

Алферова Вера Александровна

**Структура и антибиотическая активность
циклических липопептидов и поликетидов,
продуцируемых стрептомицетами**

1.4.9 – БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Работа выполнена в Лаборатории химического изучения биологически активных соединений микробного происхождения Института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе)

Научный руководитель:

Коршун Владимир Аркадьевич, доктор химических наук, заведующий Лабораторией молекулярного дизайна и синтеза Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; заведующий лабораторией химического изучения биологически активных соединений Института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАН

Официальные оппоненты:

Сухоруков Алексей Юрьевич, доктор химических наук, доцент, заведующий Лабораторией органических и металл-органических азот-кислородных систем Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН

Дубилей Светлана Алексеевна, доктор биологических наук, заведующий Учебной биомедицинской лабораторией автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»; заведующий Лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов Института биологии гена РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН, Владивосток

Защита состоится «06» апреля 2022 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН и на сайте института www.ibch.ru

Автореферат разослан « » 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Внедрение в медицину природных антибиотиков сыграло ключевую роль в увеличении продолжительности жизни в XX столетии. Основные классы антибиотиков открыты в 1940–60 гг, так называемый «золотой век» антибиотиков. Липопептидный антибиотик даптомицин, обнаруженный в середине 1980-х и одобренный для клинического применения в 2003 году, был последним антибиотиком принципиально нового класса. Скорость обнаружения не только новых классов, но и новых структурных семейств и фармакофоров существенно замедлилась. Темп введения новых антибиотиков в клиническую практику катастрофически отстает от темпов развития резистентности к ним.

Практически сразу после начала широкого применения антибиотиков, медицина столкнулась с проявлением устойчивых к их действию штаммов патогенов. Лекарственная устойчивость микроорганизмов является одной из наиболее актуальных проблем в современной клинической практике. Масштаб применения антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве увеличивается, поэтому патогенные микроорганизмы продолжают быстрыми темпами вырабатывать устойчивость к антимикробным агентам. Помимо распространения инфекционных заболеваний, вызываемых резистентными штаммами патогенных микроорганизмов, опасность представляют гнойно-септические осложнения после инвазивных операций и трансплантаций органов, обусловленные внутрибольничными (нозокомиальными) штаммами патогенов. В санитарных условиях при оказании медицинской помощи ситуация усугубляется ускоренной селекцией штаммов с устойчивостью к широкому спектру противомикробных препаратов. В перспективе распространение таких инфекционных осложнений ставит под угрозу саму возможность проведения инвазивных операций. Таким образом, поиск новых антибактериальных и антифунгальных препаратов и фармакофоров, в особенности эффективных в отношении резистентных микроорганизмов, является крайне актуальной задачей.

Несмотря на развитие методов расчетной и синтетической химии, природные соединения остаются основным источником новых антибиотиков. Лекарства, получаемые из природных источников или разрабатываемые на основе природных соединений, обладают большим разнообразием химических структур и ценными для применения в клинической практике свойствами (меньшая гидрофобность, стереохимическая чистота). Большая часть новых лекарств имеет в той или иной степени природное происхождение (являются вторичными метаболитами микроорганизмов или растений, их полусинтетическими аналогами или синтетическими соединениями с мотивами природных фармакофоров). Таким образом, изучение природных соединений продолжает оставаться перспективным направлением исследований, позволяющим ожидать обнаружения новых антибиотических соединений и выявления фармакофоров с новыми мишенями и механизмами активности.

Цель работы и задачи исследования. Целью данной работы было установление структуры и изучение антибиотической активности вторичных метаболитов, продуцируемых стрептомицетами. Для достижения поставленной цели предполагалось решение следующих задач:

1. Определение состава антибиотических вторичных микробных метаболитов оригинальных штаммов-продуцентов *Streptomyces griseorubens* INA 00887, *Streptomyces hygrosopicus* ВКПМ Ac2079, *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ac1980.
2. Выделение биологически активных вторичных метаболитов в количествах, достаточных для физико-химической и биологической характеристики антибиотиков.
3. Установление структуры вторичных метаболитов с помощью различных физико-химических методов анализа, а также биоинформатического анализа путей биосинтеза этих соединений.
4. Накопление данных о биологических свойствах вторичных микробных метаболитов, выявление закономерностей связи химического строения с активностью в изучаемых структурных семействах антибиотиков.

Научная новизна и практическая значимость работы. В результате выполнения данной работы выделен ряд микробных вторичных метаболитов различной степени новизны. Установлена структура соединений, идентичных или близкородственных описанным ранее антибиотикам (кристалломицин, астолиды, ирумамицин, изоирумамицин), для них выявлены новые закономерности связи структуры и активности. Получены новые пептидные антибиотики, названные гауземицинами, установлена их структура, позволяющая отнести их новому классу пептидных антибиотиков. Показано, что гауземицины обладают оригинальным, отличающимся от родственных пептидных антибиотиков механизмом действия. Опубликованные данные по связи структуры и активности в изученных семействах антибиотиков могут лечь в основу получения новых полусинтетических и синтетических соединений, перспективных для лечения инфекционных заболеваний. Проведенная характеристика химических, физико-химических, спектральных и биологических свойств новых вторичных метаболитов вносит вклад в изучение низкомолекулярных биологически активных соединений.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Антибиотик, продуцируемый стрептомицетом *S. griseorubens* INA 00887 и ранее известный как кристалломицин, идентифицирован как двухкомпонентный, состоящий из аспартоцинов В, С.

2. Обнаружено, что штамм *S. hygroscopicus* ВКПМ Ас2079 продуцирует новые антибиотики макролидной природы, названные астолидами А, В, содержащие два агликона: 36-членный полиольный макролид и производное 1,4-нафтохинона.

3. Найдено, что оригинальный штамм *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980 проявляет антифунгальные свойства за счет продукции макролидных антибиотиков семейства ирумамицина. В результате изучения выделены известные 20-членные макролиды ирумамицин и соединение Х14952В, а также неизвестный ранее изоирумамицин с уменьшенным размером макролактонного цикла (18-членный цикл вместо 20-членного), который демонстрирует снижение антифунгальной активности при сохранении цитотоксичности.

4. Установлено, что доменная архитектура биосинтетического генного кластера ирумамицина говорит о наличии необычных механизмов образования эпоксидного цикла (С23-С24) и смещения двойной связи (из положения С4-С5 в положение С5-С6) при биосинтезе 20-членных антифунгальных макролидов.

5. Показано, что оригинальный штамм *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980 является продуцентом липогликопептидного антибиотического комплекса, названного гауземицином. Установлена структура двух основных компонентов антибиотического комплекса гауземицина (гауземицинов А и В), которая обладает рядом особенностей (редкие непротеиногенные аминокислоты, в том числе ранее не встречавшаяся в природных пептидах 2-амино-4-гидрокси-4-фенилбутановая кислота; гликозилирование тирозина арабинозой; большой экзациклический фрагмент; отсутствие классического кальций-связывающего мотива и др.), позволяющих отнести его к новому классу пептидных антибиотиков.

6. Предложен путь биосинтеза гауземицинов на основании *in silico* анализа полногеномной последовательности штамма-продуцента. Показано, что биосинтез 2-амино-4-гидрокси-4-фенилбутановой кислоты протекает через образование гомофенилаланина из фенилаланина.

7. Установлено, что механизм действия гауземицинов обладает рядом особенностей, отличающих его от всех известных аналогов, что позволяет предполагать оригинальную молекулярную мишень антибиотика

Личный вклад автора. Автором совместно с научным руководителем были определены цели и задачи научного исследования, а также разработаны пути их решения. Автором или при его непосредственном участии проведены работы по выделению и очистке биологически активных соединений, их физико-химической характеристике и химическому изучению, интерпретация данных ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, выполнен синтез модельных соединений, обобщение и сравнение с литературными данными о биологической активности изучаемых

соединений, биоинформатический анализ полногеномных последовательностей штаммов-продуцентов антибиотиков. Для работ, проводившихся совместно с другими подразделениями Института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе или совместно с коллегами из других организаций, в тексте диссертации приведены соответствующие сноски.

В работе были использованы экспериментальные данные, полученные в других лабораториях и в рамках научного сотрудничества с другими организациями:

– Культивирование и микробиологическое изучение штамма-продуцента *Streptomyces griseorubens* INA 00887 проводилось к.б.н., н.с. Маланичевой И.А. и к.х.н., н.с. Ефименко Т.А. (Сектор поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий и Лаборатория таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов ФГБНУ «НИИНА»).

– Выделение, культивирование и микробиологическое изучение штамма-продуцента *S. hygroscopicus* ВКПМ Ас2079 проводилось зав. лаб., д.б.н. Трениным А.С., с.н.с., к.б.н. Бычковой О.П. (Лаборатория разработки методов поиска биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА»).

– Культивирование и изучение штамма-продуцента *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980 проводилось сотрудниками Лаборатории мутагенеза и селекции продуцентов биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА».

– Данные полногеномного секвенирования предоставлены д.б.н., проф., Равиным Н.В., д.б.н., проф., Мардановым А.В., н.с. Белецким А.В. (ФИЦ Биотехнологии РАН) и проанализированы совместно с к.х.н., н.с. Тереховым С.С. (ИБХ РАН).

– Изучение биологической активности препаратов осуществлялось к.б.н., н.с. Маланичевой И.А. (Сектор поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий ФГБНУ «НИИНА»), к.б.н., с.н.с. Грамматиковой Н.Э. (Лаборатория фармакокинетики и фармакодинамики ФГБНУ «НИИНА»), зав. лаб., д.б.н. Трениным А.С., с.н.с., к.б.н. Бычковой О.П. (Лаборатория разработки методов поиска биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА»), д.б.н., в.н.с. Кулько А.Б. (МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ), д.м.н., в.н.с. Мирчинк Е.П. (Лаборатория фармакологии и химиотерапии с виварием ФГБНУ «НИИНА»), проф., д.б.н., зав.лаб. Аптом А.С. и к.б.н., с.н.с. Майоровым К.Б. (Лаборатория иммуногенетики ФГБНУ «ЦНИИТ»).

– Цитотоксичность выделенных соединений изучалась к.х.н., с.н.с. Деженковой Л.Г. (Лаборатория химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА») и к.б.н., с.н.с. Свирщевской Е.В. (ИБХ РАН).

– Ингибирование трансляции и получение резистентных изолятов бактерий проводилось д.х.н. Остерманом И.А. (Сколтех).

– Эксперименты на модельных мембранах проведены д.б.н., в.н.с. Остроумовой О.С. (Институт цитологии РАН).

– Ингибирование АТФазы проведено к.х.н. Пестовым Н.Б. (ИБХ РАН).

– Спектры ЯМР регистрировались к.х.н., с.н.с. Пармоновым А.С. и д.ф.-м.н., г.н.с. Шенкаревым З.О. (ИБХ РАН), к.х.н., с.н.с. Новиковым Р.А. и Ткачевым Я.В. (ИМБ РАН).

– Данные масс-спектрометрических исследований получены к.х.н., с.н.с. Сольевым П.Н. (ИБМ РАН), к.х.н., н.с. Жеребкером А.Я. (Сколтех), м.н.с. Чистовым А.А., н.с. Ивановым И.А. (ИБХ РАН), к.б.н., с.н.с. Бирюковым М.В. (МГУ им. М.В. Ломоносова).

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях:

– Химическая биология. Международная конференция, посвященная 90-летию академик Д.Г. Кнорре (2016, Новосибирск, Россия);

– Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний (2017, Москва, Россия);

– IV Междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике (2018, Новый Свет, Крым, Россия);

- British Council Researcher Links Workshop "Macrocycles in Medicine" (2018, Норвич, Великобритания);
- Научная конференция с международным участием «Вакцинология как ответ биологическим угрозам», посвященная 100-летию основания НИИИВС им. И.И. Мечникова (2019, Москва, Россия);
- The 44th FEBS Congress (2019, Краков, Польша);
- Natural Products in Drug Discovery and Human Health (2019, Лиссабон, Португалия);
- Юбилейная V Междисциплинарная конференция «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (2019, Судак, Крым, Россия);
- VI Съезд Биохимиков России, IX Российский Симпозиум «Белки и Пептиды» (2019, Дагомыс, Россия).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 218 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 327 ссылок и 25 приложений. Диссертация содержит 82 рисунка и 19 таблиц.

