олигомицина А и впервые получены и охарактеризованы два новых полусинтетических производных – 16,17-дигидро-16(S),17(R)-дигидрокси-16,33-*O,O*-диформилолигомицин А (**3**) и 33-*O*-формилолигомицин А (**4**). Установлено, что при низкой температуре эпоксицирование олигомицина А *m*-хлорнадбензойной кислотой протекает с преимущественным образованием (*R,R*)-16,17-эпоксиолигомицина **2**. В отличие от эпоксипроизводных 16-членных макролидных антибиотиков, эпоксиолигомицин А (**2**) оказался неустойчив, что затрудняет его выделение и очистку. Его стабильное производное **3** получено сольволизом неочищенного 16,17-эпоксиолигомицина **2** в муравьиной кислоте. Обнаружено, что в этих условиях раскрытие эпоксидного цикла сопровождается формилированием гидроксильной группы в 33-положении. Аналогично, при обработке исходного антибиотика **1** муравьиной кислотой происходит этерификация 33-гидроксигруппы и основным продуктом является 33-*O*-формилолигомицин А (**4**). Мягкие условия и высокая региоселективность позволяют использовать найденный новый способ формилирования олигомицина А для селективной защиты боковой гидроксипропильной цепи олигомицина для последующих трансформаций или получения его депоформ.

Результаты биологических исследований новых производных свидетельствуют о том, что проведенные модификации в большинстве случаев снижают биологическую активность антибиотика. Полученные данные коррелируют с результатами компьютерного моделирования взаимодействия антибиотиков с мишенью –  $F_o$  субъединицей АТФ-синтазой, и подтверждают сделанные ранее выводы о важной роли как диеновой системы макроцикла, так и боковой гидроксипропильной цепи в биологическом действии олигомицина А. Сохранение активности производного **3** в отношении некоторых штаммов *Candida spp.* говорит в пользу сделанного ранее предположения<sup>[6]</sup> о наличии дополнительных мишеней в клетках дрожжей этого рода, связывание с которыми, по-видимому, не зависит от геометрии макроцикла. В результате формилирования гидроксильной группы в 33 положении

антибиотика сохраняется способность ингибирования роста опухолевых клеток, в то время как активность производного **4** в отношении большинства других тест-культур, в том числе и для неопухолевых клеток снижается. Следовательно, эта модификация повышает селективность действия на опухолевые клетки, что делает 33-*O*-формилолигомицин (**4**) перспективным соединением для дальнейшего исследования противоопухолевой активности. Таким образом, найдено новое направление химической модификации олигомицина А (**1**), позволяющее за счет снижения связывания с АТФ-синтазой эффективно модулировать его биологические свойства, что открывает возможности для оптимизации его фармакологических свойств.

**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.Eh., Kabanov A.E. *Antibiotiki i Khimioterapiya* **2003**, *48*, 33–39 (in Russ.).
- Jonckeere 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. *J. Antibiot.* **2012**, *65*, 223–225.
- Omelchuk O.A., Belov N.M., Tsvetkov V.B., Grammatikova N.E., Lysenkova L.N., Korolev A.M., Bekker O.B., Danilenko V.N., Shchekotikhin A.E. *Macroheterocycles* **2016**, *9*, 453–461.
- Lysenkova L.N., Turchin K.F., Korolev A.M. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2918–2924.
- Lysenkova L.N., Godovikov I.A., Korolev A.M. *Macroheterocycles* **2015**, *8*, 424–428.
- Lysenkova L.N., Saveljev O.Y., Korolev A.M., Danilenko V.N., Bekker O.B., Mavletova D.A., Vatlin A.A., Omelchuk O.A., Shchekotikhin A.E. *Macroheterocycles* **2016**, *9*, 307–313.
- Lysenkova L.N., Saveljev O.Y., Grammatikova N.E. *J. Antibiot.* **2017**, *70*, 871–877.
- 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 (in Russ.) [ГОСТ Р ИСО 16256–2015].
- Clinical and Laboratory Standards Institute. **2008**. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standart*, 3rd ed., M27–A3.

12. Clinical and Laboratory Standards Institute. **2008**. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standart*, 2nd ed., M38–A2.
13. Alekseeva M.G., Elizarov S.M., Bekker O.B., *et al.* *Biochemistry (Moscow) Suppl. A Membrane Cell. Biol.* **2009**, 3, 16–23.
14. Carey J.S., Laffan D., Thomson C. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 2337–2347.
15. Deeg M., Hagenmaier H., Kretschmer A. *J. Antibiot.* **1987**, 40, 320–328.
16. Mrozik H. U.S. Pat. 4530921, **1985**.
17. Naito S., Saito A., Furukawa Y. *J. Antibiot.* **1994**, 47, 812–820.
18. Blizzard T.A., Mrozik H., Fisher M.H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 2093–2094.
19. Vatlin A.A., Bekker O.B., Lysenkova L.N. *Genetika* **2016**, 52, 723–727 (in Russ.).
20. Lysenkova L.N., Turchin K.F., Korolev A.M. *J. Antibiot.* **2014**, 67, 153–158.
21. Parker R.E., Isaacs N.S. *Chem. Rev.* **1959**, 59, 737–799.
22. Wesson L., Eisenberg D. *Protein Sci.* **1992**, 1, 227–235.
23. Szilagyí L., Samu J., Harsanyi I. *Spectrosc. Lett.* **1995**, 28, 699–707.
24. Rautio J., Kumpulainen H., Heimbach T. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2008**, 7, 255–270.
25. Efferth T., Volm M. *Arch Toxicol.* **2017**, 91, 2515–2538.

Received 30.08.2017

Accepted 02.11.2017