

Синтез и антибактериальная активность аминоалкиламидов эремомицина

Е. И. Моисеенко,^a Н. Э. Грамматикова,^a А. Е. Щекотихин^{a,b,@}

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

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

@E-mail: shchekotikhin@mail.ru

Описаны синтез и антибактериальные свойства серии аминоалкиламидов гликопептидного антибиотика эремомицина. Новые полусинтетические гликопептиды были получены трансформацией С-концевой карбоксильной группы макроциклического кора эремомицина (**2**) в карбоксамидную с использованием серии диаминнов в присутствии РувОР в качестве конденсирующего агента. Исследование антибактериальных свойств показало, что все аминоалкиламиды эремомицина **4a–4g** обладают более высокой активностью как в отношении большинства чувствительных, так и резистентных к гликопептидам штаммов грамположительных патогенов по сравнению с исходным эремомицином (**2**), а также «золотым стандартом» – ванкомицином (**1**). Увеличение аминоалкильной цепи от 2 до 5 атомов углерода приводит к незначительному снижению активности аминоалкильных производных амида эремомицина.

Ключевые слова: Гликопептидные антибиотики, аминоалкиламиды эремомицина, полусинтетические производные, антибактериальная активность.

Synthesis and Antibacterial Activity of Aminoalkylamides of Eremomycin

Elena I. Moiseenko,^a Natalia E. Grammatikova,^a and Andrey E. Shchekotikhin^{a,b,@}

^aG.F. Gause Institute of New Antibiotics, 119021 Moscow, Russian Federation

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

@Corresponding author E-mail: shchekotikhin@mail.ru

Increasing the effectiveness of antimicrobial agents for the treatment of bacteria-resistant infections is one of the urgent chemotherapy problems of the last decades. Macrocyclic glycopeptide vancomycin (**1**) remains the antibiotic of choice against diseases caused by the resistant-associated strains of gram-positive pathogens. Although its use is strictly regulated, the gradual spread of vancomycin-resistant *Staphylococcus* and *Enterococci* strains (GRSA, GISA and VRE) is a serious problem nowadays.^[1–3] Along with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), these bacteria are included by WHO in the priority pathogens list for R&D of new antibiotics.^[4] Besides, the use of vancomycin is limited by a number of disadvantages, such as histamine-releasing effects, as well as nephro- and ototoxicity.^[5] Though most new semi-synthetic glycopeptide antibiotics development researches focused on the synthesis of their hydrophobic derivatives, some of them, such as semi-synthetic lipoglycopeptides, have a number of chemotherapeutic advantages over natural glycopeptides.^[6–8] A number of works published in recent years shows the promising results of introducing peripheral amino, ammonium, or guanidino groups into the structure of glycopeptide antibiotics.^[9–14] Additional hydrophilic aminoalkyl groups allow to increase the activity of natural glycopeptide antibiotics, and can be further used as a linker for the conjugation with hydrophobic fragments.^[15] Eremomycin (**2**), structurally similar to vancomycin, is a promising scaffold for the development of new generation of semi-synthetic antibiotics. This glycopeptide has some advantages over vancomycin, in particular, higher antibacterial activity and slightly reduced side effects.^[16–18] The most promising directions for modifying eremomycin (**2**) is an amidation of the C-terminus amino acid. This transformation allows increasing the activity of natural antibiotics and also has a high synthetic and economic efficiency. An application of modern condensation methods gives possibilities for the glycopeptides

modification in one stage with minimal by-products formation. A series of eremomycin picolylamides and their quaternized derivatives has been described earlier.^[19] Analysis of the biological properties of the obtained derivatives showed that the introduction of a pyridinyl fragment leads to a significant increasing of the antibacterial activity of eremomycin amide **3** for glycopeptide-sensitive strains and bacteria with intermediate resistance. Quaternization of the heterocycle of eremomycin picolylamide **3** by long-chain alkyls leads to an increase of the activity of cationic lipoglycopeptides against resistant strains, but is accompanied by a decrease of the activity against susceptible strains.^[19] Therefore, the aim of this work was to assess the antimicrobial potential of aminoalkyl derivatives of eremomycin amide with different alkyl chain lengths and varying the structure of linker. To achieve this goal, a series of new eremomycin amides was synthesized and the antimicrobial activity comparative study of the obtained compounds was carried out. Condensation of eremomycin sulfate (**2**) with diamine hydrochlorides was carried out using PyBOP in the presence of DIEA to maintain pH~8, in DMSO. The optimal reagent ratio was accordingly determined as 1:9:13:1.7 (eremomycin sulfate : diamine dihydrochloride : DIEA : PyBOP). Isolation of the obtained derivatives was carried out by reprecipitation, followed by purification by reverse phase chromatography by gradient elution in a water-acetonitrile mixture. The developed method of condensation and purification gives the target aminoalkyl derivatives of eremomycin amide **4a-g** with an yield of 48–65 % and acceptable purity (90.0–94.9 % according to HPLC data). The antibacterial activity of the new eremomycin amides **4a-g** estimated in comparison with vancomycin (**1**), eremomycin (**2**) and its picolylamide **3** on a wide panel of gram-positive pathogens. All synthesized eremomycin aminoalkylamides **4a-g** are more active than vancomycin (**1**), eremomycin (**2**) and derivative **3** against sensitive and, especially, glycopeptide-resistant bacteria. It has been shown that increase of the alkyl chain length leads to a slight decrease in the activity of the compound, and the carbon atom substitution for the ether group has little effect on the antibiotic activity. Aminoalkylamides **4a,b**, that showed the highest antimicrobial activity, are promising for an in-depth study of the antibacterial spectrum, studies of antimicrobial efficacy on in vivo models, and toxicological properties testing. Moreover, the obtained derivatives **4a,b** are perspective for the further structure optimization and search for new semi-synthetic glycopeptides with improved pharmacological properties.