Публикации. По материалам работы опубликовано 7 статей в международных рецензируемых журналах, 12 тезисов докладов на научных конференциях и получено 3 патента РФ на изобретения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Установление структуры липопептидного антибиотика кристалломицина

В связи с распространением антибиотикорезистентности в последние годы растет интерес к изучению антимикробных препаратов, не привлекавших существенного внимания при их первичном исследовании. Эти соединения могут как проявлять активность в отношении резистентных патогенов, так и служить сырьем для получения полусинтетических производных. В коллекции антибиотиков Института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе была обнаружена запаянная ампула, содержащая образец кристалломицина, выделенного более 60 лет назад, для которого структура ранее не была установлена. Образец, хранившийся при температуре 0–5°C, представлял собой рассыпчатый желтоватый порошок (Рис. 1).

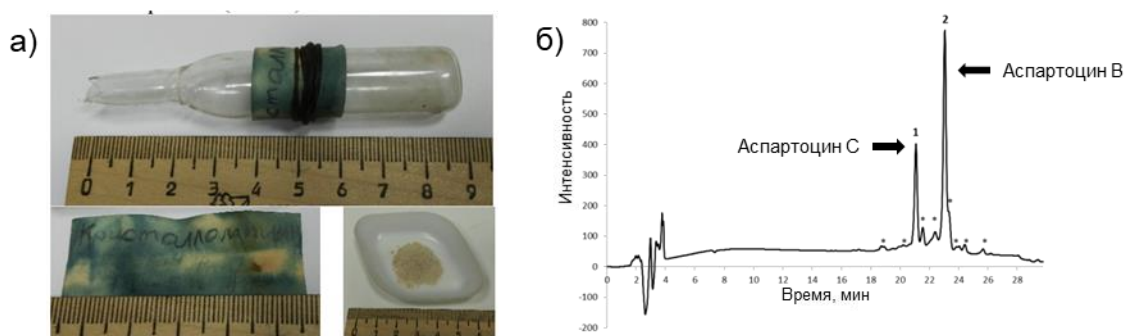


Рис. 1. а — фотография ампулы, ее подписи («Кристалломицин 0,4 г 7/І-57») и содержимого; б — оф-ВЭЖХ профиль образца кристалломицина

ВЭЖХ-анализ обнаруженного образца (Рис. 1) показал смесь двух основных и нескольких минорных компонентов. Оба основных компонента были выделены с помощью полупрепаративной ВЭЖХ; было получено 5.6 мг антибиотика **1** и 17.3 мг антибиотика **2**. Данные масс-спектрометрии высокого разрешения (ESI-HRMS) показали следующие значения m/z : 1304.6731 [**1** + H]⁺; 1326.6550 [**1** + Na]⁺; 1348.6373 [**1** – H + 2Na]⁺; 1318.6894 [**2** + H]⁺; 1340.6703 [**2** + Na]⁺.

Масса соединения **1** совпала с массой аспартоцина С (по литературным данным), а масса соединения **2** — с аспартоцинами А, В (отклонение не превышает 1 ppm). Аспартоцины относятся к классу анионных липопептидов структурного семейства амфомицина. Затем кристалломицины исследовали с помощью различных методов 1D и 2D ЯМР-спектроскопии. Отнесение сигналов с помощью подхода, основанного на комбинации двумерных спектров TOCSY, COSY, NOESY ^{13}C -HSQC, ^{15}N -HSQC и 3D TOCSY- ^{13}C -HSQC. Исследование показало идентичность соединения **1** аспартоцину С (А-1437 В/сушимицин А), а компонента **2** — аспартоцину В (А-1437 G/сушимицин В) (Рис. 2). Была обнаружена конформационная неоднородность кристалломицинов в растворе, обусловленная конформациями пролина, существенно осложнившая анализ спектров ЯМР.

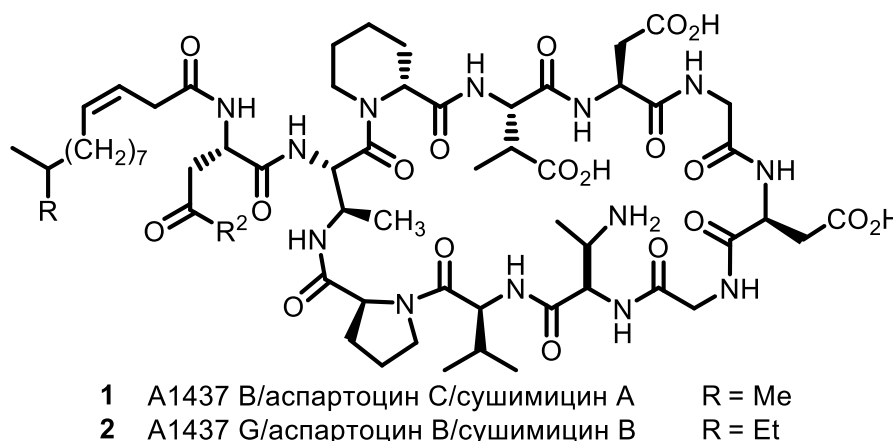


Рис. 2. Структуры компонентов антибиотика-кристалломицина

Был изучен спектр активности каждого индивидуального компонента антибиотика кристалломицина. Соединения **1** и **2** показали активность в отношении грамположительных бактерий, включая метициллин- и ванкомицин-резистентные штаммы и оказались неактивны против грамотрицательных бактерий, грибов и дрожжей. Оба соединения демонстрируют заметное повышение активности в среде, содержащей ионы кальция (1.25 мМ), для **1** МИК понижается с 16-32 мкг/мл до 2-8 мкг/мл; для соединения **2** МИК снижается с 4-16 мкг/мл до 1-4 мкг/мл. Такое поведение характерно для кальций-зависимых липопептидных антибиотиков, что является дополнительным подтверждением принадлежности соединений **1** и **2** к этому классу антибиотиков.

2. Установление структуры новых нафтохиноновых макролидных антибиотиков астолидов

Ранее из почвы в Саратовской области был выделен штамм стрептомицета (идентифицирован как *Streptomyces hygrosopicus*), обладающий высокой антифунгальной активностью. В рамках данной работы было показано, что активные вещества извлекаются бутанолом и антибиотическая активность ассоциирована с фракциями, соответствующими пикам с временами удерживания 20.7 мин и 23.4 мин на профиле HPLC (Рис. 3). В результате обогащения и очистки были получены в индивидуальном виде соединения **3** и **4** в виде аморфных твердых соединений.

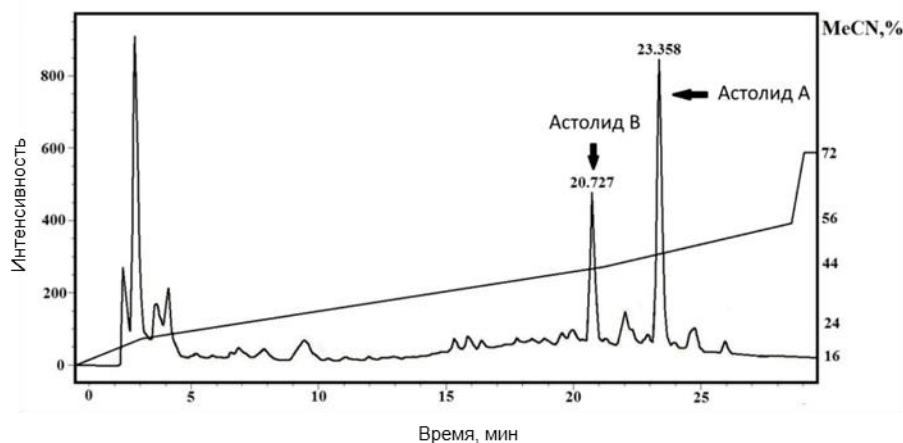


Рис. 3. Профиль оф ВЭЖХ астолидов А (3) и В (4)

Индивидуальные компоненты культуральной жидкости наработаны и охарактеризованы на основании физико-химических и спектральных данных. Данные масс-спектрометрии высокого разрешения показали, что брутто-формулы соединений **3** и **4** $C_{82}H_{13}O_{29}$ и $C_{82}H_{13}O_{30}$, соответственно. Также были установлены физико-химические характеристики изучаемых соединений:

- 3** — $[\alpha]_D^{25}$ -49.7 (с 0.2, MeOH); УФ (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 205 (4.26), 254 (4.11), 337 (2.88) нм; ИК ν_{max} 3421, 2931, 1728, 1709, 1666, 1603 cm^{-1} ;
- 4** — $[\alpha]_D^{25}$ -6.7 (с 0.2, MeOH); УФ (MeOH) λ_{max} , нм (log ϵ) 05 (4.26), 254 (4.11), 337 (2.88); ИК ν_{max} 3412, 2931, 1728, 1709, 1666, 1603 cm^{-1} .

Анализ данных ЯМР показал, что изучаемые антибиотики принадлежат к структурному семейству нафтохиноновых полиольных макролидов (Рис. 4). Для установления пространственного строения этих соединений были применены различные методы 1D и 2D ЯМР. Сравнение стереохимических особенностей и биосинтетических кластеров сходных нафтохиноновых макролидов, включая обнаруженные немного позже каниферолы А и В, позволило установить абсолютные конфигурации всех представителей семейства, в том числе и астолидов.

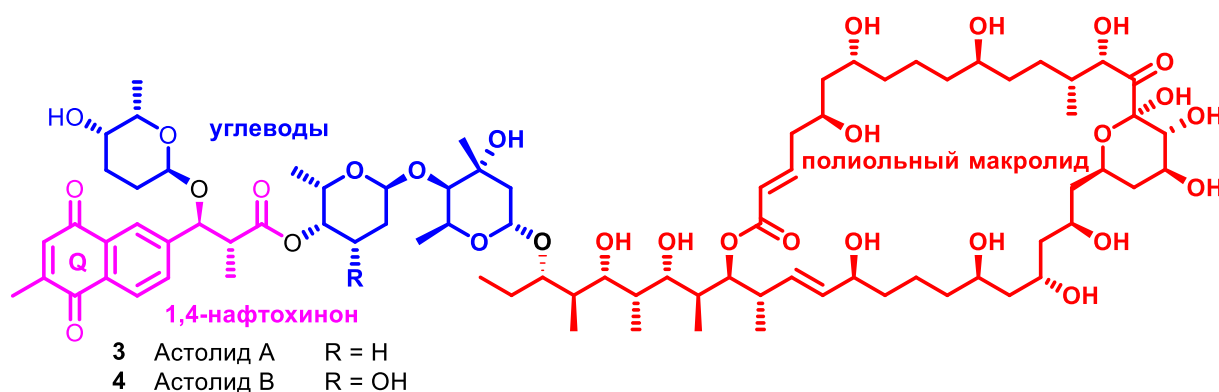


Рис. 4. Структура астолидов

Астолиды А, В проявили выраженную антифунгальную активность (0.6–5.1 мкМ) в отношении тест-штаммов грибов и дрожжей, в то время как для их ближайших структурных аналогов (PM100117 и PM100118) такой активности не сообщалось. В то же время астолиды проявляют и относительно высокую цитотоксичность без заметной селективности в отношении клеток млекопитающих (IC_{50} =0.7–3.4 мкМ в отношении линий опухолевых клеток K562, HCT116 и постнатальных фибробластов человека).

3. Выделение и изучение 20-членных макролидов структурного семейства ирумамицина

Следующим объектом исследования стал оригинальный штамм-продуцент *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812, проявляющий выраженную антибактериальную и антифунгальную активность. Антифунгальные свойства оказались обусловлены гидрофобными макролидными антибиотиками.

