

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков  
имени Г.Ф. Гаузе (ФГБНУ «НИИНА»)

На правах рукописи

**Алферова Вера Александровна**

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

Специальность 1.4.9 - Биоорганическая химия

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель  
д.х.н. Владимир Аркадьевич Коршун

Москва - 2021

*памяти Анны Анатольевны Лихачевой  
и Ирины Вадимовны Алферовой*

## Оглавление

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>6</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>9</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Анионные циклические липопептиды.....</b>	<b>18</b>
1.1.1. Структура циклических липодепсипептидов .....	20
1.1.2. Структура циклических пептидов .....	23
1.1.3. Структурные мотивы циклических липопептидов .....	26
1.1.4. Механизмы действия липопептидных антибиотиков.....	28
1.1.5. Биологические свойства липопептидных антибиотиков и их применение к клинической практике.....	31
1.1.6. Биосинтез анионных циклических липопептидов.....	32
<b>1.2 Антифунгальные 20-членные макролиды .....</b>	<b>35</b>
1.2.1 Структурные семейства вентурицидина и ирумамицина.....	35
1.2.2. Биологическая активность 20-членных макролидов .....	36
1.2.3. Механизм действия вентурицидина .....	38
1.2.4. Биосинтез 20-членных антифунгальных макролидов.....	42
<b>1.3 Нафтохиноновые полиольные макролиды из природных источников .....</b>	<b>45</b>
1.3.1 Биологически активные 1,4-нафтохиноны.....	45
1.3.2 Биологически активные полиольные неполиеновых макролиды большого размера .....	46
1.3.3. Структура нафтохиноновых полиольных макролидов .....	50
1.3.4 Биологическая активность нафтохиноновых полиольных макролидов .....	53
1.3.5. Биосинтез нафтохиноновых полиольных макролидов .....	54
<b>ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>58</b>
<b>2.1 Установление структуры липопептидного антибиотика кристалломицина.....</b>	<b>58</b>
2.1.1. Установление структуры кристалломицина .....	59
2.1.2. Штамм-продуцент и спектр активности кристалломицина. ....	60

2.1.3. ЯМР-спектроскопия кристалломицинов, изучение конформаций липопептидных антибиотиков в растворе.....	63
<b>2.2 Установление структуры новых нафтохиноновых макролидных антибиотиков астолидов А,В .....</b>	<b>72</b>
2.2.1. Выделение, очистка и разделение индивидуальных астолидов А,В.....	72
2.2.2. Установление структуры и относительной конфигурации астолидов А,В .....	74
2.2.3. Антимикробные и цитотоксические свойства астолидов А,В.....	80
<b>2.3 Выделение и изучение 20-членных макролидов структурного семейства ирумамицина .....</b>	<b>83</b>
2.3.1. Выделение, очистка и разделение смеси антифунгальных макролидов.....	83
2.3.2. Установление структуры и пространственного строения макролидов на основании данных ЯМР .....	85
2.3.3. Биосинтез антибиотиков семейства ирумамицина .....	88
2.3.4. Биологические свойства выделенных представителей структурного семейства ирумамицина.....	97
<b>2.4 Выделение и установление структуры компонентов липогликопептидного антибиотического комплекса гауземицинов А,В.....</b>	<b>100</b>
2.4.1 Выделение и очистка концентрата антибиотика.....	100
2.4.2. Анализ компонентного состава концентрата антибиотика .....	100
2.4.3. Фракционирование концентрата и выделение индивидуальных веществ.....	105
2.4.4. Изучение аминокислотного состава и идентификация флуоресцентной аминокислоты L-4-хлоркинуренина.....	107
2.4.5. Установление структуры индивидуальных гауземицинов А,В с помощью ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.....	113
2.4.6. Биосинтез гауземицинов .....	122
2.4.7. Биологическая активность антибиотического комплекса и индивидуальных компонентов – гауземицинов А,В.....	128
<b>ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....</b>	<b>141</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>158</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ .....</b>	<b>159</b>

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ ..... 160**

**ПРИЛОЖЕНИЯ..... 179**

## Список сокращений

<b>ВИЧ</b>	– вирус иммунодефицита человека
<b>ВКПМ</b>	– всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов
<b>ВЭЖХ (HPLC)</b>	– высокоэффективная жидкостная хроматография
<b>ДНК</b>	– дезоксирибонуклеиновая кислота
<b>КССВ</b>	– константа спин-спинового взаимодействия
<b>ПМР</b>	– протонным магнитный резонанс
<b>РНК</b>	– рибонуклеиновая кислоты
<b>ТСХ</b>	– тонкослойная хроматография
<b>ТФУ</b>	– трифторуксусная кислота
<b>УФ</b>	– ультрафиолетовый
<b>ЯМР</b>	– ядерный магнитный резонанс
<b>АСР</b>	– acyl carrier protein
<b>АТ</b>	– acyltransferase (ацилтрансфераза)
<b>BGC</b>	– biosynthetic gene cluster (биосинтетический генный кластер)
<b>BLAST</b>	– basic local alignment search tool
<b>ClKyn</b>	– chlorokynurenine (хлор-кинуренин)
<b>ClW (ClTrp)</b>	– chlorotryptophane (хлор-триптофан)
<b>COSY</b>	– homonuclear correlation spectroscopy (корреляционная спектроскопия)
<b>Dab</b>	– diaminobutyric acid (диаминобутановая кислота)
<b>Dap</b>	– diaminopropionic acid (диаминопропановая кислота)
<b>DH</b>	– dehydratase (дегидратаза)
<b>DIPEA</b>	– diisopropylethylamine (диизопропилэтиламин)
<b>DMSO (ДМСО)</b>	– dimethyl sulfoxide (диметилсульфоксид)
<b>DOPE</b>	– 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин)
<b>DOPC</b>	– 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин)
<b>DOPG</b>	– 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерин))
<b>ECOSY</b>	– exclusive correlation spectroscopy (особая корреляционная спектроскопия)
<b>ESI</b>	– ионизация электрораспылением
<b>FRET</b>	– резонансный перенос энергии Фёрстера
<b>FTICR</b>	– Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (масс-спектрометрия ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием)

<b>hAsn, hN</b>	– hydroxyasparagine (гидрокси-аспарагин)
<b>hGlu (hE)</b>	– hydroxyglutamate (гидрокси-глутамат)
<b>HMBC</b>	– heteronuclear multiple bond correlation (гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия)
<b>Hpg</b>	– hydroxyphenylglycine (гидроксифенилглицин)
<b>HRMS</b>	– high resolution mass spectrum (масс-спектр высокого разрешения)
<b>HSQC</b>	– heteronuclear single quantum coherence spectroscopy (гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия)
<b>H2BC</b>	– heteronuclear two-bond correlation
<b>ICT</b>	– photoinduced intramolecular charge transfer (фотоиндуцированный внутримолекулярный перенос заряда)
<b>IC<sub>50</sub></b>	– концентрация полумаксимального ингибирования
<b>KR</b>	– ketoreductase (кеторедуктаза)
<b>KS</b>	– ketosynthase (кетосинтаза)
<b>mAsp (mD)</b>	– methyl-aspartic acid (метил-аспарагиновая кислота)
<b>mGlu (mE)</b>	– methylglutamate (метил-глутамат)
<b>mPro (mP)</b>	– methylproline (метил-пролин)
<b>MIC (МИК)</b>	– minimum inhibitory concentration (минимальная ингибирующая концентрация)
<b>MRSA</b>	– methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MS (MC)</b>	– mass spectrometry (масс-спектрометрия)
<b>MTT</b>	– (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид
<b>NCBI</b>	– National Center for Biotechnology Information
<b>NHS</b>	– N-hydroxysuccinimide (N-гидроксисукцинимид)
<b>NOE</b>	– nuclear Overhauser effect (эффект Оверхаузера)
<b>NOESY</b>	– nuclear Overhauser effect spectroscopy (ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера)
<b>NRPS</b>	– non-ribosomal peptide synthetase
<b>OmAsp (OmD)</b>	– O-methylasparartic acid (O-метиласпарагиновая кислота)
<b>PBP</b>	– penicillin binding protein (пенициллин-связывающий белок)
<b>PEPe</b>	– phenylethynylperylene (фенилэтинилперилен)
<b>PET</b>	– photoinduced electron transfer (фотоиндуцированный перенос электронов)
<b>PG</b>	– phosphatidylglycerol (фосфатидилглицерол)
<b>Pip</b>	– pipercolinic acid (пипеколиновая кислота)
<b>PKS</b>	– polyketide synthase (поликетидсинтаза)
<b>ROESY</b>	– rotating frame Overhauser effect spectroscopy (спектроскопия эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат)

**RT** – retention time (время удерживания)  
**TOCSY** – total correlated spectroscopy (полная корреляционная спектроскопия)

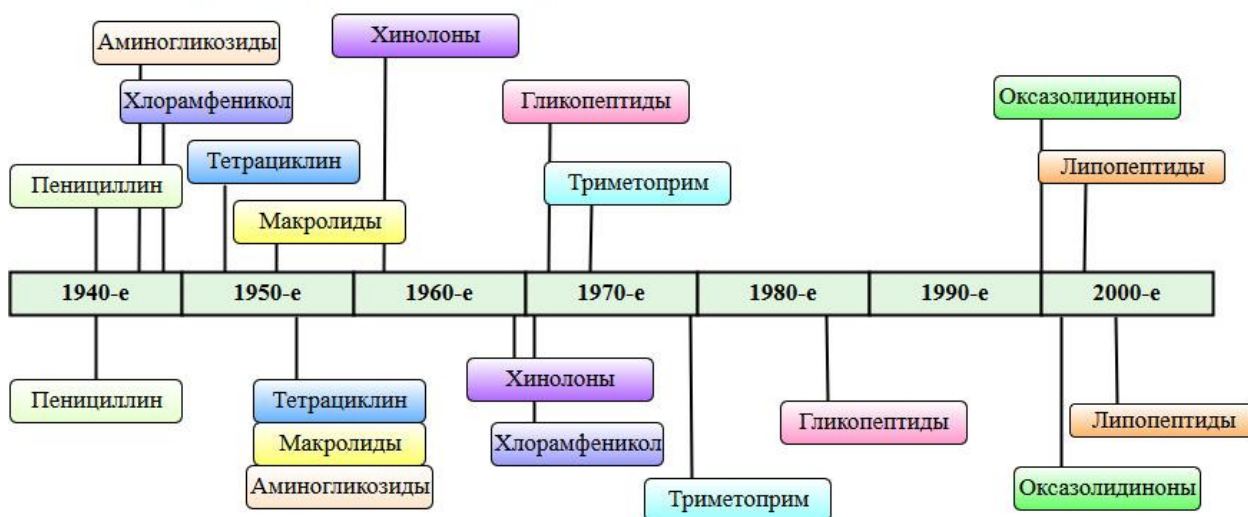


## Введение

Природные соединения играли и продолжают играть огромную роль в развитии человеческой цивилизации. Именно внедрение в медицину антибиотических препаратов на основе природных вторичных метаболитов способствовало удвоению ожидаемой продолжительности жизни в 20 столетии [1].

Основные классы антибиотиков открыты в середине 20 века, так называемый «золотой век» антибиотиков [1]. Липопептидный антибиотик даптомицин, обнаруженный в середине 1980-х и одобренный для клинического применения в 2003 году, был последним природным 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 (Рис. 1).

### Введение антибиотика в клиническую практику



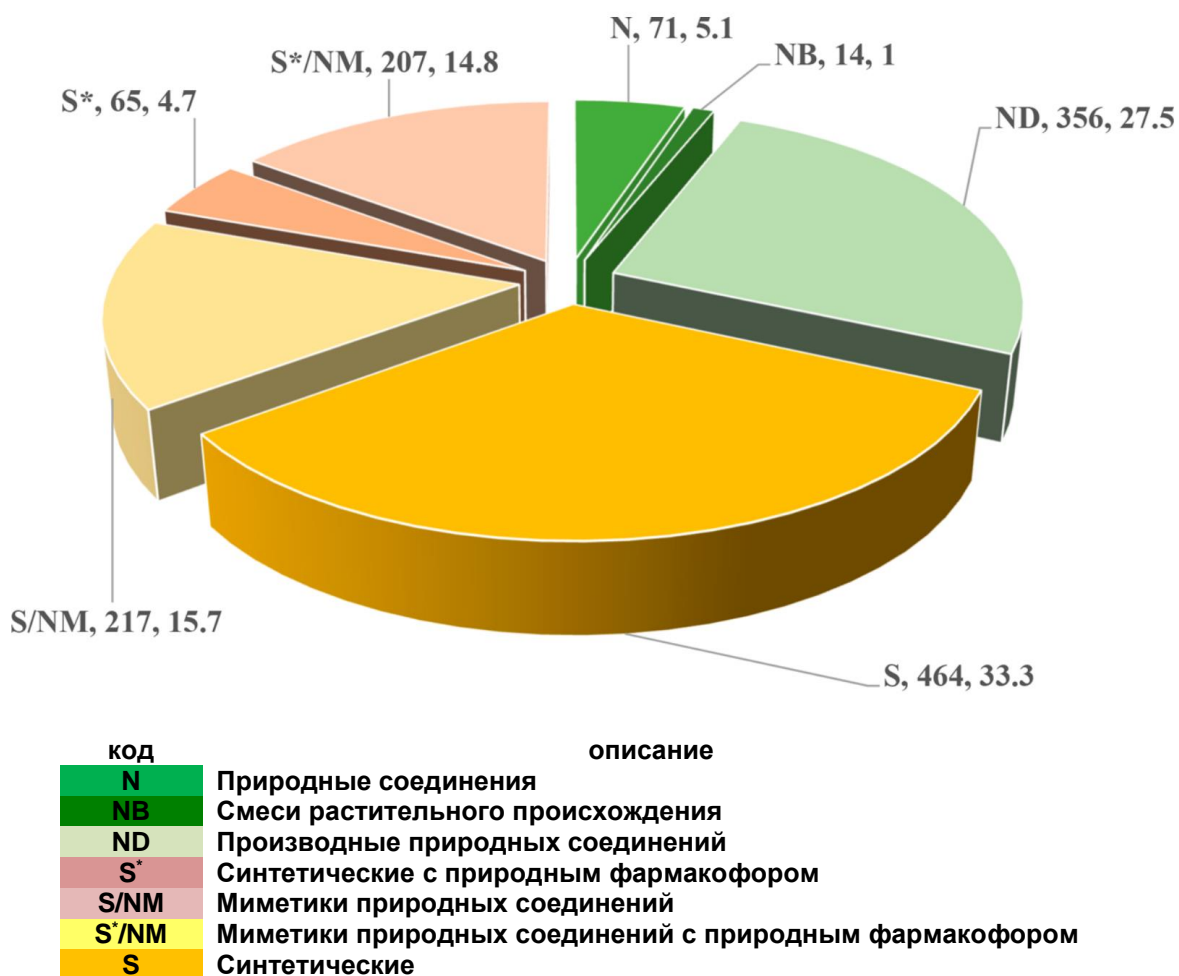
### Первое описание резистентности к антибиотику

**Рис. 1.** Темпы развития резистентности к новым классам антибиотиков [2].

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. Всемирная Организация Здравоохранения считает распространение резистентных штаммов нарастающей угрозой [3]. Особенную тревогу вызывает возникновение резистентности к антибиотикам «последней надежды», в том числе колистину [4]. 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 [5,6]. У пациентов с ослабленным иммунитетом, например, больных туберкулезом, серьезным осложнением является развитие инвазивных микозов, вызываемых широким спектром грибковых патогенов, зачастую резистентных к применяемым антифунгальным препаратам. Смертность от таких заболеваний остается крайне высокой (около 50%) [7]. Кроме того, даже те инфекционные заболевания, которые считаются побежденными человечеством, например, чума и проказа, могут сохраняться в необычных природных резервуарах [8] и вновь распространяться [9], что требует готовности системы здравоохранения к возможным вспышкам подобных заболеваний. 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 [1]. 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) [10]. Согласно проведенному анализу внедренных в клиническую практику препаратов, большая часть новых лекарств (среди низкомолекулярных веществ) имеет в той или иной степени природное происхождение (Рис. 2) [11].