Keywords: Glycopeptide antibiotics, aminoalkylamides eremomycin, semi-synthetic derivatives, antibacterial activity.

Введение

Повышение эффективности лечения инфекций, вызванных бактериями, устойчивыми к противомикробным препаратам, является актуальной проблемой химиотерапии последних десятилетий. Антибиотиком выбора для терапии заболеваний, ассоциированных с резистентными штаммами грамположительных патогенов, остается макроциклический гликопептид ванкомицин (**1**) (Рисунок 1). Хотя его применение строго регламентируется лечением жизнеугрожающих инфекций, вызываемых бактериями с множественной лекарственной устойчивостью, постепенное распространение резистентных к ванкомицину штаммов стафилококков и энтерококков приводит к значительным ограничениям антибиотикотерапии. Так, в настоящее время в восточной, южной и центральной Европе от до 10 до 50 % всех изолятов *Enterococcus faecium* устойчивы к ванкомицину (VRE), а смертность, вызванная прямым и опосредованным влиянием штаммов VRE, может достигать 60–70 %.^[1,2] Хотя штаммы золотистого стафилококка, резистентные и с промежуточной устойчивостью к гликопептидам (GRSA и GISA), не обладают такой распространенностью как VRE, они также составляют не менее серьезную проблему. Так смертность, вызванная штаммами GRSA, более чем в 5 раз выше смертности, вызванной чувствительными к гликопептидам штаммам золотистого стафилококка (62 и 12 %, соответственно).^[3] Наряду с метициллин-резистентными стафилококками (MRSA), эти бактерии внесены ВОЗ в список приоритетных патогенов с высоким уровнем угрозы здоровью, в отношении которых

необходима разработка инновационных препаратов.^[4] Кроме того, применение ванкомицина ограничивается рядом недостатков, таких как гистамин-высвобождающее действие, а также нефро- и ототоксичность.^[5]

Большинство исследований по разработке новых полусинтетических гликопептидных антибиотиков сосредоточены на синтезе их гидрофобных производных.^[6] Так, одобренные для клинического применения гликопептиды второго поколения – далбаванцин, телаванцин и оритаванцин, получены введением в природные антибиотики гидрофобных заместителей.^[7] Хотя полусинтетические липогликопептиды имеют ряд химиотерапевтических преимуществ перед природными гликопептидами, некоторые их недостатки (такие как узкий противомикробный спектр, нефротоксичность и низкая растворимость в воде) ограничивают их клиническое применение. Для телаванцина, содержащего дополнительный гидрофильный фрагмент, показано значительное увеличение почечного клиренса и уменьшение распределения препарата в почках и печени, однако активность этого производного оказалась несколько ниже аналогичного соединения, содержащего только гидрофобный фрагмент.^[8] Ряд работ, опубликованных в последние годы, показывает перспективность введения в структуру гликопептидных антибиотиков периферических amino-, аммонийных или гуанидиногрупп.^[9–14] Дополнительные гидрофильные aminoalkильные группы позволяют в некоторых случаях повысить активность природных гликопептидных антибиотиков и могут быть в дальнейшем использованы в качестве линкера для введения гидрофобных фрагментов.^[15]