3.1. Выделение, очистка и разделение смеси антифунгальных макролидов, установление структуры и пространственного строения макролидов на основании данных ЯМР

Активные соединения были выделены экстракцией этилацетатом и очищены с помощью хроматографии на Sephadex LH-20 с последующей препаративной ВЭЖХ на обращенно-фазовом сорбенте (силанизированный силикагель C2). Были выделены три соединения: два основных компонента **5** и **6**, и один минорный компонент **7** (Рис. 5).

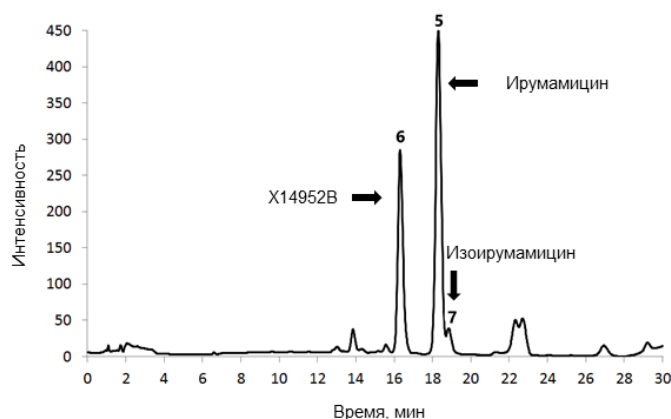


Рис. 5. Профиль ВЭЖХ антифунгальной фракции после обогащения с помощью Sephadex LH-20

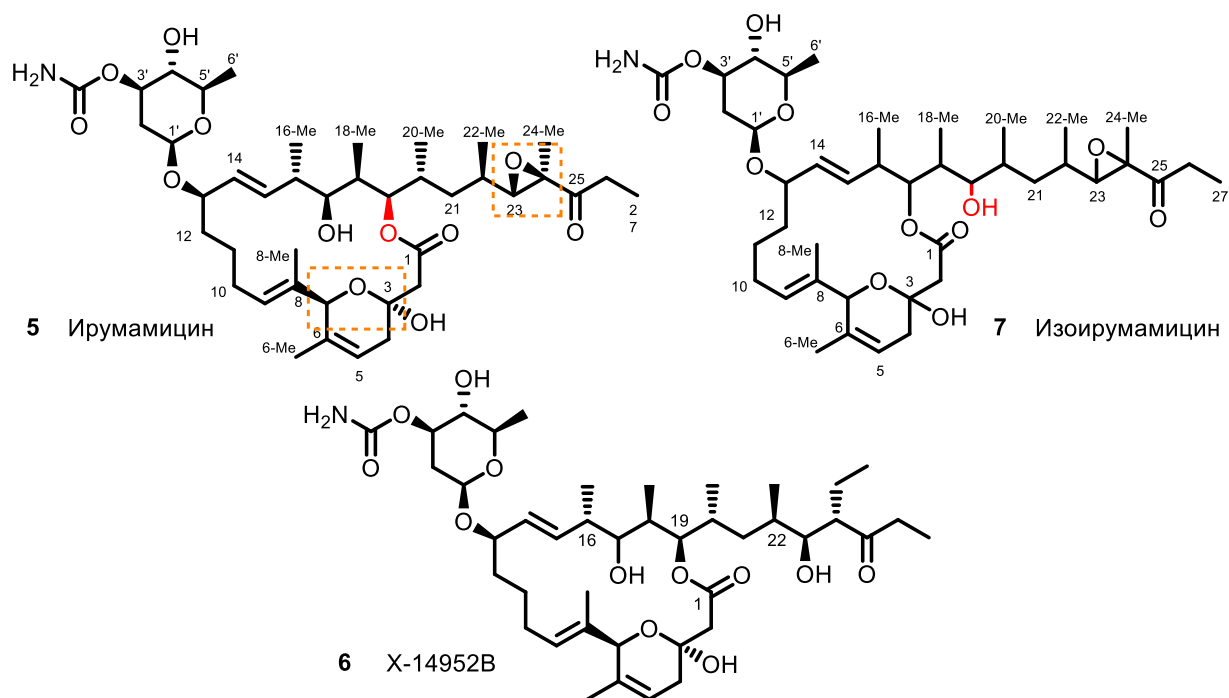


Рис. 6. Структуры ирумамицина **5**, его изомера **7** и аналога X14952B **6**. Оранжевым пунктиром отмечены фрагменты, конфигурация которых была установлена в рамках данной работы

Данные масс-спектрометрии высокого разрешения (ESI HRMS) показали, что соединения **5** и **7** имеют одинаковый состав, совпадающий с антифунгальным антибиотиком ирумамицином ($C_{41}H_{65}NO_{12}$), в то время как компонент **6** имеет брутто-формулу $C_{42}H_{69}NO_{12}$. Был получен полный набор ЯМР-спектров для всех трех этих соединений. Детальный анализ этих данных и сравнение с опубликованными спектрами показали, что основной компонент смеси **5** идентичен ирумамицину, а соединение **6** представляет собой ранее описанный антибиотик X-14952В. Третий компонент смеси **7**, имеющий ту же молекулярную формулу, что и ирумамицин, оказался новым, отличающимся от ирумамицина **5** размером цикла (Рис. 6). Подробный анализ данных ЯМР позволил установить конфигурации стереоцентров 3, 7, 23, 24 ирумамицина, ранее не описанные в литературе. Стереоконфигурацию изоирумамицина не удалось установить надежно из-за малого количества вещества.

3. 2. Биосинтез антибиотиков семейства ирумамицина

Для подтверждения стереоконфигурации хиральных центров ирумамицина и изучения его биосинтеза, был исследован биосинтетический генный кластер (biosynthetic gene cluster, BGC), предположительно ответственный за биосинтез этих соединений (Рис. 7).

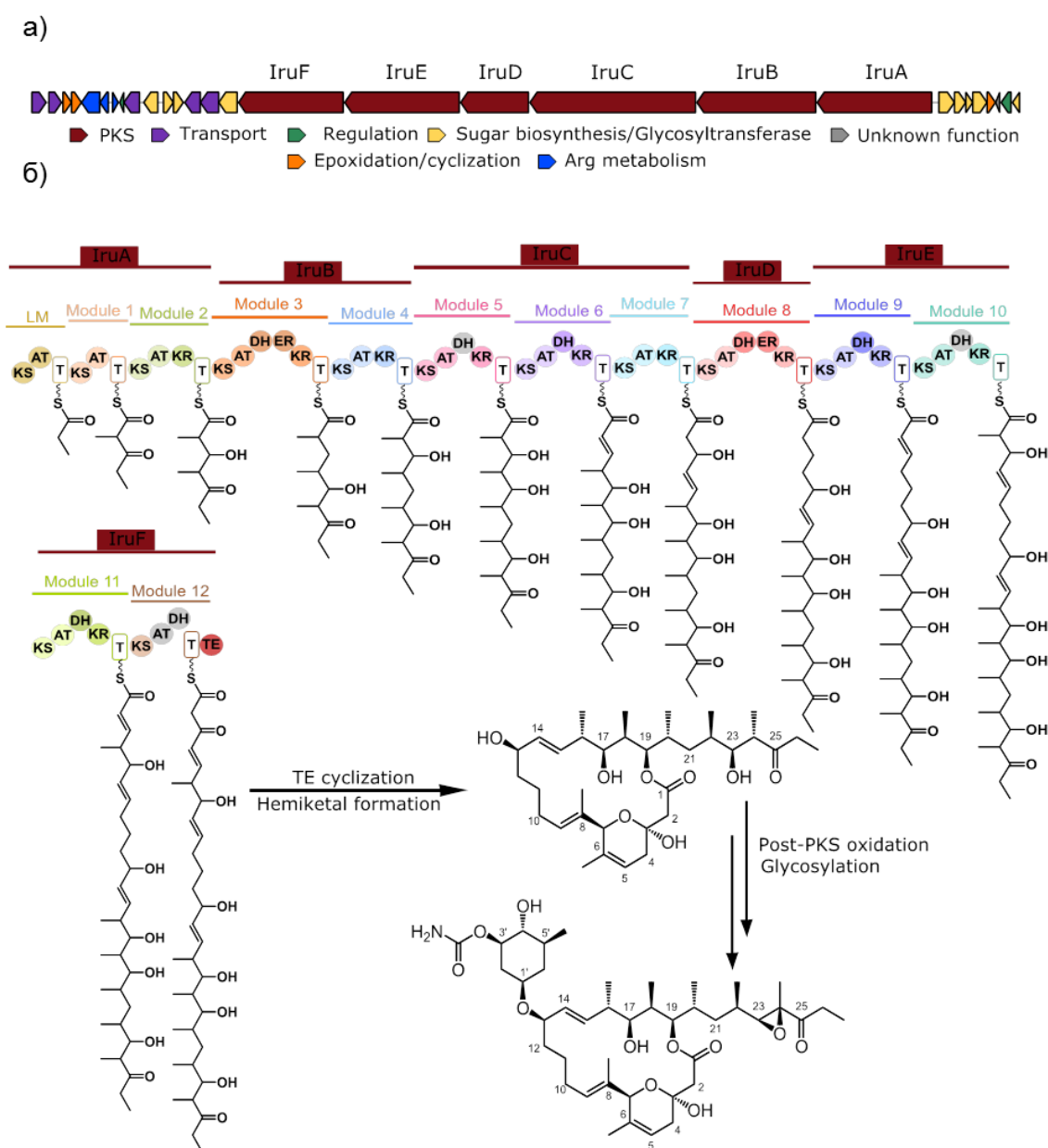


Рис. 7. Предполагаемый путь биосинтеза антибиотика ирумамицина, доменная архитектура Iru PKS

Полногеномная последовательность штамма продуцента *Streptomyces* sp. INA-Ac-5812 была проанализирована с помощью программы AntiSMASH, обнаружен генный кластер, включающий гены, кодирующие поликетидсинтазу (PKS) I типа, и предположительно ассоциированный с биосинтезом ирумамицина. Путь биосинтеза ирумамицина и родственных соединений был предложен на основании *in silico* анализа модульной организации PKS и исходя из предположительного выполнения правила коллинеарности модульных PKS (Рис. 7а). Точные границы биосинтетического генного кластера ирумамицина (*Iru* BGC) пока не известны, и для их установления требуются дополнительные эксперименты. Анализ последовательности позволил нам установить доменную архитектуру модульной PKS, включающей 12 модулей (Рис. 7б).

На схеме приведен биосинтез на примере образования ирумамицина **5**; биосинтез других обнаруженных соединений может быть обусловлен особенностями замыкания с помощью ТЕ-домена (для изоирумамицина **7**) и гибкой субстратной специфичностью АТ-домена модуля М1 (для X14952В **6**).

Анализ доменной архитектуры *Iru* PKS указывает на ряд особенностей биосинтеза ирумамицина. В том числе наблюдается аномалия субстратной специфичности ацилтрансферазного домена в модуле М8. С точки зрения анализа последовательности, АТ-домен модуля М8 представляет собой типичный домен с метилмалонатной субстратной специфичностью, который должен приводить к появлению метильной группы в положении С10. Тем не менее соответствующих продуктов обнаружено не было, что говорит о нарушении предсказанной специфичности домена. Кроме того, ацилтрансферазный домен модуля М12 не содержит каталитического центра, что говорит о том, что последний модуль *Iru* PKS не является элонгирующим. Поэтому для получения поликетидной цепочки требуемой длины предполагается механизм «заикания» предыдущего модуля.

Особенный интерес представляет тот факт, что в молекуле ирумамицина наблюдается смещение двойной связи, относительно встраиваемой классической поликетидсинтазой I типа (двойная связь наблюдается в положении С5-С6 вместо ожидаемого С4-С5), что говорит о наличии уникальной каталитической активности ферментов *Iru* BGC. Также необычным является формирование С23-С24-эпоксида, который образуется не из алкена, а из насыщенного поликетиды с гидроксильной группой. Интересно, что при образовании родственного поликетиды X14952В **6**, эпексидирования не наблюдалось и был выделен исключительно продукт **6** с гидроксильной группой в положении 23.