**Рис. 2.** Природные соединения как источник новых терапевтических средств (1981-2019, по данным [11,12])

Изучение природных соединений продолжает оставаться перспективным направлением исследований, позволяющим ожидать обнаружения новых антибиотических соединений и выявления фармакофоров с новыми мишенями и механизмами активности.

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 Ас2079, *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980.
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.

Исследование включает установление структуры и спектра биологической активности вторичных метаболитов стрептомицетов, обладающих ценными фармакологическими свойствами. **Первый тип** изученных объектов представляет собой *макроциклические антибиотики пептидной природы*, обладающие активностью против грамположительных бактерий. Была установлена структура пептида, описанного в 1957 году под названием кристалломицин [13], оказавшегося представителем структурного семейства амфомицина [14]. Видовая принадлежность штамма, продуцирующего изучаемые пептидные антибиотики, хранившийся в коллекции Института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе была определена как *Streptomyces griseorubens*. Современные методы двумерной ЯМР-спектроскопии позволили существенно расширить представления о конформациях антибиотика в растворе.

Другим пептидным антибиотиком, изучавшимся в рамках данной работы, является гауземицин. Этот антибиотический комплекс, продуцируемый штаммом *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980, представляет собой более 25 близких циклических пептидов с уникальными структурными мотивами. Была установлена структура двух индивидуальных компонентов антибиотического комплекса, гауземицинов А,В, а также проведена химическая характеристика остальных компонентов смеси. Изученные антибиотики обладают выраженной активностью в отношении грамположительных бактерий, при этом, в отличие от большинства циклических липопептидов, не являются ингибиторами биосинтеза клеточной стенки, что делает их крайне перспективными для дальнейшего применения. Отдельным этапом изучения данных соединений являлось описание их флуоресцентных свойств и подбор флуорофора-акцептора для получения производных, потенциально применимых для клеточной биологии.

**Второй тип** изучаемых вторичных метаболитов – *макроциклические поликетидные антибиотики* с антифунгальной активностью. В культуральной жидкости штамма *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980, помимо антибактериальных пептидных соединений, были обнаружены 20-членные антифунгальные макролиды семейства ирумамицина. Структурное исследование показало, что два из трех выделенных соединений представляют собой известные антибиотики – ирумамицин [15] и его близкий аналог Х-14952В [16], а третье является ранее не описанным изомером ирумамицина (изоирумамицин). Сравнение антифунгальной активности выделенных соединений позволило су-

существенно расширить представления о взаимосвязи структура-активность для этого семейства антибиотиков.

Другими макроциклическими поликетидными антибиотиками, изученными в рамках данной работы, являются астолиды А,В. Эти соединения продуцируются штаммом *S. hygrosopicus* ВКПМ Ас2079 и обладают высокой антифунгальной активностью в отношении широкого спектра тест-микроорганизмов, а также ингибируют некоторые мультирезистентные клинические изоляты патогенных грибов и дрожжей. Структура астолидов содержит две фармакофорные группы – нафтохиноновый фрагмент и полиольный неполиеновый макролид большого размера (36 атомов). Изучение спектра антибиотической активности и цитотоксичности этих антибиотиков показало, что их биологические свойства существенно отличаются от ближайших аналогов.

Обзор литературы посвящен основным химическим и биологическим характеристикам структурных семейств антибиотиков, к которым принадлежат изученные в данной работе природные соединения. Так, первая часть обзора описывает циклические липопептидные антибиотики. Во второй части обзора освещены особенности структурного семейства ирумамицина (вентурицидина). В заключительной части обобщена литература, касающаяся нафтохиноновых полиольных неполиеновых макролидных антибиотиков.

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) при взаимодействии с коллегами из других подразделений Института, а также с коллегами из Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН), МГУ им. М.В. Ломоносова, Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулезом ДЗМ, ЦНИИ Туберкулеза, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии», Сколтеха, Института цитологии РАН. По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, из них 6 статей, 2 патента, 12 тезисов докладов на симпозиумах и конференциях.

#### **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, синтезу и модификации изучаемых соединений, выполнена интерпретация физико-химических данных для установления структуры, обобщение и сравнение с литературными данными о биологической активности выделенных соединений, биоинформатический анализ полногеномных последовательностей штаммов-

продуцентов антибиотиков, работы по флуоресцентной микроскопии. 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 вивариумом 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. Свирцевской 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. Парамоновым А.С. и д.ф.-м.н. г.н.с. Шенкаревым З.О. (ИБХ РАН), к.х.н. с.н.с. Новико-

вым 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).

1. Лапчинская О.А., Катруха Г.С., Гладких Е.Г., Куляева В.В., Кудан П.В., Топольян А.П., **Алфёрова 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., Ксенофонтов А.Л., Стоянова Л.Г. и др. 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 hygroscopicus*. *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. **Алфёрова 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. et al. Gausemycins A,B: cyclic lipoglycopeptides from *Streptomyces* sp. *Angewandte Chemie Internationala Edition* **2021**, 60, 34, 18694–18703.

### **Тезисы конференций:**

1. **Алферова В.А.**, Тюрин А.П., Шувалов М.В., Коршун В.А. 4-L-хлоркинуренин как флуоресцентная аминокислота в природных пептидах. *Сборник тезисов докладов Пятой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии»*; Судак, Крым, Россия, **2019**; с. 6.

2. **Alferova V.A.**, Tyurin A.P., Shuvalov M.V. Astolides A and B, natural antifungal and cytotoxic macrolides. *Book of Abstracts Natural Products in Drug Discovery and Human Health (NatProdDDH)*; Лиссабон, Португалия, **2019**; p 105.

3. Tyurin A.P., **Alferova V.A.**, Shuvalov M.V., Novikov R.A. Venturicidin-type macrolides as F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase inhibitors: structure-activity relationships. *FEBS Open Bio*, Краков, Польша, **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. Анионные липопептидные антибиотики: исторический контекст и новые перспективы. *Сборник тезисов докладов Четвёртого Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике*; Новый Свет, Крым, Россия, **2018**; с. 7.

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.; Перегудов, 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.*; Новосибирск, Россия, **2016**; с. 98.

6. **Алферова В.А.** Астолиды А и В, нафтохиноновые полиольные макролиды с антифунгальной активностью и цитотоксичностью, продуцируемые *Streptomyces hygrosopicus*. *Тезисы докладов Научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний»*; Москва, Россия, **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. Том 2, 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., Шенкарёв 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**; Новосибирск, Россия, с. 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. *Сборник тезисов докладов Третьего Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике 2017*; Севастополь, Крым, Россия, **2017**; с. 70.

10. **Алферова В.А.** Поиск и изучение новых антибиотиков-поликетидов с антифунгальной активностью. *Сборник тезисов докладов Четвёртого Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике*; Новый Свет, Крым, Россия, **2018**; с. 7.

11. **Алферова В.А.** Структура и стереохимические особенности поликетидного антибиотика изоирумамицина. *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"; Норидж, Великобритания, **2018**; с. 20

### **Патенты:**

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. RU 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. RU2725187, **2020**.

## Глава 1. Обзор литературы

Большая часть антибиотиков, вводимых в последнее время в клиническую практику, имеет природное происхождение. Тем не менее, значительная доля антимикробных препаратов представляет собой полусинтетические производные природных соединений или синтетические молекулы, разработанные на основе природных скаффолдов. Поэтому изучение взаимосвязей структура-активность для различных семейств природных соединений является важным направлением исследований даже для тех соединений, которые не применимы в медицине без дополнительных модификаций. Например, недавно было показано, что амфомицин, применявшийся в 1950-х годах и исключенный из клинической практики из-за высокой токсичности, может служить сырьем для химической трансформации и получения менее токсичных аналогов [17]. В рамках данной работы был обнаружен ряд новых структурных мотивов для ряда активных соединений различных классов, поэтому обзор литературы посвящен обобщению современных данных об этих семействах природных соединений. Первая глава посвящена описанию известных *анионных макроциклических липопептидных антибиотиков*, имеющих некоторое структурное сходство с изученными в рамках данной работы гауземицином и кристалломицином. Два других раздела обзора литературы посвящены *макролидным антибиотикам*: антифунгальным 20-членным макролидам и нафтохиноновым неполиеновым макролидам с большим размером цикла.

### 1.1 Анионные циклические липопептиды

Антибиотики пептидной природы обладают очень высоким структурным разнообразием. Широкое применение в медицине нашли антибактериальные препараты, относящиеся к классу гликопептидов (например, ванкомицин) [18]. Ценными биологическими свойствами обладают сурфактанты природного происхождения, некоторые из которых являются липопептидами, например сурфактины [19,20]. Некоторые природные катионные пептиды обладают антибиотическими свойствами, например полимиксины и грамицидин S [21–23]. В рамках данного обзора будут обобщены структурные особенности и биологические свойства анионных циклических липопептидных антибиотиков с антибактериальной активностью. Литература по этой теме до 2009 года была обобщена в нескольких обзорах [24,25]. Характеристика этого класса антибиотиков началась в 1950-х с выделения амфомицина [14], а затем серии структурно близких соединений. Штаммы-продуценты липопептидных антибиотиков являются актинобактериями, в основном, стрептомицетами (Таблица 1). Последние представители этого класса антибиотиков, та-

ромицины и малацидины, были получены с помощью гетерологической экспрессии и метагеномного анализа.

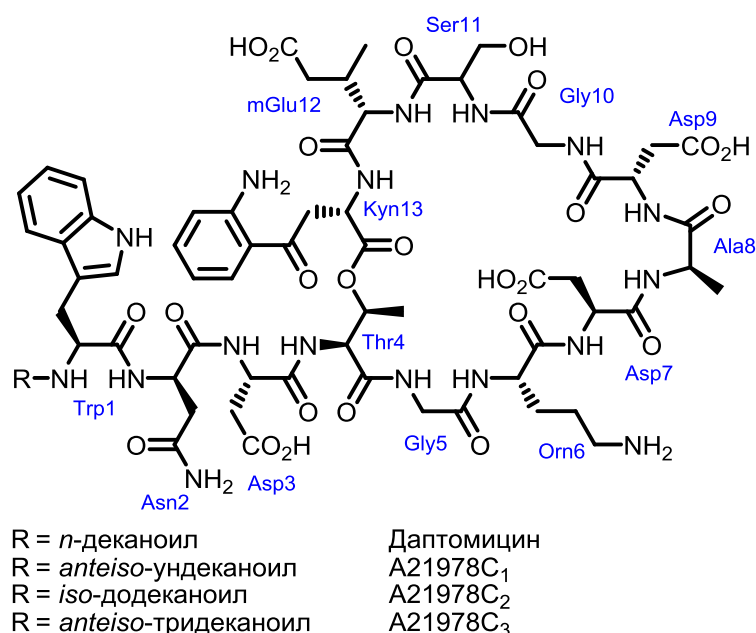
Таблица 1. Штаммы-продуценты анионных липопептидных антибиотиков.

Соединение	Год выделения	Штамм-продуцент	Ссылка
Амфомицин	1953	<i>Streptomyces canus</i> ATCC 12237	[14]
Заомицин	1954	<i>Streptomyces zaomyceticus</i> ATCC 27482 (= Ishida N-187)	[26]
Кристалломицин	1957	<i>Streptomyces</i> sp.	[13]
Аспартоцин	1960	<i>S. griseus</i> var. <i>spiralis</i> ATCC13733 <i>S. violaceus</i> var. <i>aspartocinius</i> ATCC 13734	[27]
Глумамицин	1962	<i>Streptomyces zaomyceticus</i> ATCC 13876	[28]
Ласпартомицин	1968	<i>S. viridochromogens</i> ATCC 29814	[29]
Сушимицин	1968	<i>S. griseoflavus</i> ATCC 21139	[30,31]
CDA (calcium-dependent antibiotics)	1983	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	[32]
		<i>S. violaceorube</i> Kutner 673	
		<i>S. lividans</i>	[33]
Даптомицин/A21978C	1987	<i>S. roseosporus</i> NRRL11379	[34]
A54145	1990	<i>S. fradiae</i> NRRL 18158	[35]
		<i>S. refuineus</i> spp. <i>thermotolerans</i>	[36]
Фриулимицины/A1437	2000	<i>Actinoplanes friuliensis</i> DSM 7358	[37,38]
		<i>A. friuliensis</i> DSM 7358	
Глициноцин	2003	<i>Actinomycete</i> AW 998	[39]
Румицины	2007	<i>Streptomyces</i> sp. 23195	[40]
Таромицин	2014	<i>Sacharomonospora</i> sp. C NQ -490	[41]
Малацидины	2018	Гетерологическая экспрессия метагеномного антибиотика	[42]
Кадазиды	2019	Гетерологическая экспрессия метагеномного антибиотика	[43]

Установление структуры таких сложных молекул было сложной задачей до появления современных методов масс-спектрометрии высокого разрешения и двумерного ЯМР, что приводило зачастую к некорректному определению структуры, например, в течение длительного периода предполагалось, что амфомицин имеет линейное строение [44]. Циклическая природа этого соединения стала очевидна после установления строения антибиотического комплекса A21978C, к которому принадлежит даптомицин [34].