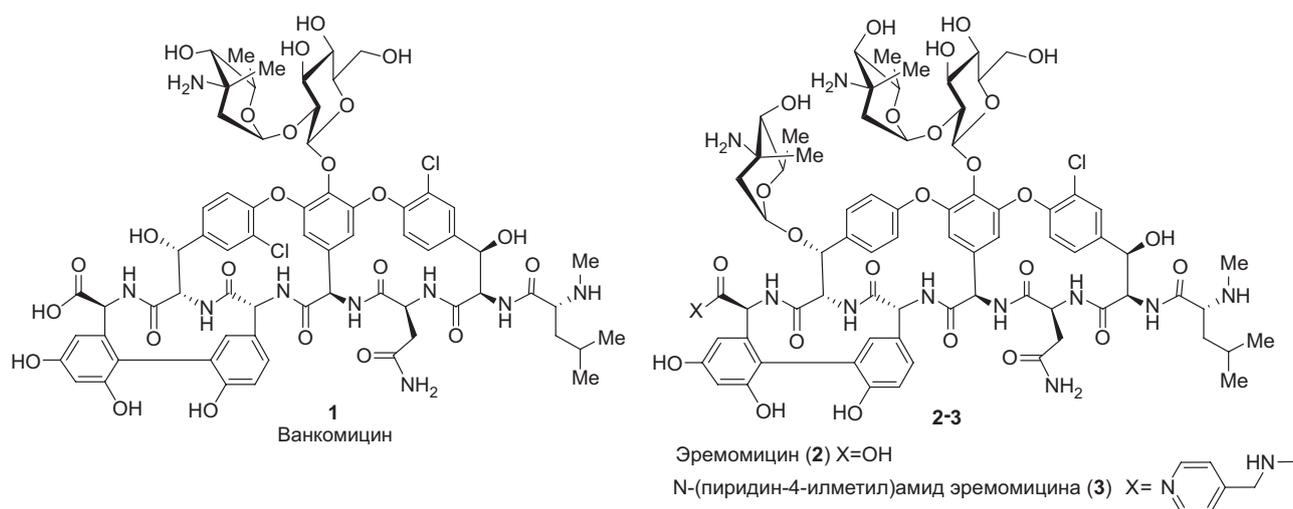


Рисунок 1. Структура ванкомицина (1), эремомоцилина (2) и *N*-(пиридин-4-ил-метил)амида эремомоцилина (3).

Эремомоцилин (2), близкий по структуре к ванкомицину, является перспективной молекулярной основой для разработки нового поколения полусинтетических антибиотиков.^[16] Этот гликопептид обладает рядом преимуществ перед ванкомицином, в частности, более высокой антибактериальной активностью и несколько сниженными побочными эффектами. Кроме того, за счет способности образовывать межмолекулярные связи, эремомоцилин имеет лучшую, чем ванкомицин стабильность в растворе.^[17,18]

Наиболее перспективным направлением модификации эремомоцилина является амидирование C-концевой аминокислоты. Такая трансформация гликопептидов позволяет не только повысить активность природных антибиотиков, но и имеет высокую синтетическую и экономическую эффективность. Применение современных методов конденсации открывает возможности для модификации гликопептидов в одну стадию с минимальным образованием побочных продуктов.

Ранее была описана серия пиколиламида эремомоцилина и их кватернизованных производных.^[19] Анализ биологических свойств полученных производных показал, что введение пиридинильного фрагмента приводит к существенному росту антибактериальной активности производного 3 для чувствительных к гликопептидам штаммов и бактерий с промежуточной резистентностью. Кватернизация гетероцикла пиколиламида 3 длинноцепочечными алкилами приводит к росту активности катионных липогликопептидов на его основе в отношении резистентных штаммов, однако сопровождается снижением активности в отношении чувствительных штаммов.^[19]

Таким образом, введение основного фрагмента может существенно повышать активность эремомоцилина (2) и других гликопептидных антибиотиков. Поэтому целью данной работы была оценка антимикробного потенциала аминокильных производных амида эремомоцилина с различной длиной алкильной цепи и варьированием структуры линкерного фрагмента. Для достижения поставленной цели синтезирована серия новых амидов эремомоцилина и проведено сравнительное

исследование антимикробной активности полученных соединений. Анализ показал, что в большинстве случаев новые амиды эремомоцилина достоверно более активны, чем ванкомицин (1) и эремомоцилин (2) в отношении как чувствительных, так и ряда резистентных к гликопептидам штаммов грамположительных патогенов.

Экспериментальная часть

Химический синтез

Реагенты и растворители производства Sigma-Aldrich. Сульфат эремомоцилина (чистота 96.2 %), продуцируемый штаммом *Amicalatopsis Orientalis*, получен на опытной установке НИИНА им. Г.Ф. Гаузе (Москва, Российская Федерация). Для аналитической ТСХ использовались алюминиевые пластинки с закрепленным слоем силикагеля F₂₅₄ толщиной 0.2 мм (Merck). Соединения обнаруживали в УФ-свете (254 нм). Очистка веществ методом обращенно-фазовой хроматографии осуществлялась на автоматической системе Isolera™ Prime (Biotage), картриджи SNAP KP-C18-HS (Biotage, 12 г), максимальное рабочее давление 10 бар, детектирование УФ-детектором (254–280 нм).

Анализ чистоты веществ методом ВЭЖХ проводили на хроматографе Shimadzu LC-20 AD, колонка Kromasil-100-5-мкм C-18 колонка (4.6 × 250 мм), LW = 260 нм, элюент: А – HCOONH₄ (водный раствор), В – MeCN (градиент В).

Масс-спектры высокого разрешения ESI регистрировали на спектрометре micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics GmbH). Точность измерений 0.25–0.38 в интервале масс 118.086255–2721.894829. Положительно заряженные ионы детектировали в следующих условиях: напряжение на капилляре 4 кВ, давление азота в распылителе 40 кПа, скорость потока осушающего газа 4 л/мин, температура источника 180 °С.