Было подтверждено, что абсолютная конфигурация, предсказанная исходя из типов кеторедуктазных доменов, полностью согласуется с установленной ранее на основании данных ЯМР-спектроскопии (Рис. 8).

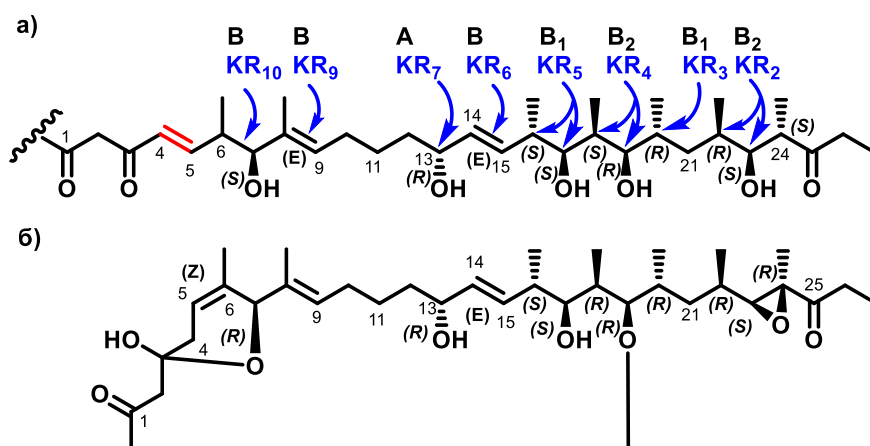


Рис. 8. Сравнение абсолютной конфигурации и структуры агликона ирумамицина, предсказанной на основании биосинтеза (а) и известной ранее из ЯМР-исследований (б). Кеторедуктазные домены, определяющие стереохимию восстановления, отмечены синим. Следует отметить, что дескриптор конфигурации центров С24 и С7 изменяется в связи с миграцией двойной связи, гликозилированием и образованием эпоксида в конечной структуре

3. 3. Биологическая активность и механизм действия 20-членных макролидов

Антибиотическая активность выделенных индивидуальных компонентов **5** и **6** в отношении ряда тест-штаммов микроорганизмов коррелирует с опубликованными данными. Антифунгальные свойства изоирумамицина **7** оказались менее выраженными, чем у ирумамицина **5**, в отношении *A. niger* и *F. oxysporum*. Это свидетельствует о важности размера цикла выделенных соединений для свойств антибиотиков. В отношении остальных тест-культур все три соединения проявили низкую активность.

Таблица 1

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) ирумамицина **5**, X-14952В **6** и изоирумамицина **7** в отношении различных микроорганизмов

Микроорганизм	МИК, мкМ		
	Ирумамицин 5	X-14952В 6	Изоирумамицин 7
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	1–3	10–20	21–42
<i>Fusarium oxysporum</i> VKM F-140	5	>41	>42
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	21–42	41	42
<i>Cryptococcus humicolus</i> ATCC 9949	21–42	41	42
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> INA S-1	42	>41	>42
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	21	20–41	42
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 21027	>42	>41	>42
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>42	>41	>42

Были также получены цитотоксические характеристики выделенных соединений (Таблица 2) в отношении опухолевых и нормальных клеток. Все соединения показали умеренную или низкую цитотоксичность без существенной селективности. Интересно, что изомерия макролактонного кольца не повлияла на взаимодействие соединения с клеточными линиями: ирумамицин **5** проявляет цитотоксичность, близкую к таковой для изоирумамицина **7**.

Таблица 2

Цитотоксичность (IC₅₀) ирумамицина **5**, X-14952В **6** и изоирумамицина **7** в отношении нескольких линий опухолевых клеток и постнатальных фибробластов человека

Клеточная линия	IC ₅₀ , мкМ		
	Ирумамицин 5	X-14952В 6	Изоирумамицин 7
HCT-116	10.8±1.3	10.0±1.4	11.0±1.5
MCF-7	14.5±1.7	17.5±1.9	18.7±1.9
K-562	5.5±0.8	4.5±0.5	4.5±0.5
HPF	8.5±1.3	15.0±1.8	14.0±1.4

Чтобы проверить гипотезу о том, что ирумамицин является ингибитором митохондриальной АТФазы из грибов (как некоторые родственные 20-членные макролиды и олигомицин), были выделены субмитохондриальные частицы из *Saccharomyces cerevisiae* и проанализировано ингибирование АТФазы ирумамицином **5** по сравнению с олигомицином и X14953В **6**. Действительно, было обнаружено, что IC₅₀ всех трех соединений очень близки (ирумамицин — 0.067±0.02 мкМ, X14953В — 0.05±0.01 мкМ, олигомицин — 0.05±0.02 мкМ), что указывает на то, что ирумамицин и X14953В являются мощными ингибиторами дрожжевой F₁F₀-АТФазы.

4. Выделение и установление структуры компонентов липогликопептидного антибиотического комплекса гауземицинов

Первичный скрининг выявил, что оригинальный штамм-продуцент *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980 продуцирует перспективные соединения пептидной природы с антибактериальной активностью. В результате фракционирования было обнаружено, что наиболее интересными являются компоненты, обладающие голубой флуоресценцией. Новый антибиотик был назван гауземицином (в честь Г.Ф. Гаузе — основателя Института по изысканию новых антибиотиков).

4. 1. Выделение, анализ компонентного состава и флуоресцентных свойств

На первых стадиях разделение осуществлялось с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ, для которой были подобраны условия, обеспечивающие наилучшее разделение четырех групп пиков (Рис. 9). Наибольшую активность проявила первая группа пиков с временем удерживания 10–12 мин.

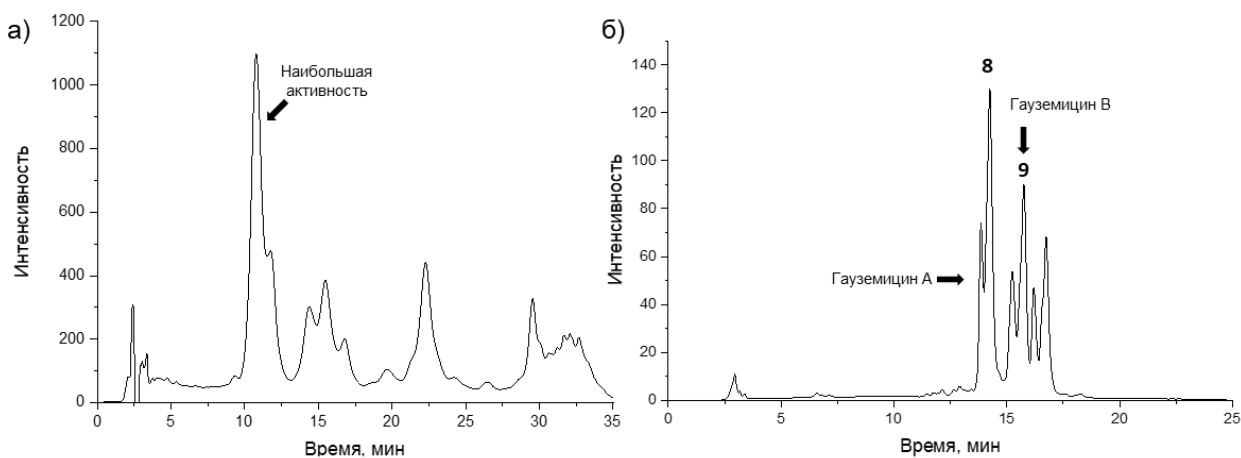


Рис. 9

а — профиль аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ концентрата в оптимизированных условиях;
б — профиль нормальнофазовой ВЭЖХ первой группы пиков с обращенной фазы

Согласно данным масс-спектрометрического анализа, эта фракция содержит три компонента — соединения с массами 1847, 1916 и 1930 Да. Для наработки индивидуальных компонентов из первой группы пиков были подобраны условия для нормальнофазовой хроматографии, при котором наблюдалось удвоение пиков каждого из соединений (Рис. 9), что может быть связано с наличием различных конформеров, взаимопревращение которых затруднено. Удалось выделить и наработать для структурной характеристики два компонента смеси с массами 1847 Да и 1916 Да, названные гауземицинами А, В (8, 9) соответственно.

В результате исследования компонентного состава антибиотика было обнаружено, что индивидуальные соединения имеют пептидную природу и обладают собственной флуоресценцией. Для выяснения природы этой флуоресценции был изучен аминокислотный состав антибиотика. Гидролиз антибиотического комплекса проводили по стандартному методу для гидролиза пептидов (нагрев в 6М HCl в запаянной ампуле при 110°C в течение 120 ч), флуоресцентная фракция была выделена с помощью препаративной ТСХ и оф-ВЭЖХ, что позволило получить флуоресцентную аминокислоту в индивидуальном виде. Масс-спектр высокого разрешения этого соединения показал, что оно имеет точную массу 243.0536 Да и состав C₁₀H₁₁ClN₂O₃. Наличие одного атома хлора в молекуле дополнительно подтверждается характерным изотопным распределением в масс-спектре, обусловленным природным содержанием ³⁵Cl и ³⁷Cl. Выделенное соединение является α-аминокислотой H₂N-CHR-CO₂H, поэтому оно должно содержать боковой радикал R, имеющий состав C₈H₇ClNO и 5 степеней ненасыщенности. Учитывая наличие голубой флуоресценции, предположили, что соединение имеет структуру хлорзамещенного кинуренина (Рис. 10).

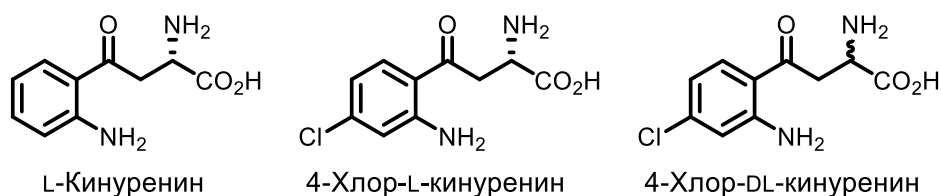


Рис. 10. Структурные формулы кинуренина его хлор-замещенных аналогов

4-Хлор-L-кинуренин (L-4-ClКуп) был ранее обнаружен только в одном природном пептиде – таромицине, а 4-хлор-DL-кинуренин изучался в качестве антидепрессанта (Рис. 10). Тем не менее, флуоресцентные свойства L-4-ClКуп или DL-4-ClКуп ранее не были описаны ни для синтетических, ни для природных соединений. Был синтезирован 4-DL-ClКуп, который имел идентичные с выделенным соединением физико-химические характеристики: молекулярную формулу, время удерживания на ВЭЖХ и спектр флуоресценции. Используя метод Мерфи, была определена стереоконфигурация аминокислоты, полученной из гидролизата. Синтетический рацемический 4-DL-ClКуп был использован в качестве стандартного соединения в методе Мерфи, чтобы установить абсолютную конфигурацию природного соединения. Согласно литературным данным, производное D-хлоркинуренина с реагентом Мерфи L-FDAA удерживается на ВЭЖХ дольше, чем производное L-аминокислоты. Время удерживания производных природных и синтетических образцов 4-DL-ClКуп выявило L-конфигурацию природного соединения.

Спектральные и фотофизические свойства синтетического 4-DL-ClКуп были изучены в различных растворителях (Рис. 11).