### 1.1.1. Структура циклических липодепептидов

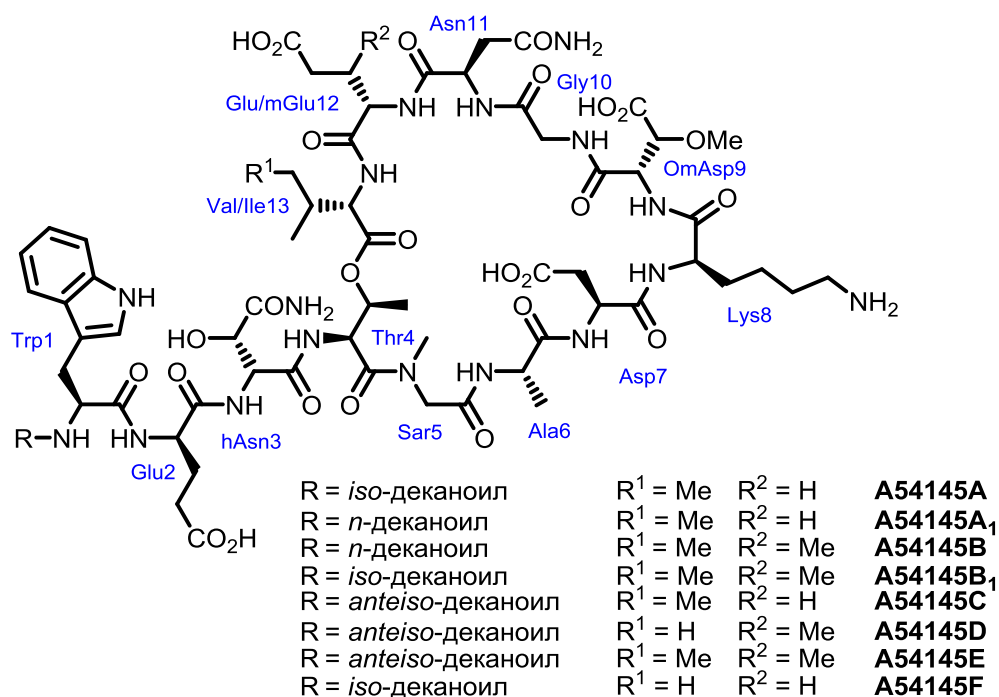
Антибиотический комплекс A21978C представляет собой ряд циклических пептидов, состоящих из 13 аминокислот. 10-членное кольцо замыкается за счет лактонной связи между треонином Thr4 и C-концевым кинуренином Kyn13 (Рис. 3). Наиболее известным представителем этого семейства является даптомицин, который изначально был обнаружен в качестве минорного компонента антибиотического комплекса [34], однако позже было обнаружено, что его активность существенно выше, чем у других представителей этого семейства [45], поэтому биосинтез даптомицина был оптимизирован для увеличения выхода [46]. Даптомицин был одобрен в США в 2003 году для лечения кожных инфекций, вызванных грамположительными патогенами. Липопептиды этого структурного семейства отличаются жирными кислотами, ацилирующими N-конец циклопептида (Trp1).



**Рис. 3.** Структура циклических липодепептидов структурного семейства даптомицина

Аминокислотный состав пептидов интересен тем, что они содержат ряд непротениогенных и D-аминокислот: орнитин (Orn6), D-аланин (D-Ala8), D-серин (D-Ser11), L-трео-3-метилглутаминовая кислота (mGlu12) и кинуренин (Kyn13). Наличие пятой D-аминокислоты, D-аспарагина, обнаружили при анализе биосинтетического кластера даптомицина, а затем подтвердили химически [46]. При первичной характеристике конфигурацию D-аспарагина (D-Asn2) не выяснили, так как для установления абсолютной конфигурации использовался гидролиз с последующим выделением смеси аспарагиновых кислот и измерением вращения.

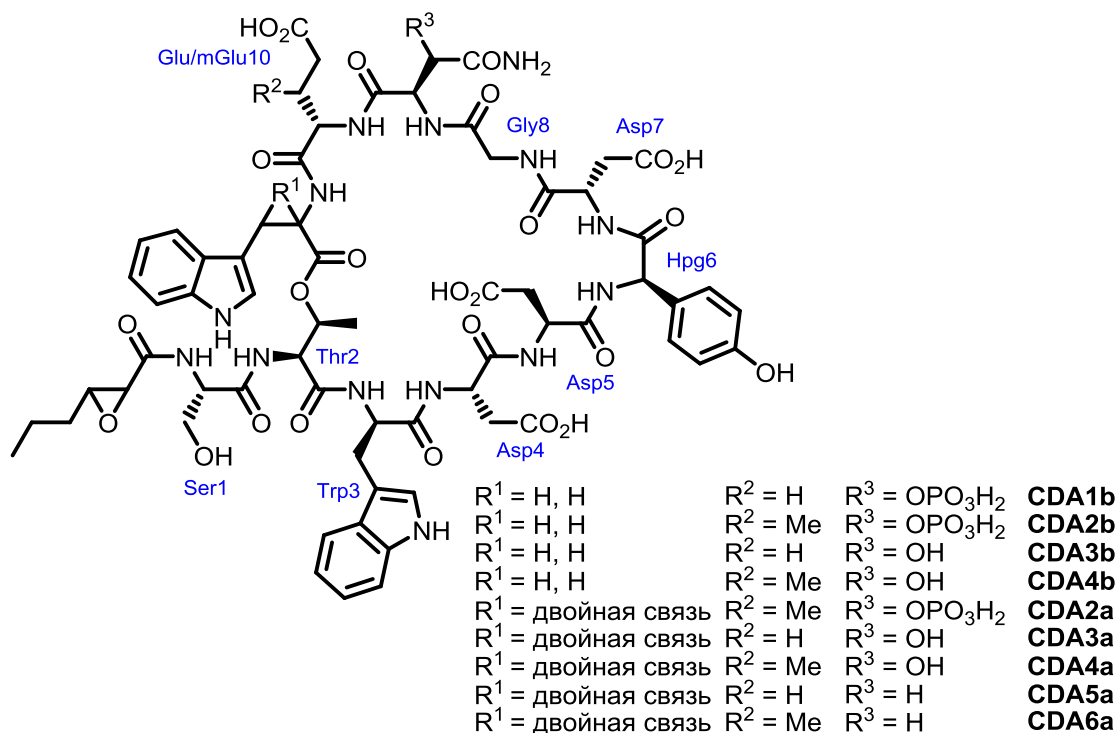
Антибиотический комплекс A54145 представляет собой более сложную смесь липопептидов [47]. Как и представители предыдущего семейства липопептидов, эти пептидные антибиотики состоят из 13 аминокислот, замкнуты в 10-членный депсипептид с экзоциклическим хвостом из 3 аминокислотных остатков, несущим три различных остатка жирных кислоты на N-конце пептида (Рис. 4) [48]. Увеличение сложности комплекса A54145 по сравнению с A21978C обусловлено вариацией двух последних аминокислот: позиция 12 занята либо глутамином (Glu12), либо 3-метилглутамином (mGlu12); на позиции 13 находится либо валин (Val13), либо изолейцин (Ile13). Установление абсолютной конфигурации стереоцентров было также основано на изучении биосинтетического кластера [49]. Семь из 13 аминокислот, входящих в состав антибиотиков этого структурного семейства, являются непротеиногенными, в том числе три D-аминокислоты. При этом 6 из этих аминокислот встречаются во всех соединениях семейства (D-Glu2, 3-гидрокси-L-аспарагин hAsn3, саркозин Sar5, D-Lys8, mAsp9, D-Asn11), в то время как mGlu12 встречается только в соединениях A54145B, B<sub>1</sub>, C, E.



**Рис. 4.** Структура циклических липопептидов структурного семейства A54145.

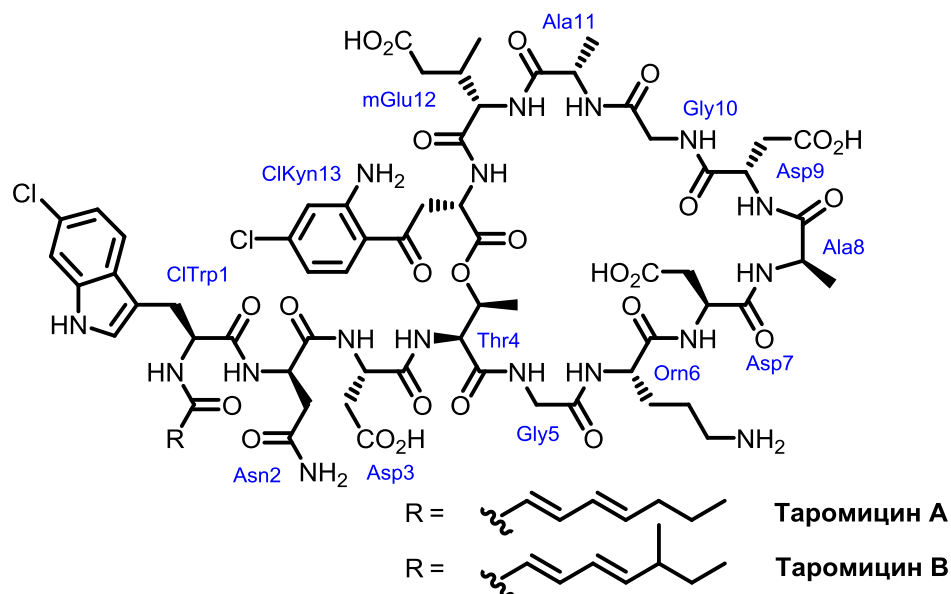
Несмотря на то, что семейство липопептидов CDA (calcium-dependent antibiotics) было обнаружено впервые в 1983 [32], структура этих соединений была установлена существенно позднее [50]. Как и предыдущие описанные структурные семейства, эти соединения представляют собой циклические депсипептиды, замыкающиеся через треонин (Thr2), однако содержат только одну экзоциклическую кислоту, серин (Ser1), ацилированную 2,3-эпоксигексановой кислотой (Рис. 5). Изначально были выделены 4 предста-

вителя семейства CDA (CDA1b, CDA2b, CDA3b, CDA4b) из 9 охарактеризованных на данный момент соединений. Структурные вариации CDA наблюдаются в D-hAsn<sup>9</sup>, в которой гидроксильная группа фосфорилирована в соединениях CDA 1b, CDA 2a, CDA 2b, а также в позиции 10, которая может быть занята либо глутаминовой кислотой Glu<sup>10</sup>, либо 3-метилглутаминовой кислотой 3-mGlu<sup>10</sup>. Другими необычными аминокислотами в составе этих пептидов являются D-Trp<sup>3</sup> и D-4-гидроксифенилглицин D-Hpg<sup>6</sup>. Третьим сайтом структурной модификации CDA является Trp<sup>11</sup>, который дегидрогенирован для ряда пептидов до Z-2,3-дегидротриптофана.



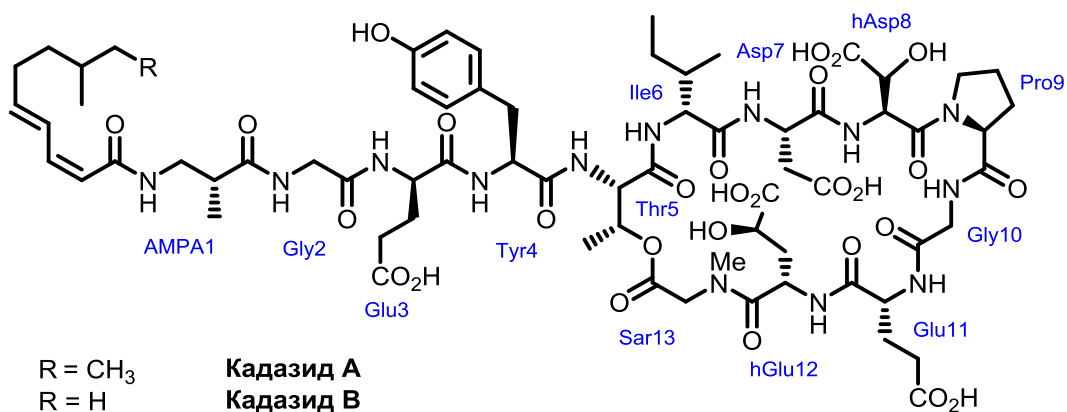
**Рис. 5.** Циклические липодепептиды структурного семейства CDA (calcium-dependent antibiotics).

Одним из последних представителей класса липодепептидов является таромицин А, структура которого была установлена в 2014 году [41]. Позже был выделен второй представитель этого структурного семейства, содержащий другую жирную кислоту, таромицин В [51]. Существенным отличием таромицинов от ранее описанных липодепептидов является наличие хлорированных аминокислот в пептидном ядре антибиотика (Рис. 6).



**Рис. 6.** Циклические липодепептиды структурного семейства таромицина.

Ярким примером успешного применения стратегии метагеномного поиска вторичных метаболитов с антибиотической активностью является обнаружение кадазидов А и В (Рис. 7) [43]. Молекулы кадазидов содержат 13 аминокислот, 9 из которых формируют макроцикл.

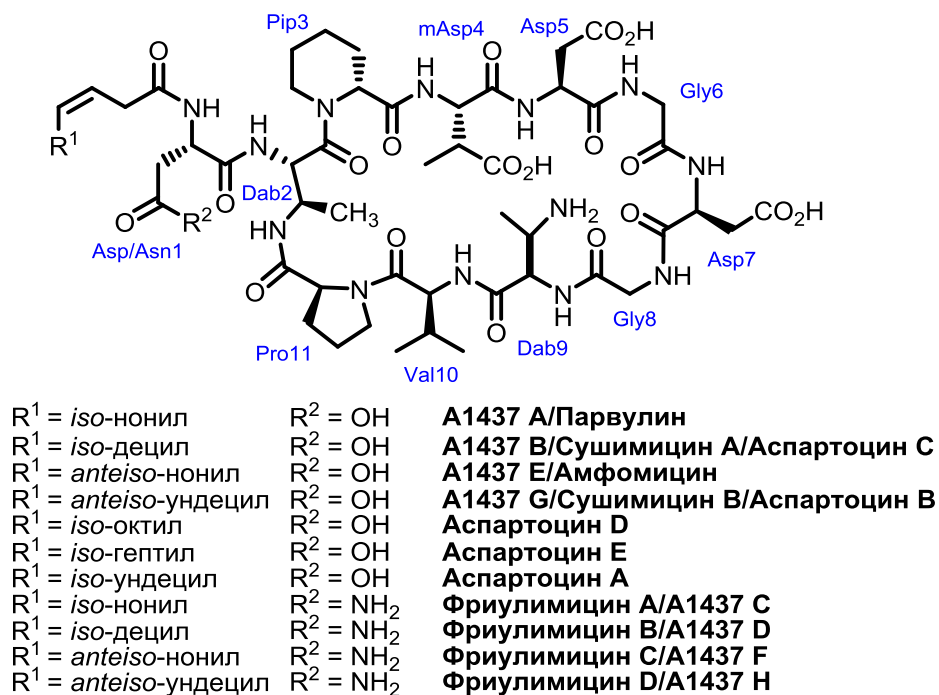


**Рис. 7.** Структура циклических депептидов – кадазидов А,В.

### 1.1.2. Структура циклических пептидов

Большинство анионных циклических пептидов, известных на сегодняшний день, как и депептиды, содержат 10-членное кольцо, однако замыкание цикла происходит посредством макролактамизации. Амфомицин был впервые описан [14] более 60 лет назад. После этого был опубликован целый ряд похожих или идентичных антибиотиков под различными названиями, что внесло существенную путаницу в этот класс антибиотиков. При этом для амфомицина предлагался ряд линейных формул. Надежно установить структуру амфомицина и связанных пептидов удалось только недавно [24]. Струк-

туры двух основных представителей этого типа антибиотиков – фриулимицина В и аспартоцина С – была корректно описана впервые в 2000, что стало возможно благодаря современным методам двумерной ЯМР-спектроскопии [37]. Пептидное ядро этих антибиотиков замыкается через связь между пролином (Pro11) и диаминобутановой кислотой (Dab2). Структуру дополняет экзоциклическая аспарагиновая кислота (Asp1) с различными жирными кислотами (Рис. 8), причем антибиотики серии А-1437 оказались идентичны различным ранее описанным соединениям [37,38]. Для некоторых антибиотиков, например, заомицина [26], глумамицина [52], парвулинов [53] и антибиотика 33 [54], которые описывались как сходные с амфомицином, однозначная структура не установлена до сих пор. Сушимицин содержит компоненты с как минимум двумя различными жирными кислотами [31], тем не менее авторы статьи [55] называют только один компонент сушимицином. Для ясности на рисунке ниже для этих липопептидов добавлены обозначения А и В (Рис. 8). Недавно были обнаружены новые природные представители этого структурного семейства аспартоцины D и E [56]. Серия фриулимицинов отличается от амфомицинов только аспарагином (Asn1) вместо аспарагиновой кислоты в начале пептидной цепочки.