Гидрохлорид N-(2-аминоэтил)амида эремомоцилина (4a). При слабом нагревании и интенсивном перемешивании растворяют сульфат эремомоцилина (2, 0.5 г, 0.29 ммоль) и этилдиизопропиламин (0.07 мл, 3.8 ммоль) в безводном диметилсульфоксиде (15 мл). К полученному раствору прибавляют дигидрохлорид этилендиамина (0.36 г, 2.6 ммоль), RuBOP (0.26 г, 0.5 ммоль) и перемешивают 1 ч. Перед выделением продукта следует удостовериться в полной конверсии

исходного эремомицина (**2**) методом ТСХ (Silicagel 60 F₂₅₄, Merck, элюент этилацетат-*n*-пропанол – 25 % аммиак, 1:2:2). В случае присутствия в реакционной смеси эремомицина (**2**), к ней прибавляют дополнительно дигидрохлорид этилендиамина (0.11 г, 0.8 ммоль) и РуВОР (0.06 г, 0.12 ммоль) и перемешивают еще 30 мин. К раствору при перемешивании прибавляют изопропанол (4 мл) до помутнения раствора и осаждают продукт ацетоном (25 мл) и диэтиловым эфиром (15 мл). Выпавший осадок отфильтровывают, промывают ацетоном (2×10 мл), диэтиловым эфиром (2×10 мл) и высушивают в вакууме, после чего осадок растворяют в воде (2 мл), при перемешивании прибавляют изопропанол (3–4 мл) до помутнения раствора и повторно осаждают продукт ацетоном (25 мл) и диэтиловым эфиром (15 мл). Выпавший осадок отфильтровывают, промывают ацетоном (2×10 мл), диэтиловым эфиром (2×10 мл) и высушивают в вакууме. Получают технический продукт с выходом 93 % в виде кремового порошка.

Технический продукт растворяют в теплой воде (4 мл) и наносят на картридж для обращенно-фазовой хроматографии (SNAP Cartridge KP-C18-HS 12g, Biotage). Продукт элюируют в системе вода – ацетонитрил (скорость потока – 5 мл/мин, градиент ацетонитрила 0→100 % – 15 мин). Контроль фракций проводят методом ТСХ (Silicagel 60 F₂₅₄, Merck, элюент этилацетат-*n*-пропанол-25 % аммиак водный, 3:3:4). Фракции, содержащие продукт (время выхода – 5–6 мин), объединяют, концентрируют в вакууме до объема 2–3 мл, подкисляют соляной кислотой до pH ~3 и осаждают продукт ацетоном (50 мл). Выпавший осадок отфильтровывают, промывают ацетоном (2×10 мл), диэтиловым эфиром (2×10 мл) и высушивают в вакууме. Получают 0.32 г (55 %) гидрохлорида *N*-(2-аминоэтил)амида эремомицина (**4a**), в виде кремового порошка. HRMS (ESI) вычислено для C₇₅H₉₆ClN₁₂O₂₅ [M+H]: 1599.6293, найдено 1599.6294. ВЭЖХ (колонка Kromasil-100-5-мкм C-18 4.6×250 мм, LW = 260 нм, элюент: А – HCOONH₄ (0.2 %) pH=6.4, В – MeCN; градиент В, 5→60 % (30 мин): R_t = 19.1 мин, чистота 93.1 %. Найдено, %: С 48.19, Н 6.26, N 8.89; вычислено для C₇₅H₉₅ClN₁₂O₂₅·4HCl·6H₂O, %: С 48.59, Н 6.03, N 9.07.

Гидрохлорид N-(3-аминопропил)амида эремомицина (**4b**). Соединение **4b** получают аналогично соединению **4a** из эремомицина (**2**) и дигидрохлорида 1,3-диаминопропана. Выход гидрохлорида *N*-(3-аминопропил)амида эремомицина – 0.33 г (48 %), в виде белого порошка. HRMS (ESI) вычислено для C₇₆H₉₈ClN₁₂O₂₅ [M+H]: 1613.6449, найдено 1613.6451. ВЭЖХ (колонка Kromasil-100-5-мкм C-18 4.6×250 мм, LW = 260 нм, элюент: А – HCOONH₄ (0.6 %) pH=7.8, В – MeCN; градиент В, 10→70 % (30 мин): R_t = 18.9 мин, чистота 93.9 %. Найдено, %: С 48.37, Н 6.31, N 8.66; вычислено для C₇₆H₉₇ClN₁₂O₂₅·4HCl·7H₂O, %: С 48.40, Н 6.15, N 8.91.

Гидрохлорид N-(3-(диметиламино)пропил)амида эремомицина (**4c**). Соединение **4c** получают аналогично соединению **4a** из эремомицина (**2**) и гидрохлорида *N,N*-диметилпропан-1,3-диамина. Выход гидрохлорида *N*-(3-(диметиламино)пропил)амида эремомицина – 0.30 г (58 %), в виде белого порошка. HRMS (ESI) вычислено для C₇₈H₁₀₂ClN₁₂O₂₅ [M+H]: 1641.6762, найдено 1641.6754. ВЭЖХ (колонка Kromasil-100-5-мкм C-18 4.6×250 мм, LW=260 нм, элюент: А – HCOONH₄ (0.2 %) pH = 4.2, В – MeCN; градиент В, 5→40 % (30 мин): R_t = 18.6 мин, чистота 92.8 %. Найдено, %: С 49.73, Н 6.34, N 8.85; вычислено для C₇₈H₁₀₁ClN₁₂O₂₅·4HCl·5H₂O, %: С 49.88, Н 6.17, N 8.95.