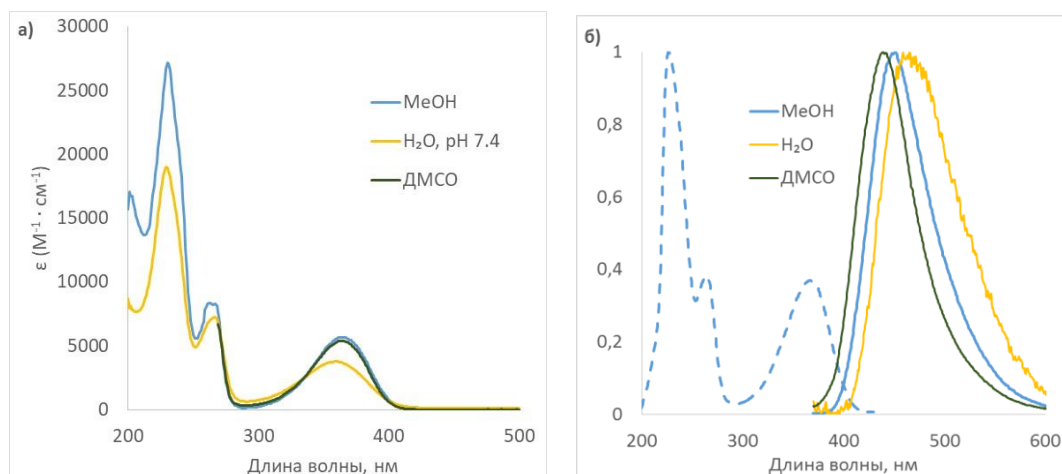


Рис. 11. Спектры 4-хлоркинуренина в различных растворителях:

a — UV-Vis спектр;

b — нормализованный спектр возбуждения (пунктирная линия) и спектр флуоресценции, с $5 \cdot 10^{-5}$ М, λ_{em} для возбуждения 448 нм, λ_{ex} для испускания 360 нм

Собственная флуоресценция хлоркинуренина имеет низкую интенсивность. Было установлено, что производные перилена являются лучшим акцептором флуоресценции L-4-ClКуп, чем красители на основе BODIPY из-за частичного тушения флуоресценции последних. В перспективе накопленные данные о флуоресцентных свойствах L-4-ClКуп могут служить основой для создания удобных инструментов для визуализации природных пептидов, включающих эту аминокислоту.

4. 2. Установление структуры индивидуальных компонентов антибиотического комплекса

Гауземицины А, В были получены в виде твердых веществ белого цвета, и с помощью ESI HRMS было определено, что их точные массы составляют 1845.788 Да и 1916.826 Да, что соответствует молекулярным составам $C_{84}H_{116}ClN_{17}O_{28}$ и $C_{87}H_{121}ClN_{18}O_{29}$, соответственно.

Структуры гауземицинов А, В (Рис. 12) были определены из данных ЯМР-спектроскопии; эксперименты проведены в $DMSO-d_6$ при 30 и 45°C. Корректность определения состава компонентов подтверждена определением тонкой изотопной структуры для гауземицина В.

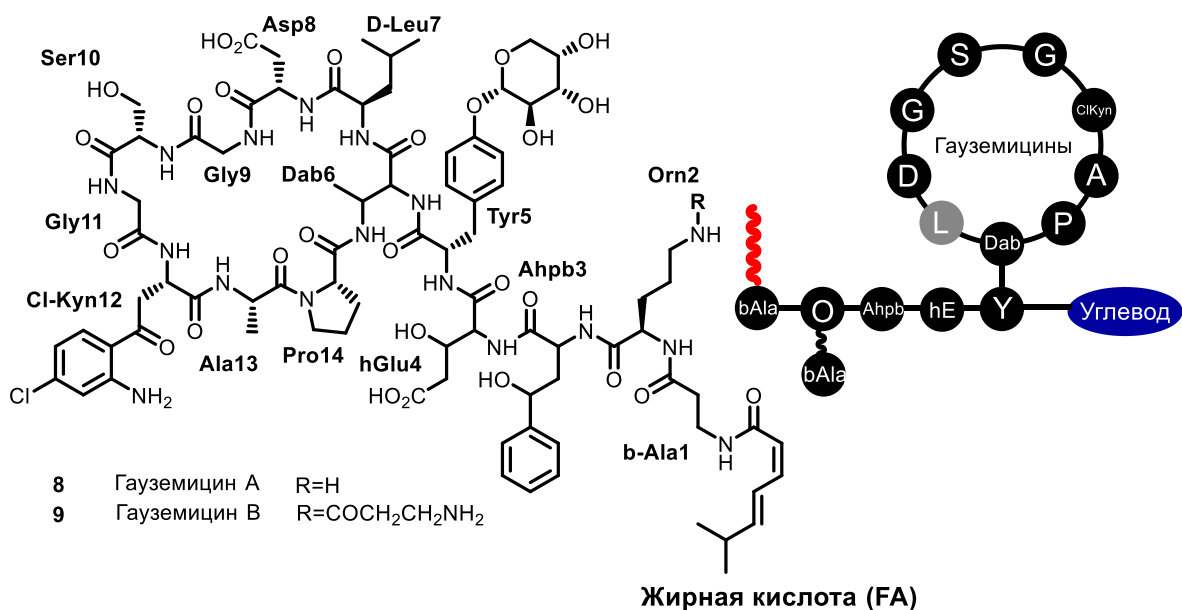


Рис. 12. Структуры индивидуальных компонентов антибиотического комплекса — гауземицинов А (8) и В (9)

Аминокислотный состав и предполагаемая структура подтверждались с помощью спектров масс-фрагментации. Метод MS/MS FTICR позволяет проверять структуру соединений с использованием CID-фрагментации родительского иона с идентификацией аминокислотной последовательности и необычных заместителей по точной массе. Предлагаемая фрагментация гауземицина В представлена ниже. Участки в пептидных связях, которые подвергаются фрагментации под действием CID, выделены пунктирными линиями. Ожидалась типичная картина у-фрагментации пептида.

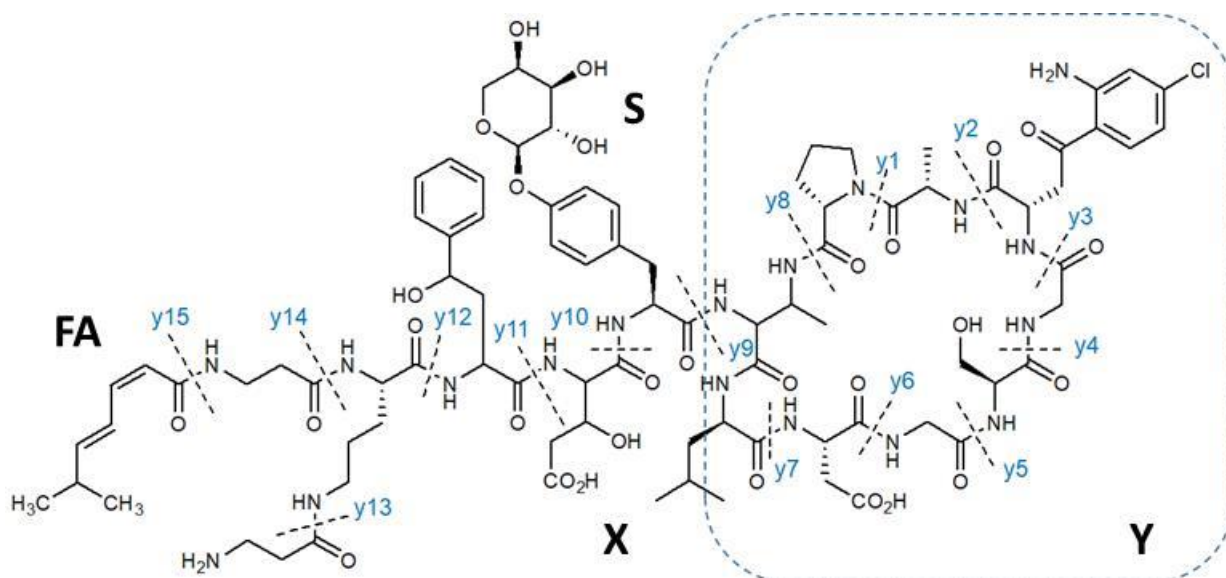


Рис. 13. Фрагментация гауземицина В 9. X соответствует целой молекуле, Y — ее циклическому фрагменту; A, S соответствуют олефиновому и углеводному фрагментам соответственно. Пунктирные линии указывают места фрагментации в MS/MS

При низких энергиях обнаружено разделение циклического и линейного фрагментов. Отщепление углеводного фрагмента происходило при 10 эВ. Фрагментация циклического фрагмента наблюдается только при высокой энергии столкновения. Расщепление цикла может происходить почти по любой пептидной связи. Было обнаружено, что в основном цикл расщепляется по связи пролин-аланин (y8-y1), а дальнейшая идентификация последовательности по точной массе фрагмента и разнице масс позволила подтвердить предложенную структуру (Таблица 3).

Таблица 3

ESI-MS/MS данные для соединения **9** (m/z , $[M+2H]^{2+}=959.41873$).
Фрагментация ($CV = 10-40$ эВ) и структурное отнесение

Масса фрагмента, m/z	CV	Молекулярная формула	Заряд, z	Родительский ион, m/z	ΔM , Да	Отщепленный фрагмент	Структурное отнесение
959.41814	0 эВ	$C_{87}H_{123}Cl_1N_{18}O_{29}$	2				X=[M+2H]
950.41295	10 эВ		2	959.41818	18.01046	H ₂ O	[X-H ₂ O]
893.39710	10 эВ		2	959.41818	132.04216	C ₅ H ₈ O ₄	[X-S]
701.34925	25 эВ	C ₃₄ H ₄₉ N ₆ O ₁₀	1				[X-Y-y10]
683.33940	25 эВ	C ₃₄ H ₄₇ N ₆ O ₉	1	701.34925	18.00985	H ₂ O	[X-Y-y10-H ₂ O]
556.31265	25 эВ	C ₂₉ H ₄₂ N ₅ O ₆	1	683.33940	127.02675	C ₃ H ₅ NO ₃	[X-Y-y10-y11]
538.30171	25 эВ	C ₂₉ H ₄₀ N ₅ O ₅	1	556.31265	18.01094	H ₂ O	[X-Y-y10-y11-H ₂ O]
379.23335	25 эВ	C ₁₉ H ₃₁ N ₄ O ₄	1	556.31265	177.07930	C ₁₀ H ₁₁ NO ₂	[X-Y-y10-y11-y12]
665.32861	30 эВ	C ₃₄ H ₄₅ N ₆ O ₈	1	683.33965	18.01104	H ₂ O	[X-Y-y10-2H ₂ O]
308.19620	30 эВ	C ₁₆ H ₂₆ N ₃ O ₃	1	379.23339	71.03719	C ₃ H ₅ NO	[X-Y-y10-y11-y12-y13]
1085.44421	30 эВ	C ₄₈ H ₆₆ Cl ₁ N ₁₂ O ₁₅	1	922.38131	163.06390	C ₉ H ₉ NO ₂	[Y+y10-S]
Фрагментация циклопептидного фрагмента							
922.38131	40 эВ	C ₃₉ H ₅₇ Cl ₁ N ₁₁ O ₁₃	1				Y
904.37063	40 эВ	C ₃₉ H ₅₅ Cl ₁ N ₁₁ O ₁₂	1	922.38131	18.01068	H ₂ O	Y-H ₂ O
851.34448	40 эВ	C ₃₆ H ₅₂ Cl ₁ N ₁₀ O ₁₂	1	922.38131	71.03683	C ₃ H ₅ NO	Y-y1
627.30942	40 эВ	C ₂₆ H ₄₃ N ₈ O ₁₀	1	851.3448	224.07548	C ₁₀ H ₉ ClN ₂ O ₂	Y-y1-y2
570.28766	40 эВ	C ₂₄ H ₄₀ N ₇ O ₉	1	627.30942	57.02176	C ₂ H ₃ NO	Y-y1-y2-y3
483.25553	40 эВ	C ₂₁ H ₃₅ N ₆ O ₇	1	570.28766	87.03213	C ₃ H ₅ NO ₂	Y-y1-y2-y3-y4
426.23418	40 эВ	C ₁₉ H ₃₂ N ₅ O ₆	1	483.25553	57.02135	C ₂ H ₃ NO	Y-y1-y2-y3-y4-y5
382.24483	40 эВ	C ₁₈ H ₃₂ N ₅ O ₄		426.23418	43.98935	CO ₂	Y-y1-y2-y3-y4-y5-CO ₂
311.20666	40 эВ	C ₁₅ H ₂₇ N ₄ O ₃	1	426.23418	115.02752	C ₄ H ₅ NO ₃	Y-y1-y2-y3-y4-y5-y6

Дериватизация продуктов гидролиза индивидуальных компонентов по методу Мерфи позволила установить абсолютные конфигурации большинства аминокислотных остатков. 2-Амино-4-гидрокси-4-фенилмасляная кислота (Ahrb3) и гидроксиглутаминовая кислота (hGlu4) разлагались в условиях кислотного гидролиза (6M HCl, 110°C, 120 ч), другие аминокислоты давали нормальные продукты дериватизации. D-Конфигурация была идентифицирована только для остатка Leu7. L-Конфигурация фрагмента арабинозы была идентифицирована с помощью мягкого кислотного гидролиза (2M TFA, 50°C, 6 ч) гауземицина А и последующего сравнения оптического вращения выделенного углеводного материала с D- и L-арабинозой.