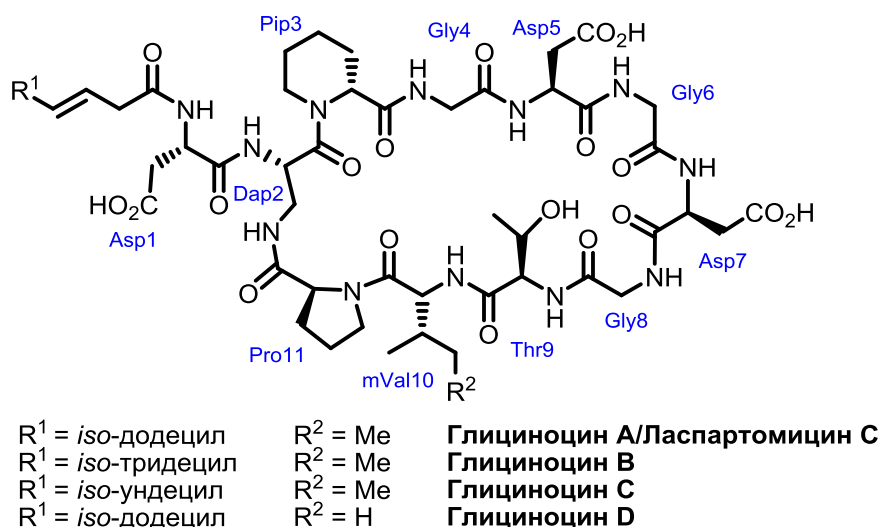


**Рис. 8.** Циклические липопептиды структурного семейства амфомицина.

Ласпартомицин был впервые выделен в 1968 году [29], однако его структуру удалось установить только в 2007 году [57]. Другие представители структурного семейства известны под названием глициноцины, причем было показано, что глициноцин А идентичен ласпартоцину С [39]. Ключевое отличие глициноцинов от амфомицинов заключа-

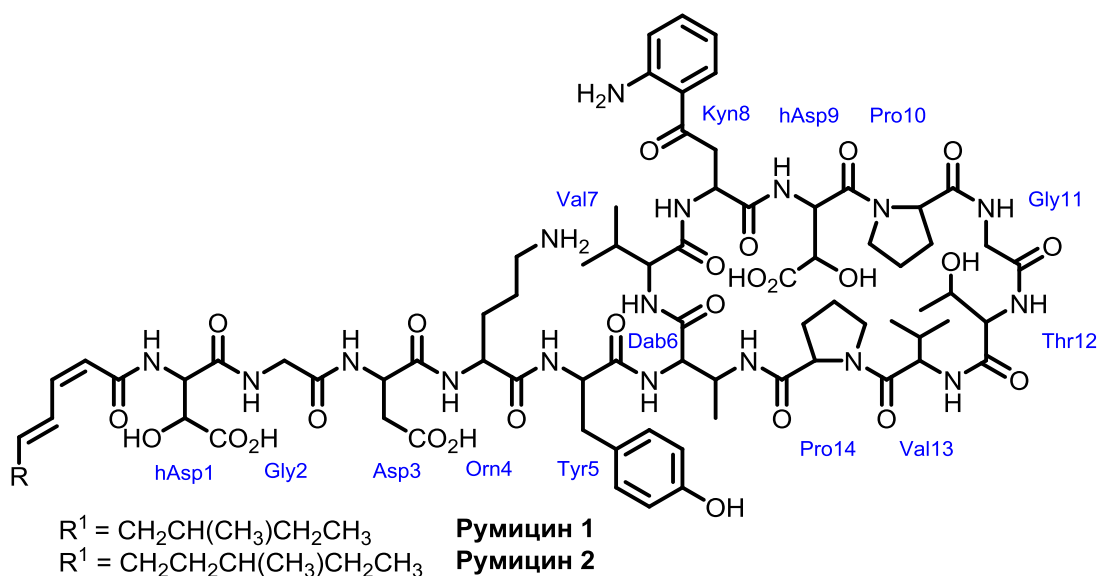


ется в замыкании пептидного цикла на диаминопропановую, а не диаминобутановую кислоту (**Рис. 9**).



**Рис. 9.** Циклические липопептиды структурного семейства глициноцина (ласпартомицина).

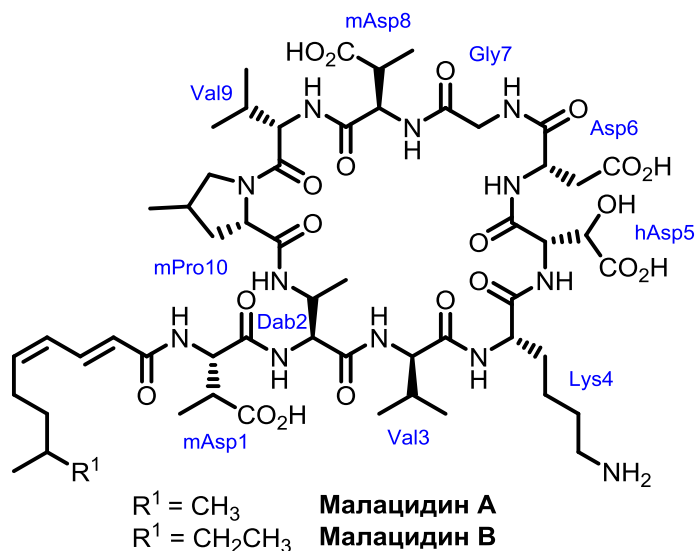
Наименее изученными представителями циклических пептидов являются румицины, описанные в патенте [40]. Эти антибиотики обладают целым рядом уникальных структурных мотивов, например, сочетают 5 экзоциклических аминокислотных остатков и уменьшенный размер цикла (9 аминокислот). Абсолютные конфигурации аминокислот в этих антибиотиках неизвестны.



**Рис. 10.** Циклические липопептиды структурного семейства румицинов.

Недавно был осуществлен метагеномный анализ коллекции более 2000 почвенных микроорганизмов с целью поиска новых кальций-зависимых антибиотиков. Были выделены малацидины А и В (**Рис. 11**), отличающиеся на одну метильную группу в жир-

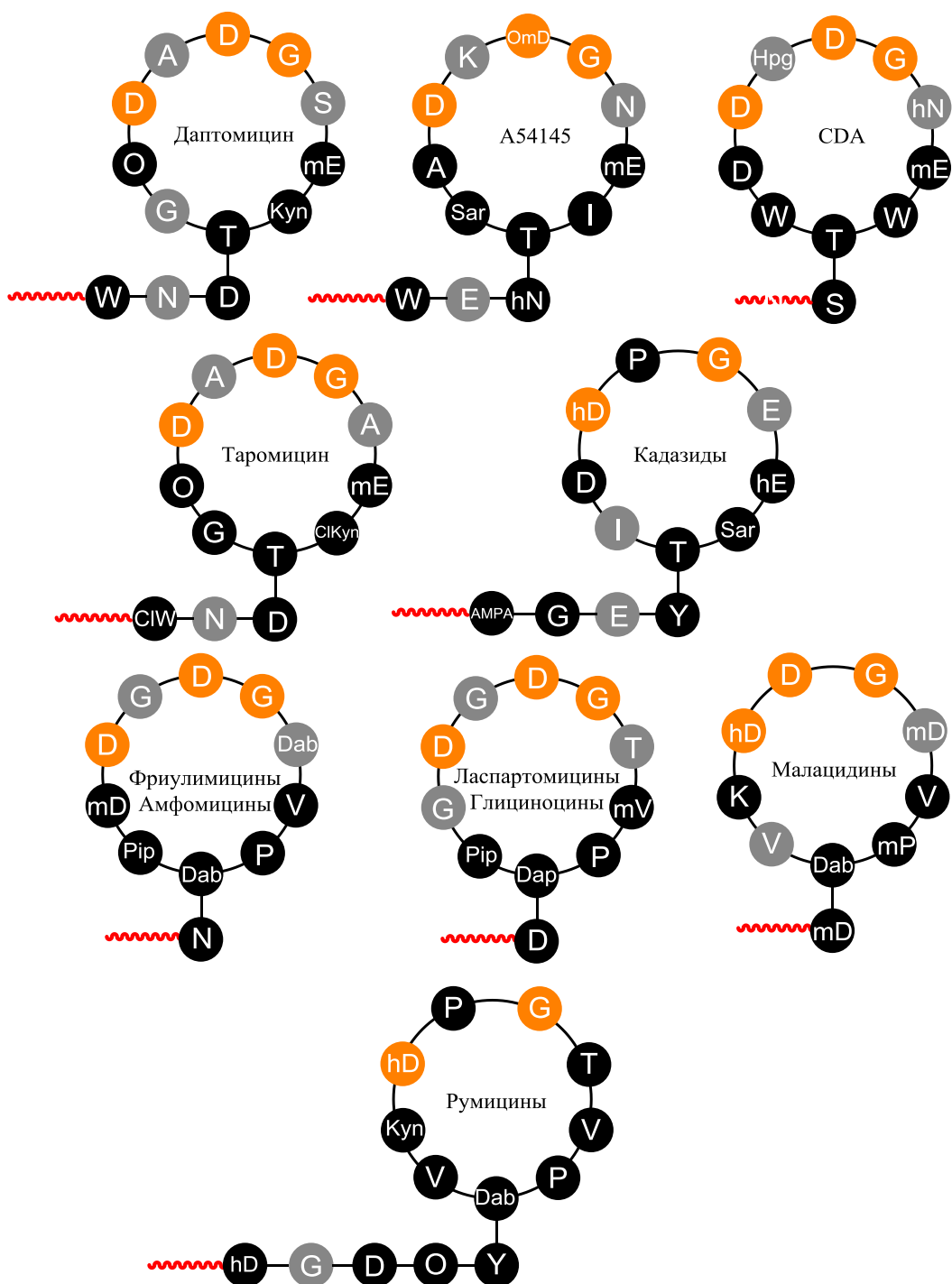
ной кислоте. Эти соединения имеют ряд существенных структурных отличий от других липопептидов, например, уменьшенный по сравнению с известными аналогами размер макроциклической части молекулы (9 аминокислот). Предполагается, что их механизм действия и мишень в клеточной стенке отличается от других представителей семейства анионных липопептидов [42].



**Рис. 11.** Циклические липопептиды структурного семейства малацидина

### 1.1.3. Структурные мотивы циклических липопептидов

Анионные циклические пептидные антибиотики имеют ряд существенных структурных особенностей, во многом обуславливающих их биологическую активность (Рис. 12). Циклическое ядро большинства этих антибиотиков содержит 10 аминокислот, а длина боковой цепи варьируется от 1 до 3 аминокислот. Сочетание анионогенных групп антибиотика с остатком жирной кислоты и гидрофобными аминокислотами обеспечивает амфифильный характер этих соединений. Наличие полярных групп также обеспечивает растворимость антибиотиков в воде.



**Рис. 12.** Схематические структуры циклических анионных кальций-зависимых липопептидов. Оранжевым отмечены аминокислоты, относящиеся к кальций-связывающему мотиву, серым выделены ахиральные и D-аминокислоты. Для простоты представлено по одному представителю каждого семейства антибиотиков.

Антибактериальная активность всех описанных соединений в той или иной степени зависит от ионов кальция. Большинство анионных циклических липопептидов содержат довольно консервативный мотив Asp-X-Asp-Gly (Рис. 12), где X – D-аминокислота, который предположительно отвечает за связывание с двухзарядными ионами [42]. Природа влияния двухзарядных ионов металлов на активность этих липо-

пептидов изучалась довольно активно, особенно для даптомицина. Тем не менее, остается не до конца понятным, объясняется ли влияние двухзарядных ионов конформационными изменениями в молекулах антибиотиков [58], образованием агрегатов [59] или изменением общего заряда молекулы [60]. Несмотря на то, что в малацидинах отсутствует канонический кальций-связывающий мотив Asp-X-Asp-Gly, их антибиотическая активность сохраняет значительную зависимость от концентрации ионов кальция. Это позволяет предположить, что малацидины представляют собой первые природные соединения с новым кальций-связывающим мотивом [42]. Структура антибиотиков румицинов описана менее подробно, а также отсутствуют данные об абсолютной конфигурации аминокислот. Несмотря на то, что молекула румицина содержит только 2 из 4 аминокислот, составляющих классический кальций-связывающий мотив, для них наблюдается сильная зависимость активности от концентрации ионов кальция [40].

Резюмируя сравнительный анализ липопептидов, можно отметить, что со структурной точки зрения эти антибиотики подразделяются на две группы по типу замыкания макролактонного кольца: депсипептиды (замыкающиеся С-концевой аминокислотой на гидроксильную группу треонина) и циклические пептиды (замыкание С-концевой аминокислоты на боковую аминогруппу диаминобутановой или диаминопропановой кислоты). При этом абсолютно для всех известных представителей структурного семейства соблюдаются два наиболее консервативных правила: в третьем положении макроцикла находится аспарагиновая кислота или ее производное, а в третьем положении с С-конца – ахиральная или D-аминокислота (Рис. 12).

#### **1.1.4. Механизмы действия липопептидных антибиотиков**

Кальций-зависимые антибиотики можно разделить на две группы по структурным особенностям и механизму действия. Первая группа включает даптомицин, таромицин, CDA и A54145, представляющие собой депсипептиды. Для тех антибиотиков этой группы, для которых изучен механизм антибактериальной активности, он реализуется за счет повреждения клеточной мембраны [32,61–63]. Наибольшее количество исследований в этой области посвящено механизму действия даптомицина, но и он остается не до конца понятным [64,65]. Долгое время считалось, что даптомицин нарушает цитоплазматическую мембрану клетки за счет агрегации в липидном бислое, причем для агрегации требуется присутствие ионов кальция (Рис. 13) [64]. Тем не менее, продолжающиеся исследования механизма действия даптомицина приводили к целому ряду противоречивых результатов, в том числе и указывающих на существенные нарушения биосинтеза клеточной стенки под действием этого антибиотика [66,67]. Недавнее исследование показа-

ло, что нарушения биосинтеза клеточной стенки под действием даптомицина вызываются дислокацией ассоциированных с мембраной белков, участвующих в этом процессе [61]. Последняя работа в этой области идентифицировала молекулярную мишень действия даптомицина. Бактерицидное действие обеспечивается образованием трехчленного комплекса между даптомицином (в виде комплекса с ионом  $\text{Ca}^{2+}$ ), прекурсором биосинтеза клеточной стенки липидом II и мембранным фосфолипидом фосфатидилглицерином (phosphatidylglycerol, PG) [65]. Эта модель объясняет в том числе и довольно узкий для мембраноповреждающего соединения спектр активности даптомицина. Восприимчивость к этому липопептиду хорошо коррелирует с содержанием PG в мембране микроорганизма. Тем не менее, реализация бактерицидного действия этого антибиотика нуждается в дальнейшем уточнении.