Гидрохлорид N-(4-аминобутил)амида эремомицина (**4d**). Соединение **4d** получают аналогично соединению **4a** из эремомицина (**2**) и дигидрохлорида 1,4-диаминобутана. Выход гидрохлорида *N*-(4-аминобутил)амида эремомицина – 0.28 г (52 %), в виде белого порошка. HRMS (ESI) вычислено для C₇₇H₁₀₀ClN₁₂O₂₅ [M+H]: 1627.6606, найдено 1627.6612. ВЭЖХ

(колонка Kromasil-100-5-мкм C-18 4.6×250 мм, LW = 260 нм, элюент: А – HCOONH₄ (0.6 %) pH=7.8, В – MeCN; градиент В, 10→90 % (30 мин): R_t = 21.3 мин, чистота 91.2 %. Найдено, %: С 48.98, Н 6.27, N 8.83; вычислено для C₇₇H₉₉ClN₁₂O₂₅·4HCl·6H₂O, %: С 49.14, Н 6.16, N 8.93.

Гидрохлорид N-(5-аминопентил)амида эремомицина (**4e**). Соединение **4e** получают аналогично **4a** из эремомицина (**2**) и дигидрохлорида 1,5-диаминопентана. Выход гидрохлорида *N*-(5-аминопентил)амида эремомицина – 0.26 г (49 %), в виде белого порошка. HRMS (ESI) вычислено для C₇₈H₁₀₂ClN₁₂O₂₅ [M+H]: 1641.6762, найдено 1641.6768. ВЭЖХ (колонка Kromasil-100-5-мкм C-18 4.6×250 мм, LW = 260 нм, элюент: А – HCOONH₄ (0.6 %) pH = 7.8, В – MeCN; градиент В, 10→70 % (30 мин): R_t = 17.4 мин, чистота 94.9 %. Найдено, %: С 49.31, Н 6.35, N 8.71; вычислено для C₇₈H₁₀₁ClN₁₂O₂₅·4HCl·6H₂O, %: С 49.41, Н 6.22, N 8.86.

Гидрохлорид N-(2-(2-аминоэтокси)этил)амида эремомицина (**4f**). Соединение **4f** получают аналогично соединению **4a** из эремомицина (**2**) и дигидрохлорида 2,2'-окси-диэтиламина. Выход гидрохлорида *N*-(2-(2-аминоэтил)этил)амида эремомицина – 0.27 г (51 %), в виде белого порошка. HRMS (ESI) вычислено для C₇₇H₁₀₀ClN₁₂O₂₆ [M+H]: 1643.6555, найдено 1643.6574. ВЭЖХ (колонка Kromasil-100-5-мкм C-18 4.6×250 мм, LW=260 нм, элюент: А – HCOONH₄ (0.6 %) pH = 7.8, В – MeCN; градиент В, 10→70 % (40 мин): R_t = 30.1 мин, чистота 93.1 %. Найдено, %: С 47.45, Н 6.48, N 8.41; вычислено для C₇₇H₉₉ClN₁₂O₂₆·4HCl·7H₂O, %: С 47.38, Н 6.25, N 8.61.

Гидрохлорид N-(2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этил)амида эремомицина (**4g**). Соединение **4g** получают аналогично соединению **4a** из эремомицина (**2**) и гидрохлорида 2,2'-(этилендиокси)бис(этиламина). Выход гидрохлорида *N*-(2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этил)амида эремомицина – 0.35 г (65 %), в виде белого порошка. HRMS (ESI) вычислено для C₇₉H₁₀₄ClN₁₂O₂₇ [M+H]: 1687.6817, найдено 1687.6820. ВЭЖХ (колонка Kromasil-100-5-мкм C-18 4.6×250 мм, LW=260 нм, элюент: А – HCOONH₄ (0.6 %) pH=7.8, В – MeCN; градиент В, 10→70 % (30 мин): R_t = 12.7 мин, чистота 90.0 %. Найдено, %: С 47.04, Н 6.59, N 8.01; вычислено для C₇₉H₁₀₃ClN₁₂O₂₇·4HCl·8H₂O, %: С 47.11, Н 6.36, N 8.34.

Биологические исследования

В исследовании использовали эталонные штаммы *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 и клинические изоляты *Enterococci spp.*, полученные из музея лаборатории медицинской микробиологии Государственного научного центра по антибиотикам (ГНЦА).

Антимикробная активность гликопептидов **4a-g** изучена в сравнении с природными антибиотиками **1**, **2** на штаммах *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, а также на клинических изолятах энтерококков, чувствительных и устойчивых к ванкомицину: *E. faecalis* 6413 (МПК 1.0 мкг/мл), *E. gallinarum* 1308 (МПК 128 мкг/мл), *E. faecium* 3567 (МПК 128 мкг/мл), *E. faecium* 1 (МПК 8 мкг/мл), *E. faecium* 2 (МПК 8 мкг/мл), *E. faecium* 4 (МПК 8 мкг/мл).