Окончательное подтверждение структуры проводилось на основании данных ЯМР. Характерный паттерн сигналов в спектрах 2D TOCSY, NOESY и естественного содержания ¹⁵N-¹³C-HSQC. Спиновые системы отдельных остатков и соответствующие типы остатков были идентифицированы в спектрах ¹³C-HSQC 2D TOCSY, COSY. Также использовалась информация из спектров ¹³C-NMBC и ¹³C-HSQC. На основании полученных данных ЯМР была обнаружена и описана конформационная неоднородность гауземицинов в растворе, обусловленная конформационной изменчивостью пролина.

Таким образом, было обнаружено, что гауземицины представляют собой макроциклические пептиды, содержащие 14 аминокислот, включая непротеиногенные остатки, в том числе и остатки с D-конфигурацией. Некоторые структурные мотивы в молекулах гауземицина очень редки для биологически активных природных продуктов. Гликозилирование остатка тирозина довольно необычно для природных пептидов, и нет примеров гликозилирования пептидами. Сама по себе арабиноза представляет собой редкий фрагмент для природных гликопептидов и в основном встречается в виде производных O-гидроксипролина. Таким образом, гликозилирование тирозина арабинозой в гауземицинах является уникальной структурной особенностью среди природных продуктов. β -Гидроксиглутаминовая кислота (hGlu4, Рис. 12) является редкой в природных пептидах и встречается в виде различных диастереомеров. 3-Амино-4-гидрокси-4-фенилбутановая кислота (Ahp3) и N ϵ -(β -аланиноил)орнитин (Orn2) (Рис. 12) ранее в составе природных пептидов не обнаруживали.

4. 3. Биосинтез гауземицинов

Изучение биосинтеза гауземицинов представляло интерес в связи с высокой структурной новизной выделенных соединений. Анализ генома выявил большой (68 ORF) кластер биосинтетических генов NRPS (BGC), который был назван *Gau* BGC (Рис. 14). Была проанализирована общая архитектура и сходство белков в кластере *Gau*, сравнив его с известными кластерами родственных соединений. Четыре основных гена NRPS гауземицина BGC содержат 14 модулей, ответственных за введение β -Ala1-Orn2-Ahp3-hGlu4-Tyr5-D-Leu7 (*gauA*), Dab6 (*gauB*), аминокислоты Asp8-Gly9-Ser10-Gly11-ClKyn12 (*gauC*) и Ala13-Pro14 (*gauD*). В целом анализ доменной архитектуры *Gau* BGC коррелирует со структурными данными по гауземицинам, что подтверждает их структуру, а также содержит ряд особенностей.

Как и многие гомологичные кластеры, *Gau* BGC имеет специальный модуль, взаимодействующий *in trans* с соответствующими дидоменом А-Т (*GauB*), включающими остаток 2,3-диаминобутановой кислоты, участвующий в образовании макролактама. Биосинтез 2,3-Dab кодируется в геноме за пределами *Gau* BGC. Тем не менее, эти открытые рамки считывания сходны с генами, обеспечивающими биосинтез 2,3-Dab в родственных BGC малацидина, фриулимицина и ласпартомицина.

Последний модуль в белке *GauC*, интегрирующий остаток 4-Cl-кинурина, содержит домен эпимеризации, что позволяет предположить D-конфигурацию этой аминокислоты, что расходится с предыдущими данными. Не было обнаружено производного Мерфи, соответствующего D-4-Cl-Kyn в спектрах LCMS дериватизата продуктов гидролиза гауземицинов ни для отдельных компонентов, ни для концентрата антибиотика. Так как домен эпимеризации обеспечивает смесь конфигураций, можно предположить, что нижележащий домен С представляет собой 1C_L -катализатор и избирательно реагирует с цепями, заканчивающимися хлорированным кинуренином в L-конфигурации, обеспечивая наблюдаемый стереохимический результат.

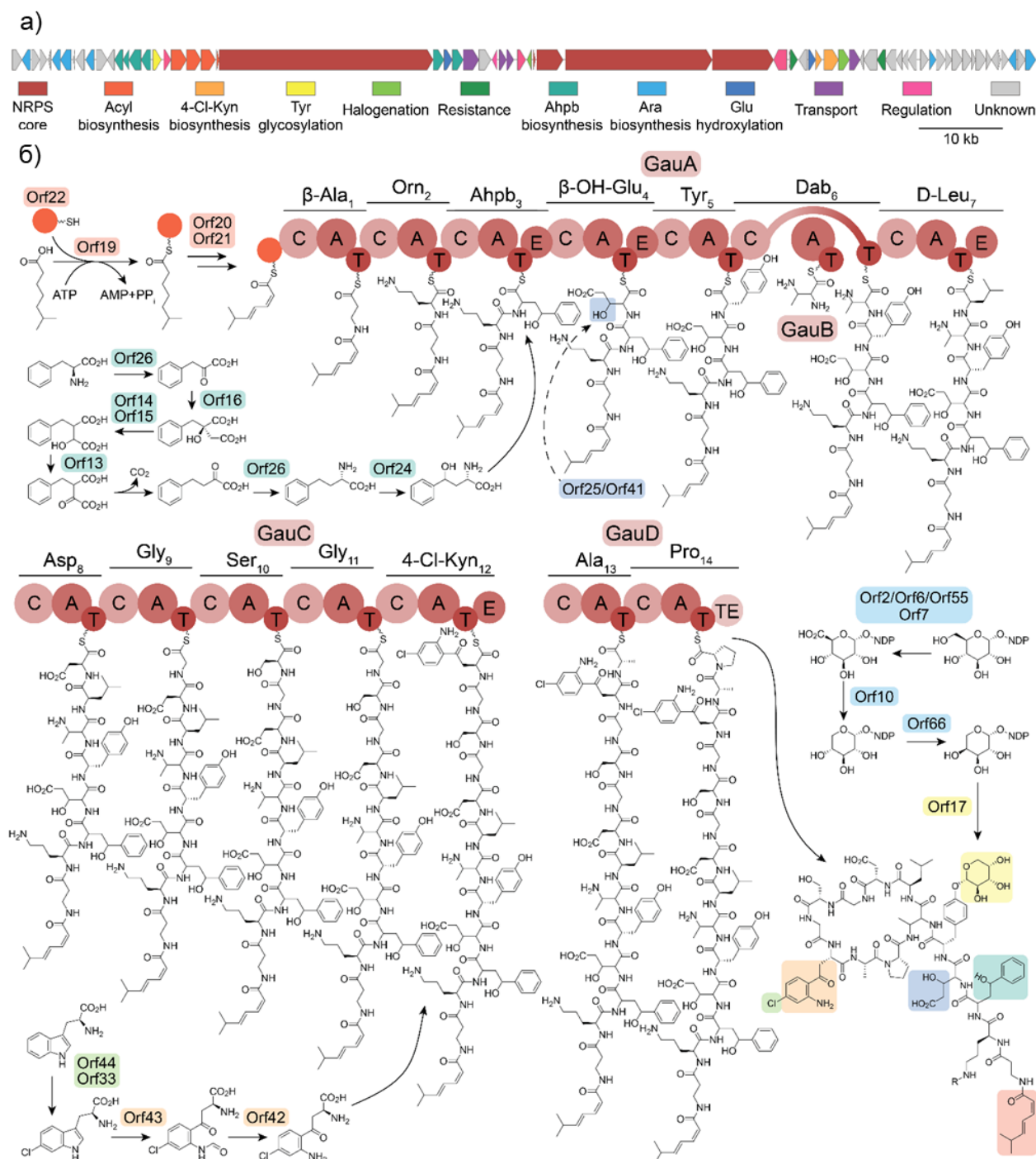


Рис. 14

a — фрагмент предсказанного Gau BGC (Orf1–Orf62) с некоторыми из предложенных функций; *b* — модульная архитектура линии сборки гауземицина NRPS и предлагаемый биосинтез (на примере гауземицина А 8).
A — домен аденилирования; **C** — домен конденсации; **E** — домен эпимеризации; **T** — тиоляционный домен; **TE** — домен тиоэстеразы. NDP указывает, что нуклеотид не может быть определен

Особенный интерес представляет биосинтез неизвестной ранее в природных пептидах аминокислоты — 2-амино-4-гидрокси-4-фенилбутановой кислоты (Ahrb3). Ahrb3 не подвергался хлорированию ни в одной из полученных структур, включая те второстепенные компоненты, которые были обнаружены с помощью масс-спектров. Следовательно, Ahrb3 весьма вероятно не является продуктом модификации триптофана. В таком случае наиболее вероятно, что предшественником Ahrb3 является фенилаланин и биосинтез протекает с образованием го-мофенилаланина. Чтобы подтвердить участие фенилаланина в качестве субстрата для биосинтеза гауземицинов, в культуральную жидкость при культивировании *Streptomyces* sp. INA-Ac-

5812 были добавляли фторированные производные фенилаланина (2-F-Phe, 4-F-Phe). Действительно, анализ LCMS показал, что в молекулы гауземицинов включался один атом фтора, для каждого из компонентов наблюдалось появление монофторированного аналога (Рис. 15). Включение было проиллюстрировано появлением интенсивных ионов с m/z 932.9 и 968.4 (по сравнению с исходными значениями m/z 923.9 и 959.4), соответствующих монофторированным молекулам гауземицинов А и В, соответственно. Положение включения фтора было подтверждено с помощью фрагментации пептидов с помощью LCMS/MS. Прирост массы ^{19}F на 18 Да наблюдался в ионе фрагмента FA- β Ala1-Orn2(β Ala)-[F]Ahp3, но не в последующем фрагменте FA- β Ala1-Orn2(β Ala).