Вторая группа анионных липопептидов ингибирует синтез клеточной стенки. Эти антибиотики, как правило, являются циклическими пептидами. Исключением являются недавно обнаруженные депсипептиды – кадазиды [43]. Несмотря на формальную общность механизма, молекулярные мишени, химические структуры и принцип действия ингибиторов синтеза клеточной стенки крайне разнообразны (Рис. 13). Например, низкомолекулярные антибиотики фосфомицин [68] и циклосерин [69] ингибируют начальные стадии биосинтеза пептидогликановых строительных блоков. Остальные ингибиторы синтеза клеточной стенки действуют с периплазматической стороны мембраны. Например, хорошо изученные  $\beta$ -лактамы антибиотики ингибируют стадию транспептидации и имеют ферментную мишень (связываются с DD-транспептидазой) [70].

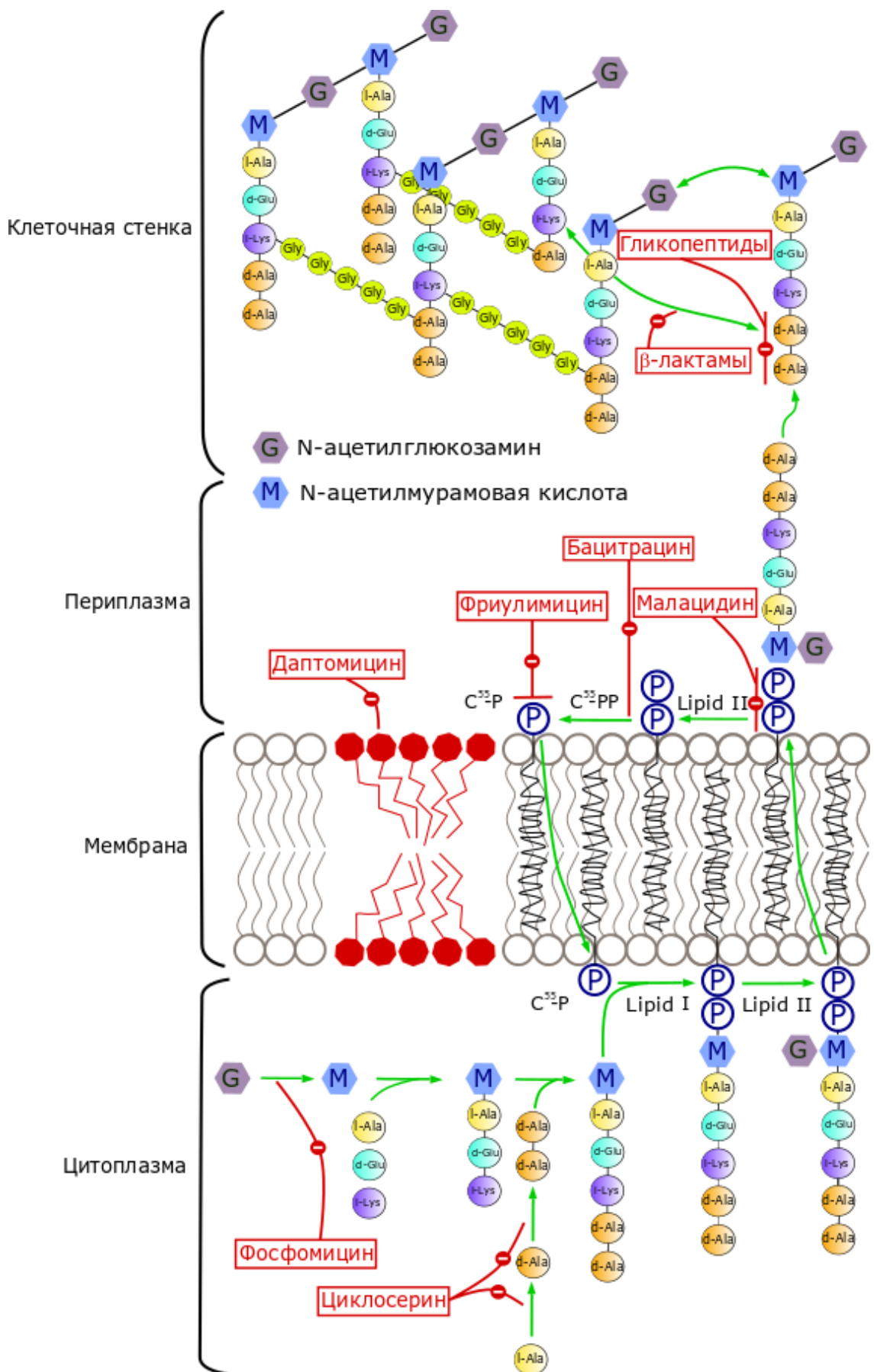


Рис. 13. Мишени некоторых антибиотиков, ингибирующих биосинтез клеточной стенки

Даже для пептидных ингибиторов синтеза клеточной стенки мишени и молекулярные механизмы действия весьма разнообразны. Так, гликопептидные антибиотики связываются с D-Ala-D-Ala концом в липиде II, препятствуя наращиванию пептидогликана [71]. Пептидный антибиотик бацитрацин ингибирует реакцию дефосфорилирования ундекапренил пирофосфата (C<sub>55</sub>-PP) [72]. Что касается собственно липопептидных антибиотиков, их мишени также отличаются. Фриулимицин и его структурные аналоги (ласпартомицин) связываются с ундекапренил фосфатом (C<sub>55</sub>-P) [73,74]. Недавно обнаруженные циклические пептиды малацидины А,В (Рис. 11) связываются с липидом II, мишенью гликопептидных антибиотиков. Тем не менее, они активны против устойчивых к ванкомицину штаммов, что говорит о принципиально ином механизме связывания [42]. Мишенью последних обнаруженных липопептидов –кадазидов А,В, по-видимому, также является липид II [43].

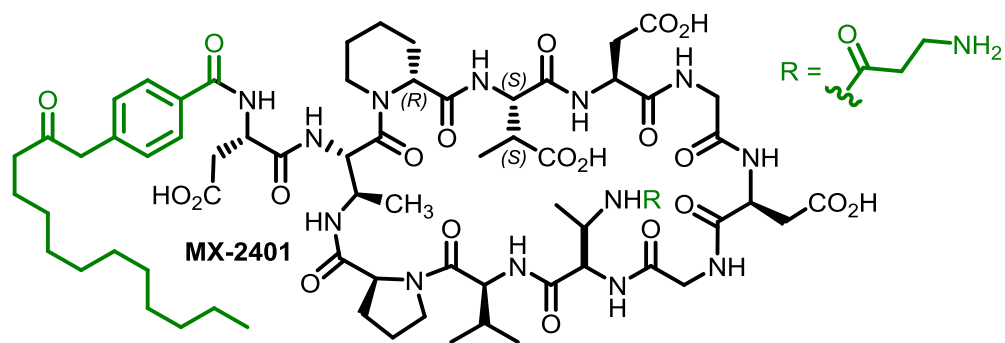
Таким образом, несмотря на сходство структур, молекулярные мишени липопептидных антибиотиков очень разнообразны, что делает изучение закономерностей реализации их антибиотической активности крайне интересной задачей.

### **1.1.5. Биологические свойства липопептидных антибиотиков и их применение к клинической практике**

В основном липопептидные антибиотики проявляют антибактериальные свойства в отношении грамположительных, но не грамотрицательных бактерий [24,25,75]. Наиболее изучены свойства даптомицина. Этот антибиотик был одобрен и успешно применяется для лечения сложных кожных инфекций и инфекций мягких тканей, эндокардита и бактериемии, вызванных грамположительными патогенами [76]. Тем не менее, разработка и внедрение этого препарата была непростой [77]. На второй фазе клинических испытаний препарата обнаружили критические побочные эффекты – антибиотик поражал мышечную ткань испытуемых. Позже оказалось, что при однократном введении препарата поражения мускулатуры существенно снижены [78], что увеличило терапевтический индекс препарата и позволило применять его в клинической практике. В результате, в 2003 году даптомицин стал первым из анионных липопептидных антибиотиков, одобренных FDA для лечения инфекционных заболеваний.

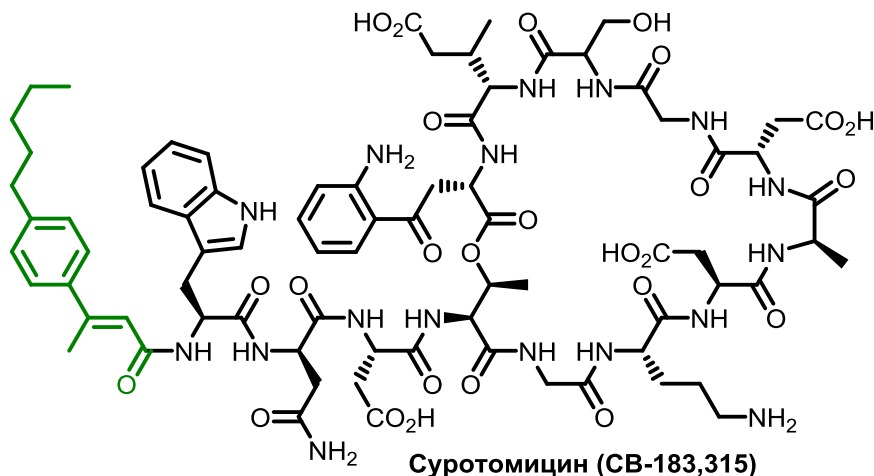
Многие липопептидные антибиотики, которые не были введены в клиническую практику из-за высокой токсичности, послужили ценным материалом для разработки полусинтетических и синтетических препаратов [75]. Например, на основе амфомицина, применение которого в качестве антибиотика было недолгим из-за побочного эффекта

(гемолиза), был разработан препарат MX-2401 [56,79,80], проходящий доклинические испытания (Рис. 14).



**Рис. 14.** Полусинтетический антибиотик MX-2401 на основе амфомицина. Зеленым отмечены синтетические модификации.

На основе даптомицина был разработан синтетический препарат СВ-183,315 [81], имеющий ту же последовательность аминокислот, но содержащий ароматический ненасыщенный заместитель в жирном хвосте (Рис. 15). Этот препарат, позже названный суротомицином, был разработан в рамках исследования по вариации жирной кислоты в даптомицине с целью получения производного, проявляющего более высокую активность в отношении *Clostridium difficile* [82]. Данный препарат проходит клинические испытания.



**Рис. 15.** Синтетический антибиотик суротомицин (CB-183.315) на основе даптомицина. Зеленым отмечены синтетические модификации.

### 1.1.6. Биосинтез анионных циклических липопептидов

Биосинтез изучен для значительного числа анионных циклических липопептидов [25] (Таблица 2). Эти соединения представляют собой нерибосомальные пептиды, синтезируемые крупными ферментными комплексами – синтетазами нерибосомальных пептидов (NRPS, non-ribosomal peptide synthetase) [83]. Биосинтез таких липопептидов начи-



нается с остатка жирной кислоты, а замыкание кольца происходит с участием тиоэстеразного домена.

Таблица 2. Литературные сведения о биосинтетических генных кластерах анионных циклических липопептидов.

Соединение	NRPS	Год описания	MiBIG	Ссылка
CDA (calcium-dependent antibiotics)	<i>cdaPS1, cdaPS2, cdaPS3</i>	2002	BGC0000315	[84]
Даптомицин (A21978C)	<i>dptA, dptBC, dptD, dptE</i>	2005	BGC0000336	[46]
A54145	<i>lptA, lptB, lptC, lptD</i>	2006	BGC0000291	[49]
Фриулимицины (амфомицины)	<i>pstA, pstB, pstC, pstD</i>	2007	BGC0000354	[85]
Ласпартомицины	<i>lpmA, lpmB, lpmC, lpm D</i>	2011	BGC0000379	[86]
Таромицин	<i>tar8, tar9, tar10</i>	2014	BGC0000439	[41]
Малацидины	<i>mlcA, mlcK, mlcM, mlcM</i>	2018	BGC0001448	[42]
Кадазиды	<i>cdeI, cdeJ, cdeK</i>	2019	BGC0001968	[43]

Биосинтетический генный кластер липопептидов семейства CDA был установлен одним из первых в семействе [84] и впоследствии активно изучался [87,88], в том числе и для получения модифицированных производных с помощью генетических манипуляций [89–94]. Помимо ключевых генов, кодирующих NRPS, биосинтетический генный кластер CDA включает гены, вовлеченные в биосинтез непротеиногенных аминокислот, в том числе гидроксифенилглицина (HPG). Особый интерес представляет биосинтез редких аминокислот 3-метилглутамата (mGlu, mE, (2S,3R)-3-methyl glutamate) [95,96] и 3-гидроксиаспарагина (hAsn, hN) [97,98].

NRPS, вовлеченные в биосинтез липопептидов семейства даптомицина были описаны при полногеномном секвенировании штамма продуцента *Streptomyces roseosporus* [46]. Границы BGC были подтверждены с помощью гетерологической экспрессии. Помимо основных биосинтетических генов, кластер содержит также гены, ответственные за биосинтез непротеиногенных аминокислот – кинуренина (Kyn) и 3-метилглутамовой кислоты (mGlu, mE). Анализ доменной архитектуры NRPS показал наличие домена эпитимеризации во втором модуле протеина *dptA*, что позволило уточнить стереоконфигурацию остатка D-Asn<sub>2</sub>, который ранее считался L-изомером. Высокий интерес к даптомицину в связи с его успешным внедрением в клиническую практику привел к обшир-

ным исследованиям в области получения модифицированных аналогов на основании геномных данных [99–102].

Использование гетерологической экспрессии позволило выявить набор генов, вовлеченных в биосинтез антибиотиков семейства A54145 [49]. Помимо основных NRPS, аналогичных ранее описанным BGC, в биосинтез антибиотиков A54145 вовлечены энзимы, отвечающие за биосинтез необычных аминокислот, как встречавшихся в ранее изученных антибиотиках этого класса (hAsn, mGlu), так и непротеиногенных остатков саркозина (Sar) и 3-метоксиаспарагиновой кислоты (OmAsp, OmD).

Анализ полногеномной последовательности штамма *Actinoplanes friuliensis* выявил биосинтетический генный кластер, вовлеченный в биосинтез липопептидов семейства фриулимицинов (амфомицинов) [85]. Пептидное ядро фриулимицинов содержит ряд непротеиногенных аминокислот: 3-метиласпарагиновую кислоту (mAsp, mD), пиперидиновую кислоту (Pip, pipercolinic acid), 2,3-диаминобутановую кислоту (2,3-Dab). Ферменты, вовлеченные в биосинтез этих аминокислот, были выявлены и их функции подтверждены с помощью получения мутантов с нокдауном соответствующих генов. Гены биосинтеза 2,3-диаминобутановой кислоты описаны для амфомицинов впервые. Гомологичные гены биосинтеза Pip и Dab (dabA, dabB, dabC) были обнаружены также в *lpm* BGC (вовлеченном в биосинтез ласпартомицина) [86], несмотря на то, что в состав ласпартомицинов диаминобутановая кислота не входит, а пептидное ядро замыкается на остаток диаминопропановой кислоты (Dap). Интересно, что протеины биосинтеза Dap в кластер не входят и закодированы в другой части хромосомы.