Штаммы активировали после криохранения на агаризованной среде с сердечно-мозговым экстрактом (ВНИ – Brain Heart Infusion Agar, Himedia), и выращивали 24 ч при 35 ± 2 °С. Минимальную подавляющую рост микроорганизмов концентрацию (МПК) для тестируемых соединений определяли микрометодом серийных разведений в бульоне в соответствии с рекомендациями CLSI.^[20] В качестве контроля точности результатов исследования использовали антибиотик ванкомицин (ванкомицин гидрохлорид стандарт U. S. Pharmacopeia, Lot R07250) и эталонные штаммы *E. faecalis* ATCC 29212 и *S. aureus* ATCC 29213, в отношении которых определены значения МПК. Референсные значения МПК 0.5–2 мкг/мл для *S. aureus* ATCC 29213 и 1–4 мкг/мл для

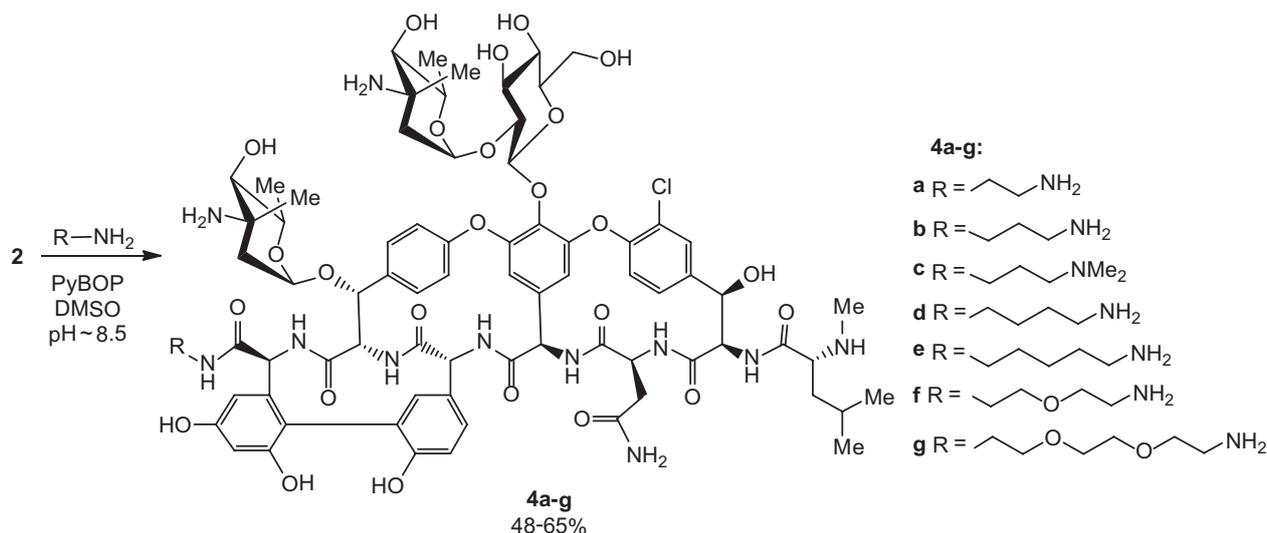


Схема 1. Синтез аминоалкилами́дов эремомицина **4a-g**.

E. faecalis ATCC 29212. Полученные значения МПК ванкомицина для контрольных штаммов не выходили за границы диапазона чувствительности, и составили для *S. aureus* ATCC 29213 – 1.0 мкг/мл, для *E. faecalis* ATCC 29212 – 2.0 мкг/мл.

Обсуждение результатов

Несмотря на наличие в структуре гликопептидных антибиотиков реакционноспособных amino-, гидроксидных и карбоксамидных групп, применение ряда конденсирующих агентов на основе гидроксидбензотриазола и его аналогов (например, реагент Кастро – бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфония гексафторфосфат, PyBOP) позволяет получать амиды гликопептидов по С-концевой аминокислоте с приемлемой эффективностью без использования защитных групп.^[9,21,22] PyBOP оказался наиболее эффективным конденсирующим реагентом для получения аминоалкилами́дов эремомицина (**2**). Конденсация сульфата эремомицина (**2**) с гидрохлоридами диаминов проводилась с использованием PyBOP в присутствии DIEA для поддержания оптимального pH ~8, в безводном ДМСО (Схема 1). Оптимальное соотношение реагентов, обеспечивающее быструю конверсию исходного эремомицина и приемлемое качество целевых амидов, было определено как 1 : 9 : 13 : 1.7 (сульфат эремомицина : дигидрохлорид диамина : DIEA : PyBOP). Полученные производные выделяли переосаждением с последующей очисткой технических продуктов обращенно-фазовой хроматографией градиентным элюированием в системе вода-ацетонитрил. Разработанная методика конденсации и очистки дает целевые аминоалкильные производные амида эремомицина **4a-g** с выходом 48–65 % и приемлемой чистотой (90.0–94.9 % по данным ВЭЖХ).

Оценка антибактериальной активности новых амидов эремомицина **4a-g** проведена в сравнении с ванкомицином (**1**), эремомицином (**2**) и его пиколиламидом (**3**) на панели грамположительных патогенов, включающей контрольные штаммы *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, а также клинические

изоляты энтерококков: чувствительных к ванкомицину *E. faecalis* 6413 и резистентных к гликопептидам *E. gallinarum* 1308, *E. faecium* 3567, *E. faecium* 1, *E. faecium* 2, *E. faecium* 4. Полученные данные о величинах МПК свидетельствуют о том, что введение аминоалкильного фрагмента в эремомицин оказывает существенное влияние на антибактериальное действие антибиотика (Таблица 1). Все новые производные **4a-g** показали более высокую активность, чем ванкомицин (**1**) и эремомицин (**2**), в отношении как чувствительных, так и устойчивых к гликопептидам штаммов бактерий.