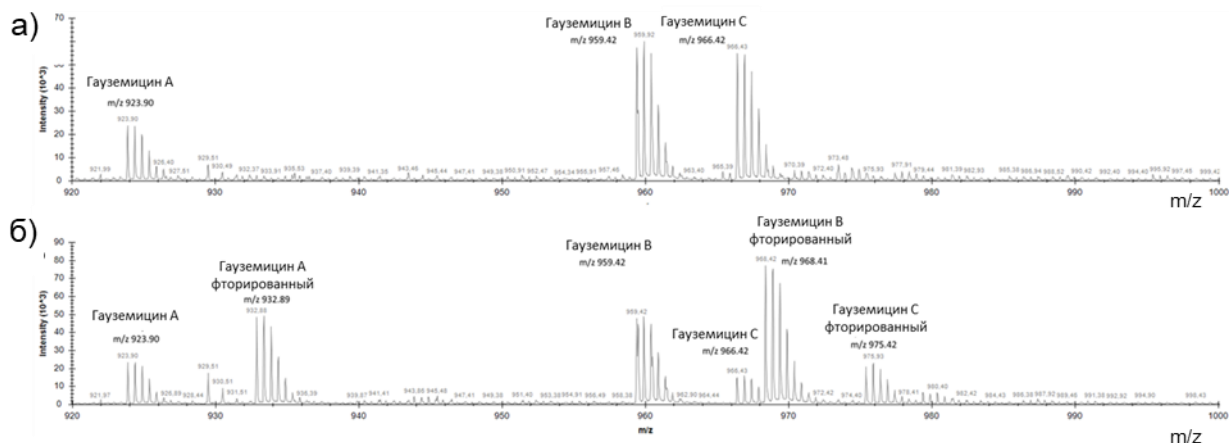


Рис. 15. Сравнение ключевых областей масс-спектра экстракта культуральной жидкости штамма-продуцента *Streptomyces sp.*

а — INA-Ac-5812 при культивировании без добавок модифицированных аминокислот;
б — с добавлением в среду при культивировании фтор-фенилаланина до конечной концентрации 2 мМ

4. 4. Антибиотическая активность гауземицинов

Гауземицины — это циклические липогликопептиды, похожие на анионные липопептиды, но с существенно отличающейся пептидной последовательностью. Более того, гауземицины не содержат классического Ca^{2+} -связывающего мотива DXDG, характерного для кальций-зависимых антибиотиков. Было обнаружено, что при добавлении 0.45 мМ Ca^{2+} МИК не претерпевает существенных изменений. Гауземицины обладают выраженной активностью в отношении некоторых грамположительных бактерий (на уровне 0.25–1 мкг/мл), в том числе метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), но они оказались неактивными в отношении грамотрицательных бактерий и энтерококков. Интересно, что гауземицины не проявляли антибактериальной активности против как ванкомицин-резистентных, так и чувствительных к ванкомицину *Enterococcus sp.* штаммов.

Для дальнейшей оценки клинических перспектив полученных соединений была протестирована активность гауземицинов против 62 клинических изолятов *Staphylococcus sp.*, в некоторых случаях наблюдалась МИК значительно ниже, чем у гликопептидов и даже даптомицина (0.125–1.0 мкг/мл). Коагулазонегативные стафилококки, включая метициллин-чувствительные (MSSA) и метициллин-резистентные штаммы (MRSA), также чувствительны к гауземицину. Существенной разницы в активности гауземицинов А и В против MSSA и MRSA не наблюдалось. Цитотоксическую активность гауземицинов А и В анализировали на панели клеток млекопитающих (опухолевые клетки COLO357, EL-4, Colon26, HT-29 и нормальные клетки J774) с использованием теста МТТ. Измеренные значения IC_{50} (5–10 мкг/мл) были значительно выше МИК, что указывает на относительно большой терапевтический индекс.

Чтобы получить общее представление о механизме действия гауземицинов, был использован подход ВСП (бактериальное цитологическое профилирование) (Рис. 16). Первоначально этот метод был разработан для штамма *Escherichia coli* в качестве тестового микроорганизма. Поскольку гауземицины неактивны в отношении *E. coli* дикого типа, ΔtolC *E. coli* и

даже мутантного штамма lptD с проницаемым внешним барьером, применяли модифицированный подход с использованием в качестве тест-микроорганизма *Bacillus subtilis*. Тестовый штамм обрабатывали 2.5 МИК различных антибиотиков, включая ингибиторы репликации ДНК (рифампицин и цiproфлоксацин), ингибиторы биосинтеза клеточной стенки (ванкомицин, бензилпенициллин), ингибитор синтеза белков (хлорамфеникол), мембраноактивные соединения (грамицидин S, даптомицин, низин) и гауземицином в течение 2 ч. В этом эксперименте обработка гауземицином, а также мембраноактивными антибиотиками (грамицидин S, даптомицин, низин), приводила к почти полному лизису клеток с обнаружением только единичных клеток с видимым разрушением мембраны (Рис. 16). При этом в случае обработки культуры другими антибиотиками были заметны характерные морфологические изменения, лизиса клеток не наблюдалось.

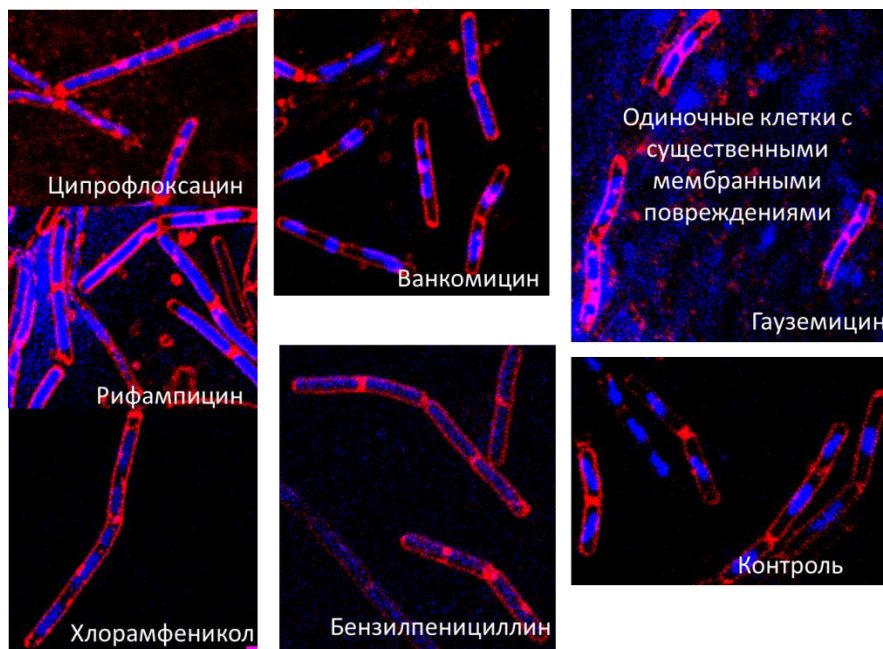


Рис. 16. Культура *Bacillus subtilis* после обработки 2.5 МИК различных антибиотиков. Морфологические изменения визуализировали с помощью флуоресцентных красителей (FM4-63, красный, окрашивает мембраны и DAPI, синий, окрашивает нуклеиновые кислоты). В случае мембраноактивных соединений наблюдался полный лизис культуры

Связывание с прекурсорами биосинтеза клеточной стенки, в том числе и с липидом II, приводит к накоплению последнего растворимого в цитоплазме предшественника — UDP-N-АсMur-PP. Изучено накопление этого соединения под действием гауземицина (Рис. 17). В случае ванкомицина наблюдается отчетливое накопление пика с временем удерживания 29 мин по сравнению с контролем и гауземицином В. Природа детектированного вещества подтверждена с помощью LCMS, масса соединения с временем удерживания 29 мин совпала с расчетной массой для UDP-N-АсMur-PP ($[M+H]^+ = 1150.4$). Этот результат подтверждает выводы, сделанные из цитологического профилирования, что гауземицин не влияет на пул предшественников биосинтеза клеточной стенки.

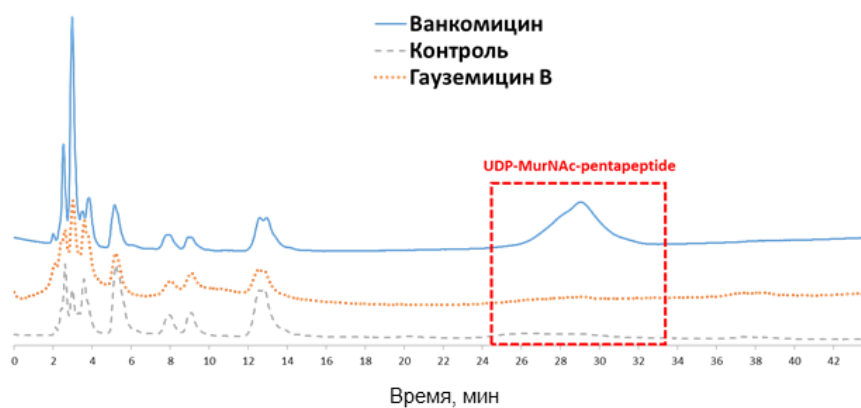


Рис. 17. Профиль ВЭЖХ экстракта культуры *S. aureus* при обработке ванкомицином и гауземицином В. Красным отмечено время удерживания UDP-N-AcMur-PP

Таким образом, гауземицины обладают сходным механизмом действия с мембраноактивными соединениями, такими как даптомицин. Клетки *B. subtilis* обрабатывали антибиотиком с более низкой концентрацией (1 МИК) и визуализировали после различных периодов обработки (Рис. 18). Был использован краситель SYTOX Green, окрашивающий нуклеиновые кислоты, но не способный проходить через неповрежденную мембрану, и FM 4-64, окрашивающий мембраны с красной флуоресценцией. Скорость мембранной проницаемости при обработке гауземицином была аналогична таковой в случае даптомицина, тогда как низин, который не только связывает молекулы липида II, но также образует мультимерные трансмембранные поры в комплексе с липидом II, вызывает более быстрое повреждение мембраны, что приводит к полному лизису клеток через 60 мин после обработки. Таким образом, среди мембрано-активных соединений наиболее сходным с гауземицинами по кинетике оказался даптомицин.

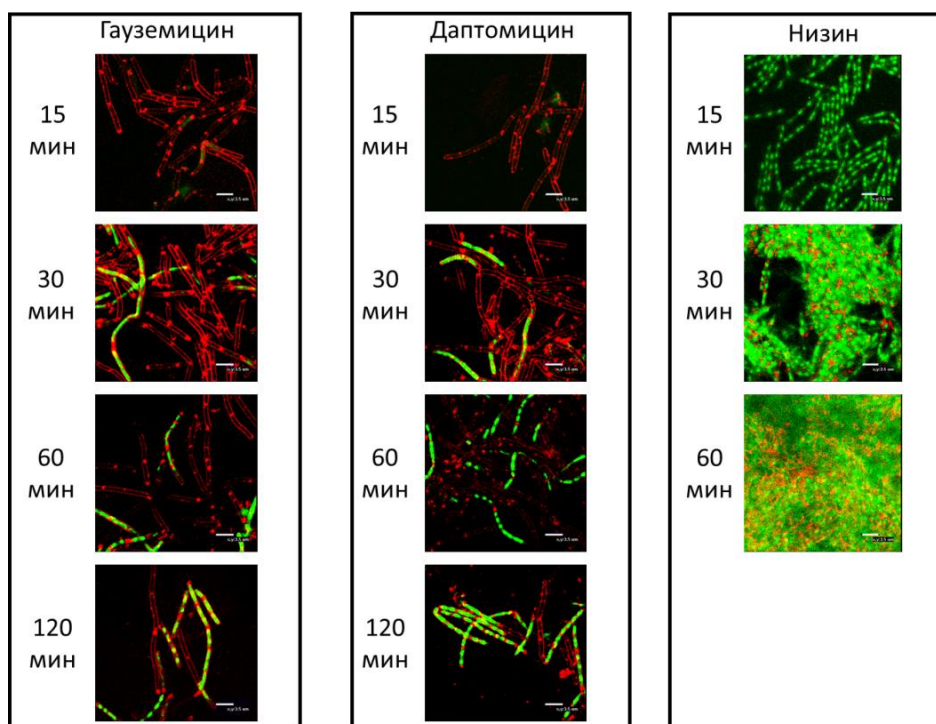


Рис. 18. Культура *B. subtilis* после обработки мембраноактивными антибиотиками в концентрации 1 МИК через указанные промежутки времени после обработки. Морфологические изменения визуализировали с помощью флуоресцентных красителей (FM4-63, красный, окрашивает мембраны и SYTOX Green, зеленый, окрашивает нуклеиновые кислоты, но не проникает через неповрежденные мембраны).