Растормаживание молчащих биосинтетических путей привело к выделению и описанию BGC антибиотиков таромицинов (Рис. 6), близких аналогов даптомицина. Наибольший интерес представляет необычная аминокислота – 4-хлоркинуренин (Cl-Kyn), входящая в состав этих соединений [41]. Биосинтез Cl-Kyn из триптофана был подробно изучен [103].

Особый интерес представляют выделенные недавно с помощью метагеномных методов липопептидные антибиотики малацидины [42] и кадазиды [43]. Эти антибиотики обладают оригинальной структурой и существенными отличиями в пептидном ядре (Рис. 12), что подтверждает перспективность метагеномных подходов для поиска новых семейств пептидных антибиотиков.

## 1.2 Антифунгальные 20-членные макролиды

### 1.2.1 Структурные семейства вентурицидина и ирумамицина

20-членные макролиды являются довольно распространенным типом вторичных метаболитов стрептомицетов. Первым представителем семейства антифунгальных 20-членных макролидов является вентурицидин А, выделенный в 1961 году [104]. Несколько лет спустя был выделен вентурицидин В из штамма *Streptomyces aureofaciens* DUGGA [105]. Структура этих соединений, включая стереоконфигурацию оптических центров, была установлена в 1972 году (Рис. 16) [105]. Независимо из штамма рода *Streptomyces* были выделены антибиотики, названные аабомицины А1 и А2 [106,107], которые, как было установлено позже, оказались идентичны вентурицидинам А и В соответственно [108]. Позже были выделены два других близких структурных аналога вентурицидина – 17-гидроксивентурицидин [109] и X-14952В [16]. Последним обнаруженным представителем структурного семейства вентурицидина является вентурицидин С, выделенный в 2014 году из культуральной жидкости штамма *Streptomyces* sp. TS-2-2 [110].

Ирумамицин, впервые описанный в 1980-х годах [15,111,112], представляет собой близкий аналог вентурицидина, содержащий эпоксидный цикл в боковой цепи (Рис. 16). Позже был описан только один ирумамицин-подобный антибиотик – АМ-3603А-3, 3'-декарбамоилирумамицин [113].

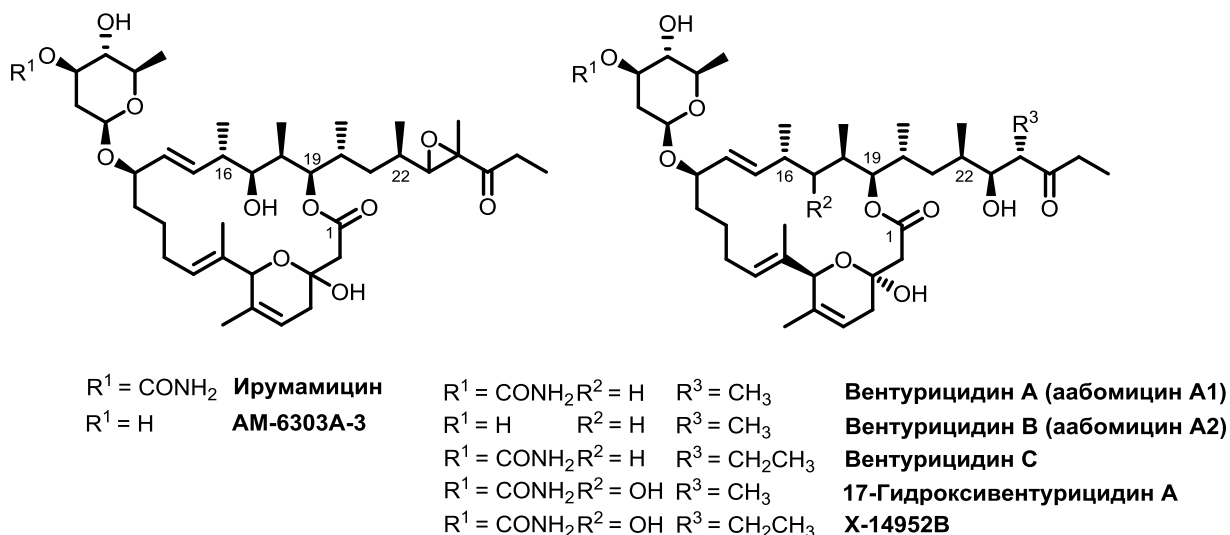


Рис. 16. Гликозилированные 20-членные макролиды.

Конфигурации стереоцентров вентурицидинов А и В были строго определены с помощью химической деградации и рентгеноструктурного анализа [105,114]. С помощью встречного синтеза было показано, что абсолютная конфигурация фрагмента С(16)-С(22) ирумамицина совпадает с конфигурацией вентурицидина [115,116]. Для других

представителей структурного семейства вентурицидина опубликованы только спектральные данные, позволяющие предполагать, что их конфигурация совпадает с аналогичными фрагментами вентурицидинов. Так, химическая характеристика 17-гидроксивентурицидина А и Х-14952В была проведена намного позже их первичного обнаружения при выделении из культуральной жидкости другого штамма-продуцента [117]. При описании вентурицидина С [110] стереоконфигурация также была предложена на основании сравнения спектральных данных всех аналогичных 20-членных макролидов. Конфигурации эпоксидного цикла и стереоцентров полукетального цикла ирумамина на момент начала исследования не была известна.

### 1.2.2. Биологическая активность 20-членных макролидов

Вентурицидины А и В и ирумамицин изначально описаны как антифунгальные антибиотики, перспективные для применения в сельском хозяйстве [15,104]. Эти соединения обладают выраженной активностью против фитопатогенных микромицетов, при этом не токсичны для растений. 20-членные макролиды обладают широким спектром антифунгальной активности, но практически не активны против бактерий (Таблица 3). Особенно высокую активность антибиотики этой группы проявляют в отношении грибов родов *Piricularia* и *Trichophyton*.

Таблица 3. Спектр антимикробного действия 20-членных макролидных антибиотиков.

Тест-штамм		Вентурицидин А [104,106,112]	Ирумамицин [111,112]	Ируманолид I [118]	Ируманолид II [118]
Род	Вид				
Антифунгальная активность (мкг/мл)					
<i>Alternaria</i>	<i>kikuchiana</i>	>25	3.1-12.5		
<i>Ascochita</i>	<i>pisi</i>	40			
<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	5	25	>100	>100
	<i>brevipus</i>		1.6		
<i>Alternaria</i>	<i>tenuis</i>	5			
<i>Botrytis</i>	<i>cinerea</i>	2.5	6.3-12.5	>50	>50
		>25			
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	12.0	>100	>100	>100
<i>Cercospora</i>	<i>melonis</i>	1.25			
<i>Cladosporium</i>	<i>fulvum</i>	100			
<i>Cochliobolus</i>	<i>miyabeanus</i>	3.0			
<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>		>100	>100	>100
<i>Didymella</i>	<i>cingulate</i>	2.5			
<i>Gloeosporium</i>	<i>lacticolor</i>	10.0			
	<i>kaki</i>	1.0			
<i>Fusarium</i>	<i>nivale</i>	2.5			

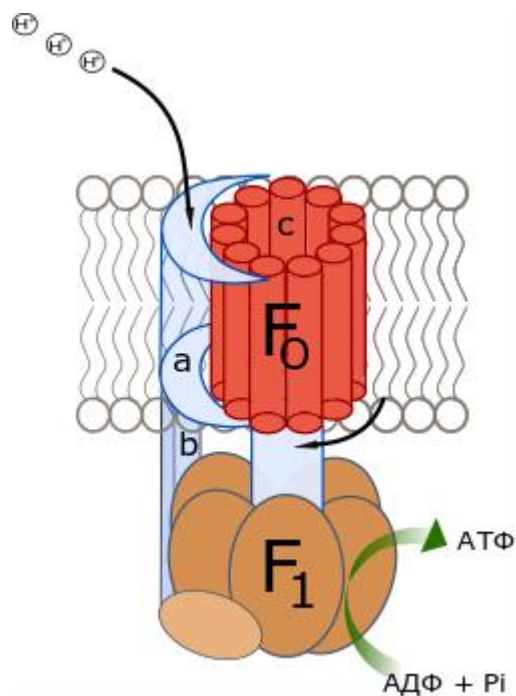
Тест-штамм		Вентурицидин А [104,106,112]	Ирумамицин [111,112]	Ирумананолид I [118]	Ируманано- лид II [118]
Род	Вид				
	<i>oxysporum</i>		>100		
<i>Glomerella</i>	<i>cingulate</i>	10.0 >100			
<i>Helminthosporium</i>	<i>avenae</i>	2.5			
<i>Macrosporium</i>	<i>batapicola</i>	10.0			
<i>Microsporium</i>	<i>gypseum</i>		50	>50	>50
<i>Mucor</i>	<i>racemosus</i>		>100	>50	>50
<i>Pellicularia</i>	<i>flamentosa</i>	10.0			
	<i>sasakii</i>	>25	25		
<i>Phoma</i>	<i>betae</i>	5.0			
<i>Piricularia</i>	<i>oryzae</i>	0.001	<0.1	1.56	50
<i>Pythium</i>	<i>debaryanum</i>	5.0			
<i>Penicillium</i>	<i>basicola</i>	10.0			
	<i>chrysogenum</i>		0.2		
<i>Saccharomyces</i>	<i>sake</i>		>100	>100	>100
<i>Sclerotinia</i>	<i>cinerea</i>	0.8	<0.1	25	50
<i>Thielaviopsis</i>	<i>basicola</i>	20.0			
<i>Trichophyton</i>	<i>asteroides</i>	1.5			
	<i>interdigitale</i>		3.1	50	50
	<i>rubrum</i>	0.8			
	<i>mentagrophytes</i>	1.5			
<i>Trichothecium</i>	<i>roseum</i>	5.0			
<i>Ustilago</i>	<i>maydis</i>	5.0			
<i>Verticillium</i>	<i>alboatrum</i>	2.5			
Антибактериальная активность (мкг/мл)					
<i>Corynebacterium</i>	<i>paurometabolum</i>		0.2		
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	>100	100		
<i>Streptococcus</i>	<i>pyogenes</i>		25		
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	>100	>100		
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>		>100		
<i>Mycobacterium</i>	<i>smegmatis</i>	>100	100		
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	>100	>100		
<i>Xanthomonas</i>	<i>oryzae</i>	>100	>100		
<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae</i>	>100			

Первые опыты на мышах показали отсутствие у вентурицидина А токсичности при оральном применении [104]. Исследования аабомидина А (позже оказавшегося идентичным вентурицидину А) показали острую токсичность на мышах (интраперитонеальное введение) около 500 мг/кг [106]. Острая токсичность ирумамицина, определенная на мышах (интраперитонеальное введение), составляет 300 мг/кг [111,112].

### 1.2.3. Механизм действия вентурицидина

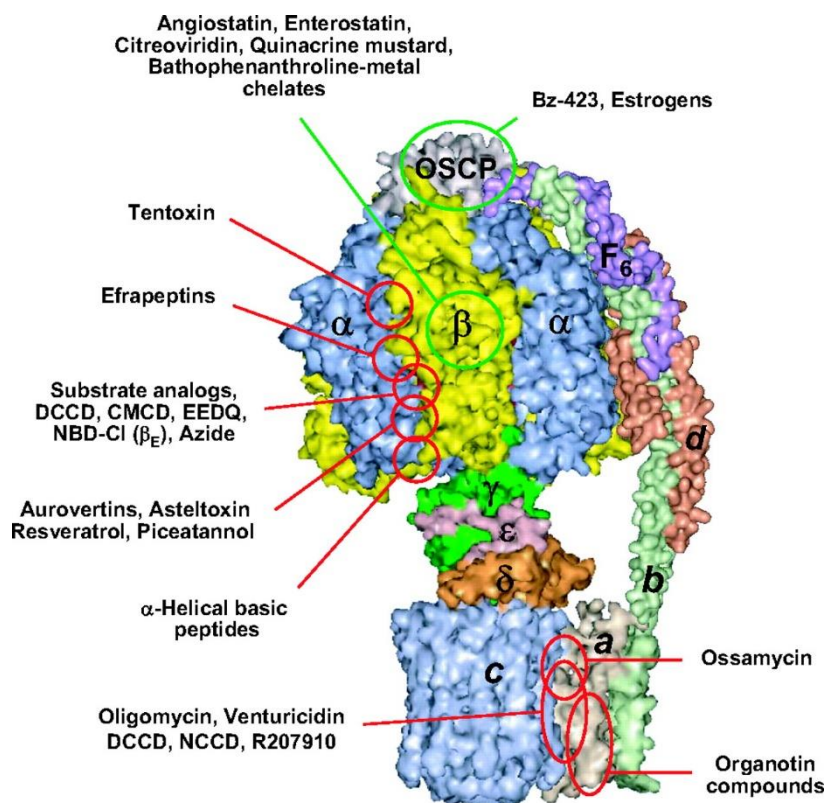
Среди 20-членных антифунгальных макролидов описываемого семейства исследования механизма действия проводились только для вентурицидина. Предполагают, что этот антибиотик связывается с  $F_1F_0$  АТФ-синтазой и подавляет транспорт протонов через мембранную часть фермента [119]. АТФ-синтаза является ключевым ферментом в клеточном обмене энергией [120]. В процессе окислительного фосфорилирования этот крупный протеиновый комплекс использует градиент концентрации протонов и соответствующий мембранный потенциал для синтеза АТФ. Он также может действовать в обратном режиме и генерировать градиент концентрации протона за счет гидролиза АТФ.

АТФ-синтаза представляет собой крупный комплекс с молекулярной массой порядка 550-650 кДа и располагается в плазматических мембранах бактерий, мембранах тилакоидов хлоропластов и митохондриальных мембранах у растений и животных, а также многих других клеточных мембранах [120,121]. Фермент, как видно из названия, состоит из двух частей (Рис. 17). Мембранная часть фермента  $F_0$  содержит субъединицы  $a, b$  и  $c$ , последние схематично изображены на рисунке в виде красных цилиндров (Рис. 17). Вторая часть фермента  $F_1$  содержит три пары субъединиц  $\alpha$  и  $\beta$ , в которых находится три каталитических центра, а также субъединицы  $\gamma, \delta, \epsilon$ , формирующие центральную часть фермента. При катализе окислительного фосфорилирования, фермент действует как ротационный мотор. Транспорт протонов по градиенту химического потенциала приводит к вращению кольца субъединиц с относительно статичной части фермента. Вращение передается каталитической части  $F_1$ , что обеспечивает синтез АТФ [120].