Сравнение противомикробной активности полученной серии производных с ранее описанным *N*-(пиридин-4-ил-метил)амидом эремомицина (**3**) показывает, что замена пиридинового фрагмента на аминоалкильную группу значительно увеличивает активность производных **4a-g** в отношении резистентных к гликопептидам штаммов при сохранении действия на чувствительные к ванкомицину бактерии (Таблица 1, Рисунок 2).

Кроме того, можно отметить общее снижение активности аминоалкилами́дов эремомицина **4a-g**, наблюдаемое при увеличении длины цепи в остатке карбоксиамида. Так, наибольшей активностью для большинства тест-штаммов обладает *N*-(2-аминоэтил)- и *N*-(3-аминопропил)амиды **4a** и **4b**, а наименьшей – *N*-(5-аминопентил)амид эремомицина (**4e**). Метилирование терминальной аминогруппы также приводит к небольшому снижению активности (на 2–4 разведения) – *N*-(3-(диметиламино)пропил)амид эремомицина (**4c**) менее активен в отношении *E. gallinarum* 1308, чем аналог с первичной аминогруппой **4b**.

Введение в карбоксамидную цепь эфирного мостика слабо влияет на активность аминоалкилами́дов эремомицина. Так, *N*-(2-(2-аминоэтокси)этил)амид эремомицина (**4f**) имеет активность близкую к аналогу **4d**, содержащему 5-аминопентильную группу в карбоксамидном фрагменте. Однако введение дополнительного этиленоксидного блока в боковую цепь амида **4g** (*N*-(2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этил)

Таблица 1. Антибактериальная активность ванкомицина (**1**), эремомицина (**2**), *N*-(пиридин-4-ил-метил)амида эремомицина (**3**) и серии аминоклиламинов эремомицина **4a-g**.

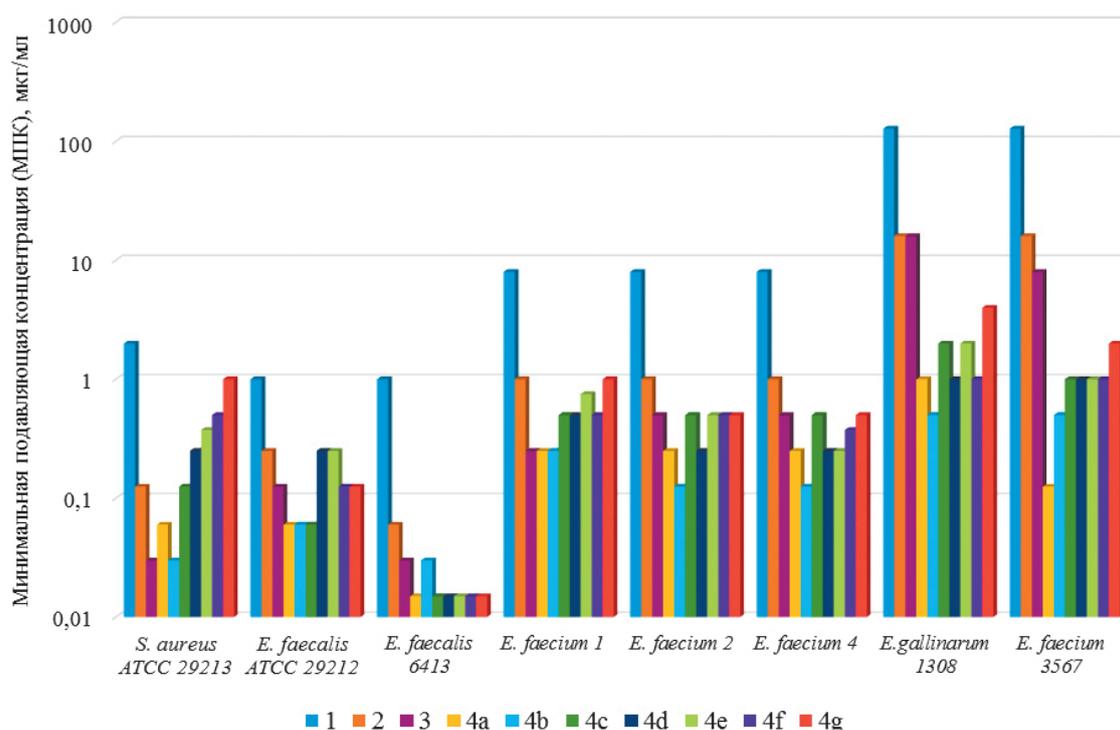
№	R	Штамм/Минимальная подавляющая концентрация (МПК), мкг/мл							
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. faecalis</i> 6413	<i>E. fae-</i> <i>cium</i> 1	<i>E. fae-</i> <i>cium</i> 2	<i>E. fae-</i> <i>cium</i> 4	<i>E. gallinarum</i> 1308	<i>E. faecium</i> 3567
1	–	2.0	1.0	1.0	8.0	8.0	8.0	128.0	128.0
2	–	0.125	0.125	0.06	1.0	1.0	1.0	16.0	16.0
3	CH ₂ (4-Py)	0.03	0.125	0.03	0.25	0.5	0.5	16.0	8.0
4a	-(CH ₂) ₂ NH ₂	0.06	0.06	0.015	0.25	0.25	0.25	1.0	0.125
4b	-(CH ₂) ₃ NH ₂	0.03	0.06	0.03	0.25	0.125	0.125	0.5	0.5
4c	-(CH ₂) ₃ NMe ₂	0.125	0.06	0.015	0.5	0.5	0.5	2.0	1.0
4d	-(CH ₂) ₄ NH ₂	0.25	0.25	0.015	0.5	0.25	0.25	1.0	1.0
4e	-(CH ₂) ₅ NH ₂	0.5	0.25	0.015	0.5	0.5	0.25	2.0	1.0
4f	-(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ NH ₂	0.5	0.125	0.015	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0
4g	-((CH ₂) ₂ O) ₂ (CH ₂) ₂ NH ₂	1.0	0.125	0.015	1.0	0.5	0.5	4.0	2.0