Было изучено влияние гауземицина В на ионную проницаемость в плоских липидных бислоях, состоящих из DOPE/DOPG (1:1) и DOPC/DOPG (1:1). Сравнение пороговых концентраций в модельных мембранах с типичным диапазоном концентраций антибиотической активности показало, что гауземицин В нарушает целостность мембраны и формирует ионные каналы только при высоких концентрациях. Вероятно, гауземицин специфически взаимодействует с какой-то молекулярной мишенью в мембранах чувствительных микроорганизмов, и это взаимодействие значительно увеличивает его порообразующую активность (снижает пороговую концентрацию на порядок). Помимо относительно низкой порообразующей способности, гауземицины обладают другим спектром активности по сравнению с даптомицином. В отличие от гауземицинов, даптомицин имеет сопоставимые МИК в отношении стафилококков и энтерококков.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что антибиотик, продуцируемый *S. griseorubens* INA 00887, ранее известный как кристалломицин, является двухкомпонентным и идентичен аспартоцинам В, С, что подтверждено как совпадением спектральных данных, так и схожестью биологических свойств.

2. Обнаружено, что антифунгальные вторичные метаболиты штамма *S. hygroscopicus* ВКПМ Ас2079 представляют собой близкие к известным макролиды, содержащие два агликона: 36-членный полиольный макролид и производное 1,4-нафтохинона, названные астолидами.

3. Наряду с известными 20-членными антифунгальными макролидами (ирумацином и Х14952В), из антифунгальной фракции продуцента *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980 был выделен минорный компонент, названный изоирумацином, с уменьшенным размером макролактонного цикла (18-членный цикл вместо 20-членного), который демонстрирует снижение антифунгальной активности при сохранении цитотоксичности.

4. Выделено два принципиально новых антибиотика из культуральной жидкости штамма *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980, названные гауземицинами, содержащих ряд структурных особенностей: редкие непротеиногенные аминокислоты (2-амино-4-гидрокси-4-фенилбутановая кислота, 4-С1-кинуренин), большой экзоциклический фрагмент, углеводный фрагмент. Особенности антимикробной активности гауземицинов говорят об оригинальном механизме действия этих пептидных антибиотиков.

5. *In silico* анализ полногеномной последовательности штамма-продуцента *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980 выявил предполагаемые пути биосинтеза 20-членных антифунгальных макролидов семейства ирумацина и нового пептидного антибиотика гауземицина.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Лапчинская О.А., Катруха Г.С., Гладких Г.С., Куляева В.В., Кудан П.В., Топольян А.П., Алферова В.А., Погожева В.В., Суконников М.А., Рогожин Е.А., Прохоренко И.А., Брылёв В.А., Королёв А.М., Слюндина М.С., Борисов Р.С., Серебрякова М.В., Шувалов М.В., Ксенофонов А.Л., Стоянова Л.Г., Остерман И.А., Формановский А.А., Ташлицкий В.Н., Баратова, Л.А., Тимофеева А.В., Тюрин, А.П. Исследование антибиотического комплекса ИНА-5812. *Биоорганическая химия* **2016**, 42 (6), 732–740.
2. **Alferova V.A.**, Shuvalov M.V., Suchkova T.A., Proskurin G.V., Aparin I.O., Rogozhin E.A., Novikov R.A., Solyev P.N., Chistov A.A., Ustinov A.V., Tyurin A.P., Korshun V.A. 4-Chloro-L-kynurenine as fluorescent amino acid in natural peptides. *Amino Acids* **2018**, 50 (12), 1697–1705.

3. **Alferova V.A.**, Novikov R.A., Bychkova O.P., Rogozhin E.A., Shuvalov M.V., Prokhorenko I.A., Sadykova V.S., Kulko A.B., Dezhenkova L.G., Stepashkina E.A., Efremov M.A., Sineva O.N., Kudryakova G.Kh., Peregudov A.S., Solyev P.N., Tkachev Y.V., Fedorova G.B., Terekhova L.P., Tyurin A.P., Trenin A.S., Korshun V.A. Astolides A and B, antifungal and cytotoxic naphthoquinone-derived polyol macrolactones from *Streptomyces hygrosopicus*. *Tetrahedron* **2018**, 74 (52), 7442–7449.
4. Tyurin A.P., **Alferova V.A.**, Paramonov A.S., Shuvalov M.V., Malanicheva I.A., Grammatikova N.E., Solyev P.N., Liu S., Sun C., Prokhorenko I.A., Efimenko T.A., Terekhova L.P., Efremenkova O.V., Shenkarev Z.O., Korshun V.A. Crystallomycin revisited after 60 years: aspartocins B and C. *MedChemComm* **2018**, 9 (4), 667–675.
5. **Alferova V.A.**, Shuvalov M.V., Novikov R.A., Trenin A.S., Dezhenkova L.G., Gladkikh E.G., Lapchinskaya O.A., Kulyaeva V.V., Bychkova O.P., Mirchink E.P., Solyev P.N., Kudryakova G.Kh., Korshun V.A., Tyurin A.P. Structure-activity studies of irumamycin type macrolides from *Streptomyces* sp. INA-Ac-5812. *Tetrahedron Letters* **2019**, 60 (21), 1448–1451.
6. **Алферова В.А.**, Шувалов М.В., Коршун В.А., Тюрин А.П. Нафтохиноновые полиольные макролиды из природных источников. *Известия Академии Наук. Серия химическая* **2019** (5), 955–966.
7. Tyurin A.P., **Alferova V.A.**, Paramonov A.S., Shuvalov M.V., Kudryakova G.K., Rogozhin E.A., Zhrebker A.Y., Brylev V.A., Chistov A.A., Baranova A.A., Biryukov M.V., Ivanov I.A., Prokhorenko I.A., Grammatikova N.E., Kravchenko T.V., Isakova E.B., Mirchink E.P., Gladkikh E.G., Svirshchevskaya E.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Kocharovskaya M.V., Kulyaeva V.V., Shashkov A.S., Tsvetkov D.E., Nifantiev, N.E., Apt, A.S., Majorov, K.B., Efimova, S.S., Ravin, N.V., Nikolaev, E.N., Ostroumova O.S., Katrukha G.S., Lapchinskaya O.A., Dontsova O.A., Terekhov S.S., Osterman I.A., Shenkarev Z.O., Korshun V.A. Gausemycins A,B: cyclic lipoglycopeptides from *Streptomyces* sp. *Angewandte Chemie Internationala Edition* **2021**, 60 (34), 18694–18703.

Тезисы конференций и симпозиумов

1. **Алферова В.А.**, Тюрин А.П., Шувалов М.В., Коршун В.А. 4-L-хлоркинуренин как флуоресцентная аминокислота в природных пептидах. *МОБИ-ХимФарма2019, Крым, Суздак, 15–18 сентября 2019 г., Сборник тезисов докладов Юбилейной V Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии»*. М: «Перо»; **2019**; с. 6.
2. **Alferova V.A.**, Tyurin A.P., Shuvalov M.V. Astolides A and B, natural antifungal and cytotoxic macrolides. In *Book of Abstracts Natural Products in Drug Discovery and Human Health (NatProdDDH)*; Lisbon, **2019**; p. 105.
3. Tyurin A.P., **Alferova V.A.**, Shuvalov M.V., Novikov R.A. Venturicidin-type macrolides as F₀F₁-ATPase inhibitors: structure-activity relationships. *FEBS Open Bio* **2019**, 9 (S1), 137.
4. Тюрин А.П., **Алферова В.А.**, Шувалов М.В., Маланичева И.А., Грамматикова Н.Э., Сун Ч., Коршун В.А. *МОБИ-ХимФарма2018, Крым, Новый Свет, 23–36 сентября 2018 г., Сборник тезисов докладов IV Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике*; М: «Перо»; **2018**; с. 92.
5. **Алферова В.А.**, Новиков Р.А., Бычкова О.П., Рогожин Е.А., Прохоренко И.А., Степашкина Е.А., Шувалов М.В., Слюндина М.С., Королёв А.М., Федорова Г.Б., Пeregудов А.С., Терехова Л.П., Коршун В.А., Тренин А.С., Тюрин А.П. Антифунгальные макролидные антибиотики из актиномицетного штамма ИНА 18/11. *Химическая биология. Материалы международной конференции, посвященной 90-летию академика Д.Г. Кнорре*; **2016**; с. 98.

6. **Алферова В.А.** Астолиды А и В, нафтохиноновые полиольные макролиды с антифунгальной активностью и цитотоксичностью, продуцируемые *Streptomyces hygroscopicus*. Тезисы докладов Научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний»; Москва, **2017**; с. 2.
7. **Алферова В.А.**, Тюрин А.П., Шувалов М.В., Рогожин Е.А., Прохоренко И.А., Парамонов А.С., Лапчинская О.А., Шенкарев З.О., Коршун В.А. Гауземицины – первые представители нового класса липогликопептидных антибиотиков. II Объединенный научный форум (VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум "Белки и пептиды"), Сочи–Дагомыс, 1–6 октября 2019 г., Научные труды (*Acta Naturae, спецвыпуск*, т. 2; **2019**; 43).
8. **Алферова В.А.**, Топольян А.П., Куляева В.В., Рогожин Е.А., Прохоренко И.А., Брылёв В.А., Шенкарев З.О., Кудан П.В., Шувалов М.В., Слюндина М.С., Королёв А.М., Катруха Г.С., Гладких Е.Г., Лапчинская О.А., Тюрин А.П. Исследование антибиотического комплекса ИНА-5812. *Химическая биология. Материалы международной конференции, посвященной 90-летию академика Д.Г. Кнорре*; **2016**; p. 185.
9. Тюрин А.П., **Алферова В.А.**, Маланичева И.А., Рогожин Е.А., Ефременкова О.В., Лю Ш., Сун Ч., Коршун В.А. Поиск и изучение новых антибиотиков – нерибосомных пептидов из микробных источников. *МОБИ-ХимФарма2017, Севастополь, 28–31 мая 2017 г., Сборник тезисов докладов III Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике*; М: «Перо»; **2017**, с. 70.
10. **Алферова В.А.** Поиск и изучение новых антибиотиков-поликетидов с антифунгальной активностью. *МОБИ-ХимФарма2018, Крым, Новый Свет, 23–36 сентября 2018 г., Сборник тезисов докладов IV Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике*; **2018**; с. 7.
11. **Алферова В.А.** Структура и стереохимические особенности поликетидного антибиотика изоирумамина. *Вакцинология как ответ биологическим угрозам. Сборник тезисов молодых ученых в рамках научной конференции с международным участием.*; **2019**; с. 21.
12. **Alferova V.A.**, Paramonov A.S., Tyurin A.P., Korshun V.A., Malanicheva I.A., Grammatikova N.E., Shenkarev Z.O., Shuvalov M.V. Crystallomycin: structure revision and antibacterial action. *British Council Researcher Links Workshop "Macrocycles in Medicine"*; **2018**; p. 20.

Патенты РФ на изобретения

1. Тренин А.С., Терехова Л.П., Бычкова О.П., Синева О.Н., Садыкова В.С., Коршун В.А., Прохоренко И.А., **Алферова В.А.**, Степашкина Е.А., Тюрин А.П., Рогожин Е.А., Деженкова Л.Г., Шувалов М.В. Штамм *Streptomyces hygroscopicus* 18 — продуцент нафтохиноновых антибиотиков — астолидов А и В с противогрибковой и цитотоксической активностью и способ их получения. *Патент РФ 2681828, 2019*.
2. **Алферова В.А.**, Тюрин А.П., Бычкова О.П., Кудрякова Г.Х. Способ выделения и очистки нафтохиноновых противогрибковых антибиотиков астолидов А и В. *Патент РФ 2725187, 2020*.
3. Кравченко Т.В., Баранова А.А., **Алферова В.А.**, Тюрин А.П., Коршун В.А., Кудрякова Г.Х., Прохоренко И.А., Грамматикова Н.Э., Лапчинская О.А., Гладких Е.Г., Лапчинская М.Ю., Погожева В.В., Филичева В.А., Харитоновна Л.А., Орлова Г.И., Шенкарев З.О., Парамонов А.С. Гауземицины А и В – гликолипепептидные антибактериальные антибиотики и способ их получения. *Патент РФ 2762182, 2021*.

Для заметок

Для заметок