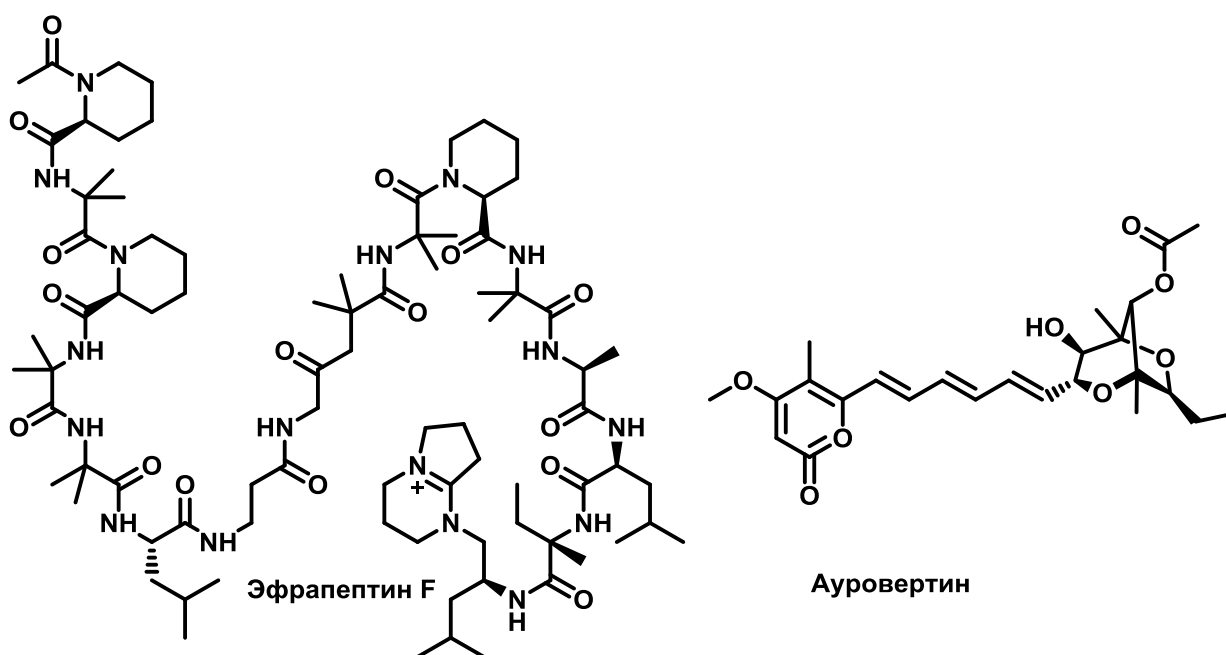
**Рис. 17.** Схематическое представление устройства АТФ-синтазы

АТФ-синтаза является мишенью многих антибиотиков. При этом химическая природа и сайты связывания у различных ингибиторов синтеза АТФ довольно разнообразны [121,122] (Рис. 18). Например, для антибиотиков, ингибирующих каталитическую часть фермента  $F_1$  известно четыре сайта связывания – каталитический центр и три аллостерических сайта ингибирования [123].



**Рис. 18.** Сайты связывания ингибиторов  $F_1F_0$ - АТФ-синтазы [121]

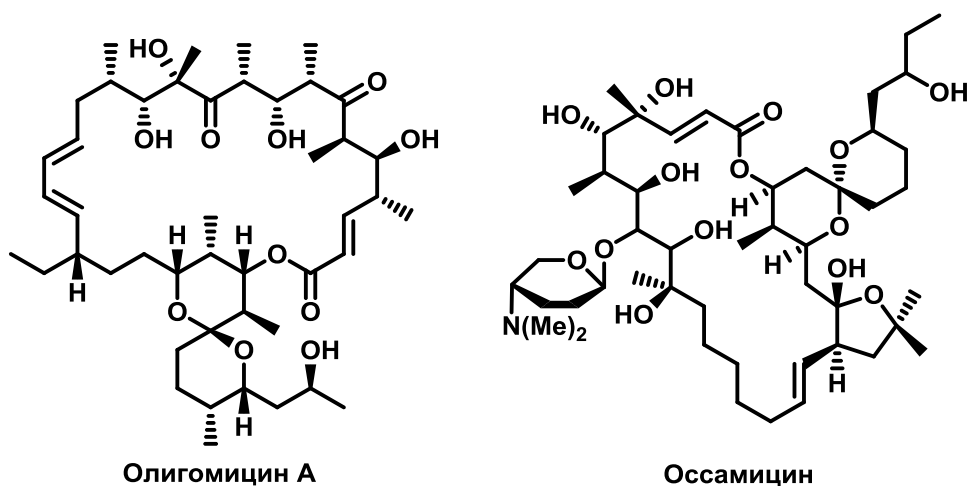
Ингибирование каталитического центра фермента (в области сочленения  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц) осуществляется аналогами субстрата (производные нуклеотидов, миметики переходного состояния), а также за счет взаимодействия с реакционно-способными группами фермента (например, азид-ион связывается с каталитическим центром и стабилизирует комплекс с субстратом) [121,123]. Вблизи каталитического центра находятся также аллостерические сайты, связывание с которыми способно нарушать каталитическую функцию фермента. Примерами ингибиторов  $F_1$  АТФ синтазы за счет связывания с аллостерическими сайтами являются семейства антибиотиков ауровертинов и эфрапептинов (Рис. 19).



**Рис. 19.** Примеры антибиотиков-ингибиторов  $F_1$  - АТФ-синтазы

Хорошо изучен также механизм ингибирования мембранной части фермента -  $F_0$ . Обозначение  $F_0$  дали этой мембранной части фермента потому, что именно с ней связывается антибиотик олигомицин (Рис. 20). Одним из самых простых соединений, блокирующих работу мембранной части  $F_0$  АТФ-синтазы является дициклогексилкарбодимид. Он способен образовывать ковалентную связь с карбоксильной группой аминокислотного остатка субъединицы с и блокировать перенос протона через липидную мембрану. Среди антибиотиков наиболее изученными соединениями, связывающимися с  $F_0$  субъединицей АТФ синтазы являются олигомицин, оссамицин (Рис. 20) и вентурицидин (Рис. 18).



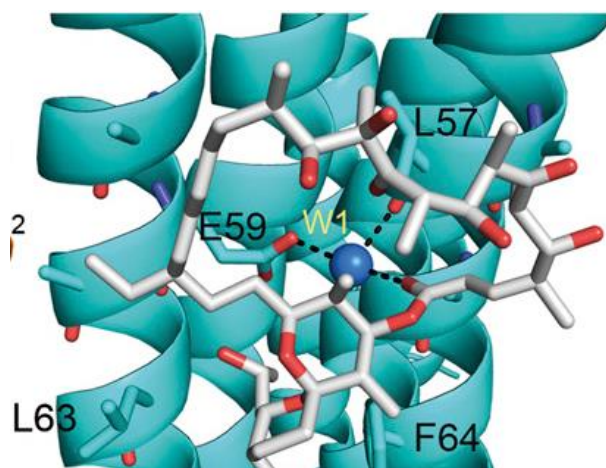


**Рис. 20.** Примеры антибиотиков-ингибиторов  $F_0$ -АТФ-синтазы

Впервые способность ингибировать действие АТФ-синтазы была показана для вентурицидина в 1967 году, еще до установления его структуры [124]. Это исследование показало, что вентурицидин имеет похожий на олигомицин D механизм ингибирования  $F_0$  части АТФ-синтазы, но уступает ему в активности. Позже было показано, что вентурицидин останавливает поток протонов через мембранную часть фермента эффективнее, чем олигомицин и оссамицин [119]. Аддитивный эффект вентурицидина и олигомицина D также позволял предположить одинаковую мишень этих антибиотиков [125].

Ценную информацию о молекулярных мишенях ингибиторов АТФ-синтазы удалось получить с помощью генетических исследований резистентных к антибиотикам мутантов [119,126–129]. Аминокислотные замены, дающие устойчивость к олигомицину у дрожжей, как правило, совпадали с таковыми для аналогов вентурицидина, но при тщательном анализе некоторые мутации позволяли увидеть разницу в чувствительности к этим антибиотикам. Устойчивость к вентурицидину обеспечивают аминокислотные замены 56, 57 и 64-го аминокислотных остатков, а к олигомицину – кроме упомянутых ещё и 53-го и 65-го, что позволяет предположить, что их сайты связывания накладываются друг на друга, но сайт олигомицина больше. При этом сайт связывания олигомицина был надежно установлен с помощью рентгеноструктурного анализа комплекса олигомицина и его белковой мишени [130].

Из структуры комплекса (Рис. 21) видно, что олигомицин тесно взаимодействует сразу с двумя с-субъединицами в окрестностях остатков глутаминовой кислоты 59, а молекула воды, которая входит в состав этого комплекса, образует водородные связи с полярными группами антибиотика и карбоксильной группой одного из этих остатков.



**Рис. 21.** Структура комплекса олигомицина с  $F_0$  субъединицей АТФ-синтазы [130], атомы молекулы олигомицина отмечены цветами (серый-углерод, красный-кислород, синий-азот). Молекула воды (W1, синяя) формирует мостиковую водородную связь между Glu59, Leu57 и сложноэфирным карбонилем олигомицина.

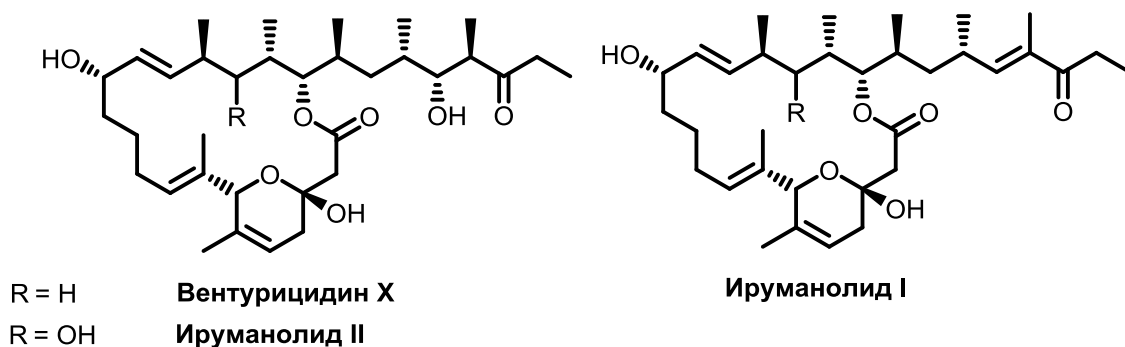
Структура комплекса (Рис. 21) наглядно показывает, что в непосредственной близости от олигомицина находятся атомы аминокислотных остатков 53, 56, 57, 60, 64 и 65, а остатки глицина 23 и 25 находятся на другой, N-концевой спиральной части субъединицы с, но в непосредственной близости от вышеперечисленных остатков С-концевой спирали. Такая структура комплекса хорошо объясняет аминокислотные замены, приводящие к искажению структуры и исчезновению сайта связывания антибиотика. На основании этих структурных исследований авторы также приходят к выводу, что олигомицин, вентурицидин и другие близкие к ним по механизму действия антибиотика делят между собой этот общий участок связывания, хотя точки молекулярных контактов для каждого из них почти наверняка различаются [130].

Способность олигомицина, вентурицидина и других антибиотиков этой группы ингибировать транспорт протонов через мембранную часть фермента широко использовалась как инструмент для изучения АТФ-синтаз различного происхождения [131–135].

#### **1.2.4. Биосинтез 20-членных антифунгальных макролидов**

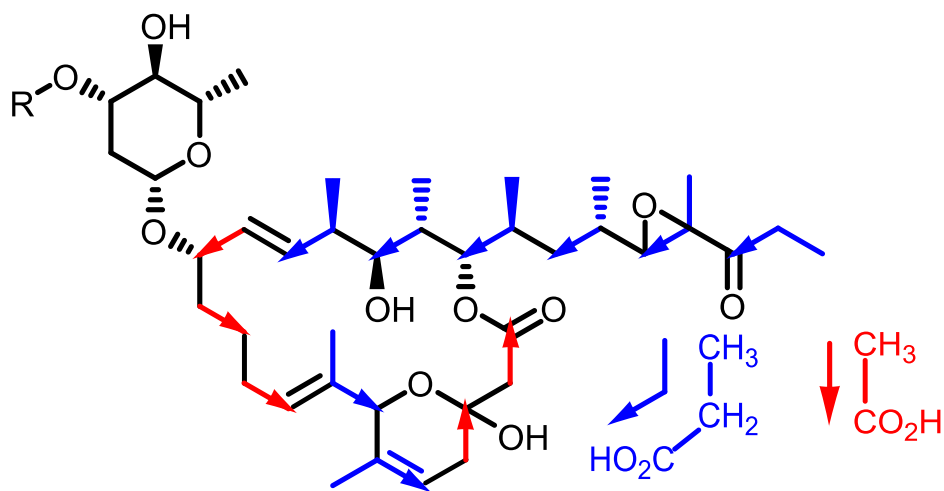
Биосинтетический генный кластер, вовлеченный в биосинтез 20-членных антифунгальных макролидов семейства вентурицидина в литературе на момент начала исследования описан не был. Сообщалось лишь о косвенных свидетельствах о некоторых этапах биосинтеза ирумамицина. Так, исследования мутантного штамма *Streptomyces subflavus* subsp. *irumaensis* AM-3603 позволили выделить негликозилированные промежуточные продукты – ируманолиды I и II (Рис. 22). Было показано, что ирумамицин синтезируется из ируманолида II через ируманолид I с помощью эпоксилирования и глико-

зилирования [118]. Позже из другого штамма рода стрептомицетов был выделен вентурицидин X [136], представляющий собой агликон вентурицидов А,В. Эти данные свидетельствуют о том, что продуктом поликетидсинтазы в случае 20-членных макролидов является не соединение с двойной связью, подвергающееся дальнейшему эпоксицированию (ируманолид I), а недегидратированный восстановленный продукт (ируманолид II)



**Рис. 22.** Структуры негликозилированных 20-членных макролидов.

Эксперименты с выращиванием штамма-продуцента на среде с добавлением изотопно-меченных прекурсоров биосинтеза поликетидов, примененные для установления структуры ирумамицина [137], пролили свет и на закономерности его биосинтеза. Было изучено включение в состав молекулы ирумамицина  $^{13}\text{C}$ -меченых ацетата и пропионата (Рис. 23).



**Рис. 23.** Схема встраивания  $^{13}\text{C}$  – меченых прекурсоров в молекулу ирумамицина.

Выявленные закономерности встраивания прекурсоров биосинтеза говорят о том, что метильные группы в составе антибиотика появляются в рамках изначальной сборки с помощью поликетидсинтазы, а не являются следствием посттрансляционных модификаций.

Недавно был опубликован предполагаемый путь биосинтеза родственных ирума-мицину вентурцидинов, который будет подробнее рассмотрен в обсуждении результатов [138].

### 1.3 Нафтохиноновые полиольные макролиды из природных источников

В последние годы был открыт целый ряд представителей редкого класса антибиотиков, содержащих два фармакофорных структурных фрагмента – полиольный макроцикл большого размера и замещённый нафтохинон.