амид эремомицина) приводит к снижению активности в отношении *E. gallinarum* 1308 этого производного, что, по-видимому, связано с наблюдаемым снижением активности при увеличении длины спейсерной цепи в ряду аминоклиламинов эремомицина.

Заключение

Найдено новое перспективное направление в модификации эремомицина, позволяющее улучшить

антимикробную активность его производных. Все синтезированные аминоклиламины эремомицина **4a-g** более активны, чем ванкомицин (**1**) и эремомицин (**2**) в отношении чувствительных, и, особенно, резистентных к гликопептидам штаммов *Enterococcus spp.* Увеличение длины алкильной цепи в аминоклильном фрагменте приводит к незначительному снижению активности соединения, а замещение атома углерода в вводимой цепи на эфирную группу, слабо влияет на активность антибиотика. Аминоклиламины **4a,b**, показавшие наибольшую антимикробную активность,

**Рисунок 2.** Сравнение антибактериальной активности ванкомицина (**1**), эремомицина (**2**) и его производных.

перспективны для углубленного изучения спектра антибактериальных свойств, исследования противомикробной эффективности на моделях *in vivo*, а также тестирования их токсикологических свойств. Кроме того, полученные производные **4a,b** могут стать молекулярной основой для дальнейшей оптимизации структуры и поиска новых полусинтетических гликопептидов, обладающих улучшенными фармакологическими свойствами.

Благодарность. Химическая часть исследований выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-33-90218, Моисеенко Е.И.).

Список литературы

References

- Vehreschild M.J.G.T., Haverkamp M., Biehl L.M., Lemmen S., Fätkenheuer G. *Infection* **2019**, *47*, 7.
- Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G. *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, *13*, 686.
- Dancer S.J. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 1309.
- WHO, **2017**, at https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1 (accessed July 31, 2020).
- Bruniera F.R., et al. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2015**, *19*, 694.
- Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A. et al. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318.
- Hubert S.K., Mohammed J.M., Fridkin S.K. et al. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 3590.
- Leadbetter M.R., Adams S.M., Bazzini B. et al. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2004**, *57*, 326-336.
- Olsufyeva E.N., Shchekotikhin A.E., Bychkova E.N. et al. *Drug Des. Devel. Ther.* **2018**, *12*, 2875.
- Wu Z.C., Isley N.A., Boger D.L. *ACS Infect. Dis.* **2018**, *4*, 1468.
- Antonoplis A., Zang X., Huttner M.A. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 16140.
- Antonoplis A., Zang X., Wegner T., Wender P.A., Cegelski L. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 2065.
- Szűcs Z., Bereczki I., Róth E., Milánkovits M., Ostorházi E., Batta G., Nagy L., Dombrádi Z., Borbás A., Herczegh P. *J. Antibiot.* **2020**, *73*, 603–614.
- Wu Z.C., Isley N.A., Okano A., Weiss W.J., Boger D.L. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 1365.
- Pavlov A.Y., Preobrazhenskaya M.N., Malabarba A., Ciabatti R., Colombo L. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1998**, *51*, 73.
- Gauze G.F., Brazhnikova M.G., Laiko A.V., Sveshnikova M.A., Preobrazhenskaia T.P. *Antibiot. Med. Biotekhnol.* **1987**, *32*, 571.
- Gol'dberg L.E., Stepanova E.S., Vertogradova T.P., Shevniuk L.A., Shepelevtseva N.G. *Antibiot. Med. Biotekhnol.* **1987**, *32*, 910.
- Filippos'iants S.T., Malkova I.V., Gol'dberg L.E. *Antibiot. Med. Khimioterap.* **1989**, *34*, 523.
- Moiseenko E.I., Grammatikova N.E., Shchekotikhin A.E. *Macroheterocycles* **2019**, *12*, 98.
- Clinical and Laboratory Standarts Institute, **2015**, at https://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2015-M100-S25_unlocked.pdf (accessed July 31, 2020).
- Yasukata T., et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3033.
- Olsuf'eva E.N., Solov'eva S.E., Reznikova M.I., Korolev A.M., Preobrazhenskaya M.N. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2013**, *39*, 121.

Received 01.08.2020

Accepted 18.08.2020