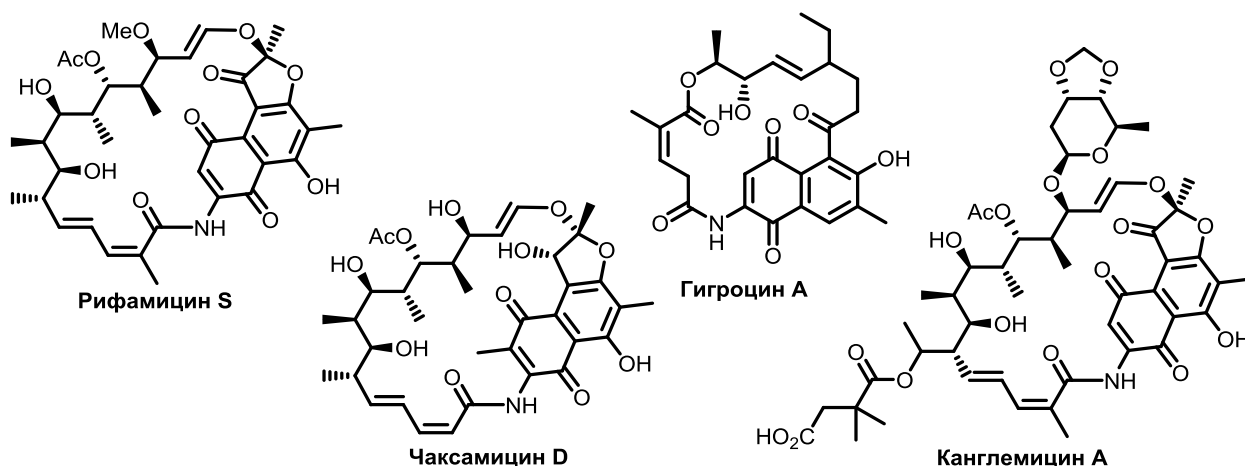
Сведения о штаммах-продуцентах нафтохиноновых полиольных макролидов приведены в таблице ниже. Как видно из приведенных данных, все они являются представителями стрептомицетов, однако выделены из различных биотопов.

Таблица 4. Штаммы-продуценты полиольных нафтохиноновых макролидов.

Соединение	Год выделения	Штамм-продуцент	Ссылка
Аксеномицины	1973	<i>Streptomyces lisandri</i> Bianchi et al.	[139,140]
GT35	1997	<i>Streptomyces</i> sp. GT35	[141]
A 77951	2000	<i>Streptomyces</i> sp. A-77951	[142]
Ланголид	2012	<i>Streptomyces</i> sp. Acta 3062	[143]
PM1001117/8	2015	<i>Streptomyces caniferus</i> GUA-06-05-006A.	[144]
Деплелиды	2017	<i>Streptomyces</i> sp. MM581-NF15	[145]
Каниферолиды	2019	<i>Streptomyces caniferus</i> CA-271066	[146]
Цифомицин	2019	<i>Streptomyces</i> sp. ISID311	[147,148]
Изеолиды	2020	<i>Streptomyces</i> sp. DC4-5	[149]

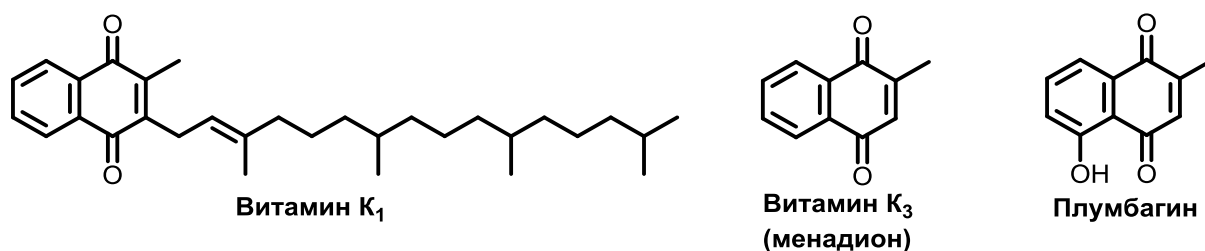
#### 1.3.1 Биологически активные 1,4-нафтохиноны

Редокс-активный 1,4-нафтохиноновый фрагмент встречается в различных природных веществах [150–152]. В частности, он входит в состав ряда макролактамных антибиотиков – рифамицина S [153], канглемицина А [154,155], гигроцинов [156]. и чаксамицинов [157] (Рис. 1), которые проявляют антибактериальную активность, в т.ч. в отношении грамотрицательных бактерий и возбудителя туберкулеза, цитотоксическую и другие типы биоактивности.



**Рис. 24.** Макролактамные антибиотики, содержащие 1,4-нафтохиноновый фрагмент

Среди других важных нафтохиноновых соединений следует отметить витамины К, являющиеся производными 2-метил-1,4-нафтохинона, например витамин К1 и К3 (менадион) (Рис. 25). Кроме регуляции каскада свертывания крови, в последнее время обсуждается роль нафтохиноновых соединений в межклеточной окислительно-восстановительной сигнализации [152,158]. Различные нафтохиноны, например, плумбагин (рис. 2) проявляют некоторую антифунгальную активность [159]. Ряд природных и синтетических нафтохинонов проявляет также противоопухолевую активность [160]. Нафтохиноновые соединения активно изучаются – как с точки зрения их электрохимических (редокс) свойств [161], так и развития синтетической методологии в области этих соединений [162].



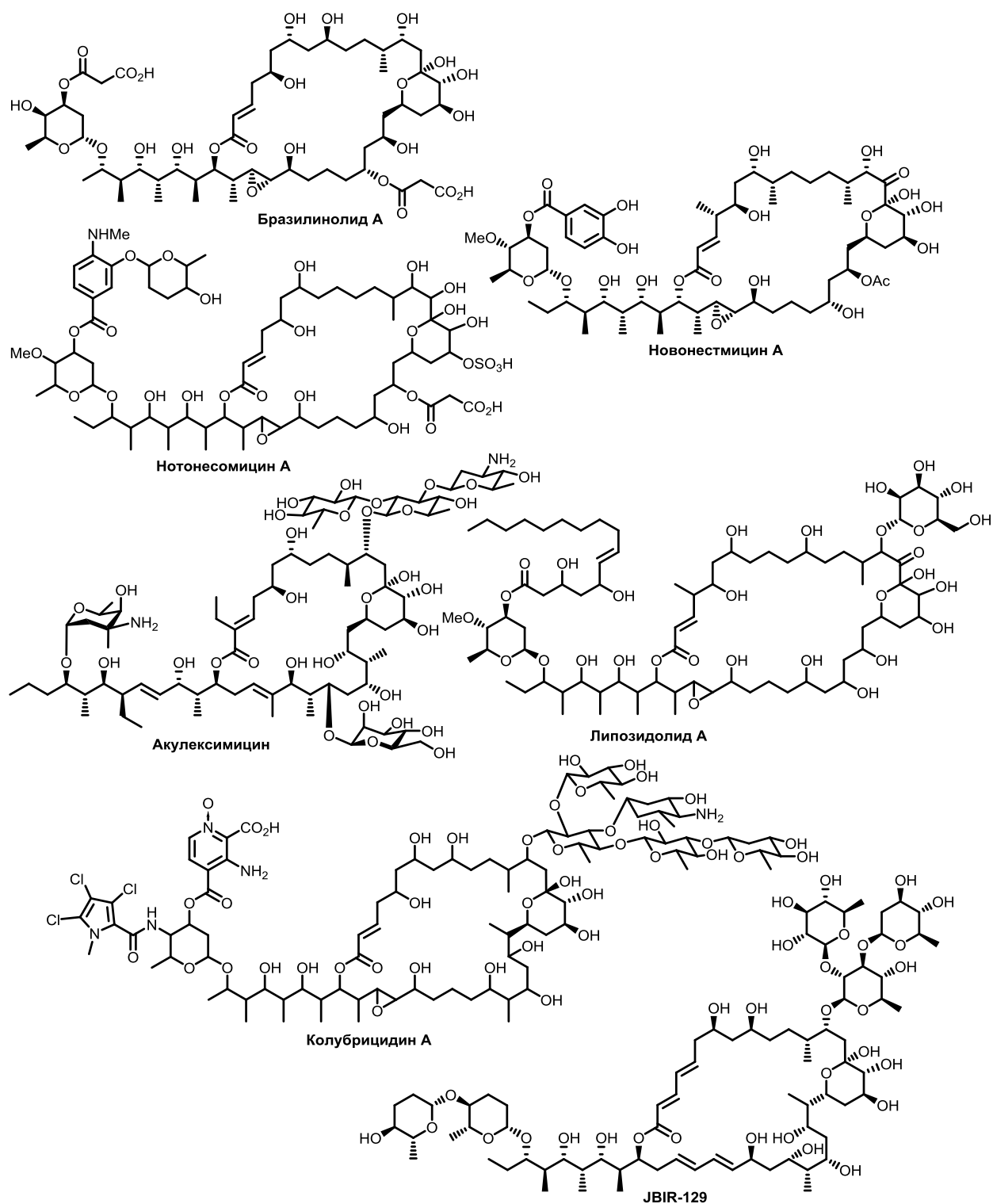
**Рис. 25.** Некоторые природные 1,4-нафтохиноны.

### 1.3.2 Биологически активные полиольные неполиеновых макролиды большого размера

Большие (>30 атомов в цикле) полиольные неполиеновые (не содержащие фрагментов из трех и более сопряженных двойных углерод-углеродных связей) макролиды [163] были открыты достаточно давно. В отличие от полиеновых макролидов типа амфотерицина [164], широко используемых в клинической практике, только нифимицин был зарегистрирован и производился как противогрибковое средство компанией

Фармахим, Болгария [165–167]. Тем не менее, подобные неполиеновые макролиды продолжают привлекать внимание исследователей. Эти антибиотики содержат большое число стереоцентров, которые похожи по своему химическому окружению. С другой стороны, такие соединения редко удается получить в кристаллической форме, что препятствует установлению абсолютной конфигурации стереоцентров с помощью рентгеноструктурного анализа. Кроме того, многие полиольные макролиды гликозилированы, что создает дополнительные трудности в их исследовании. Полная стереохимическая конфигурация большинства полиольных неполиеновых макролидов продолжает оставаться невыясненной или установленной недостаточно надежно.

Выделено несколько десятков соединений с различным размером макролактонового цикла и различной длиной основной углеродной цепи. В качестве примеров на Рис. 26 приведены структуры акулексимицина [168,169], бразилинолида А [170,171], нотонесомицина [172,173], новонестмицина А [174], колубрицидина А [175], JBIR-129 [176,177] и липозидолида [178]. В структурах этих соединений можно выделить ряд характерных особенностей: циклический полукеталь, идентичные сайты гликозилирования, идентичная или близкая стереохимия фрагментов. Эти закономерности позволяют предположить сходство биосинтетических генных кластеров для неполиеновых макролидов, и соответствующее сходство в организации поликетидсинтазного мультиферментного комплекса.

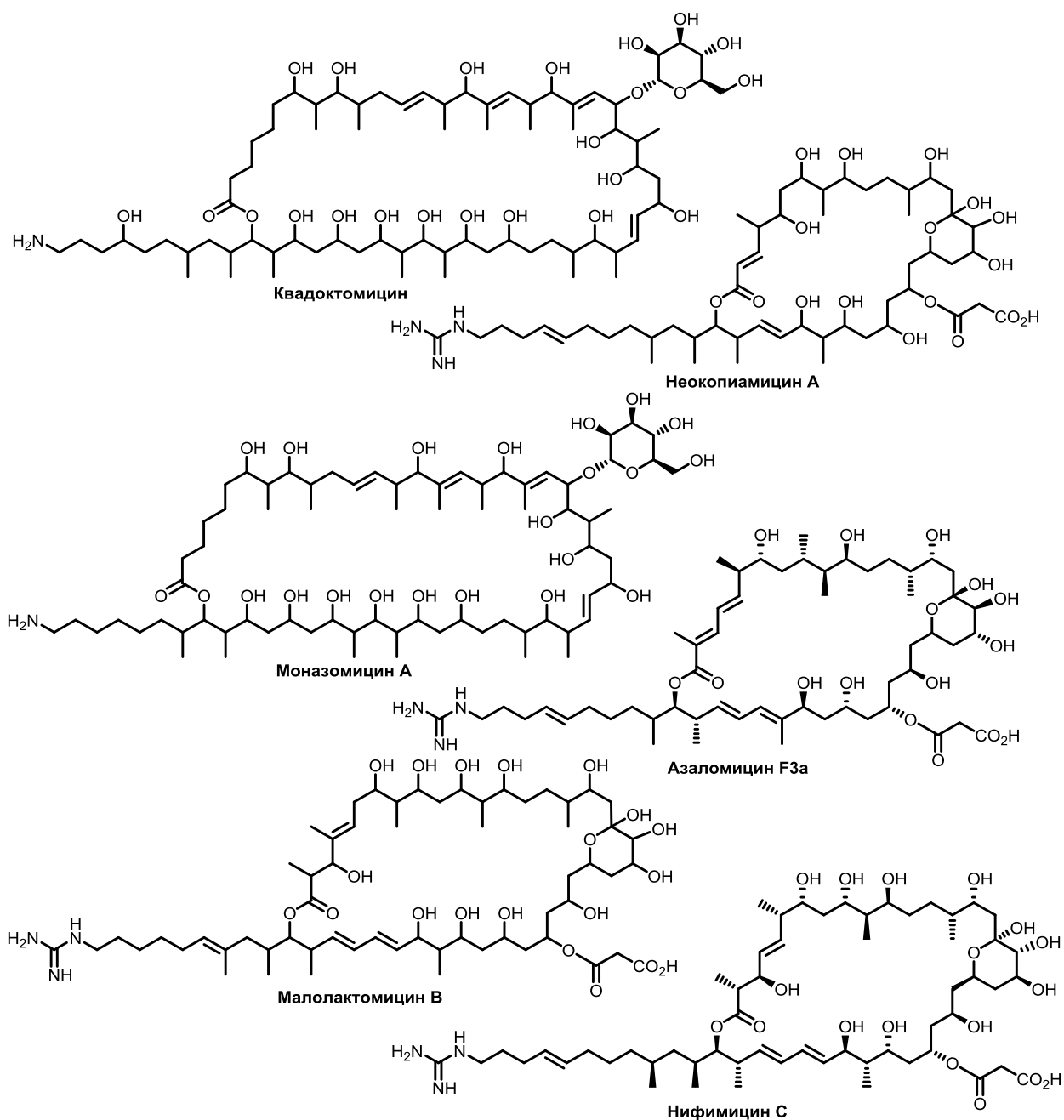


**Рис. 26.** Природные полиольные макролиды.

В некоторых случаях углеродная цепь может оканчиваться аминогруппой (например, в квадоктомицине и моназомицине) [179] или гуанидиновым остатком (в неокопиамицине [180], азаломицинах [181–184], нифимицинах [185], и малолактомицинах [186]) (Рис. 27). В биосинтезе таких веществ, на примере азаломицина, была зафиксирована интересная особенность: еноилредуктаза в одном из



доменов может быть временно «отключена», что порождает «нелинейность сборки» подобных поликетидов [187]. Аминогруппа, а особенно гуанидиновый остаток, способны к протонированию, таким образом, в кислой среде эти антибиотики имеют еще более выраженный амфифильный характер. Данная структура позволяет предположить способность образовывать трансмембранные поры в липидном бислое и в целом способствовать деполяризации клеточной мембраны чувствительных клеток. Например, авторы работы [188] показали, что активность азаломицина F<sub>5a</sub> в отношении метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA) связана с повреждением клеточной мембраны. Схожие выводы были сделаны группой японских исследователей при сравнительном изучении нифимицина и *N*-метил-*N*'-алкилгуанидиниевых производных в качестве модельных соединений: оба типа агентов одинаково повреждали чувствительные клетки и индуцировали окислительный стресс [189].



**Рис. 27.** Азотсодержащие полиольные макролиды.

### 1.3.3. Структура нафтохиноновых полиольных макролидов

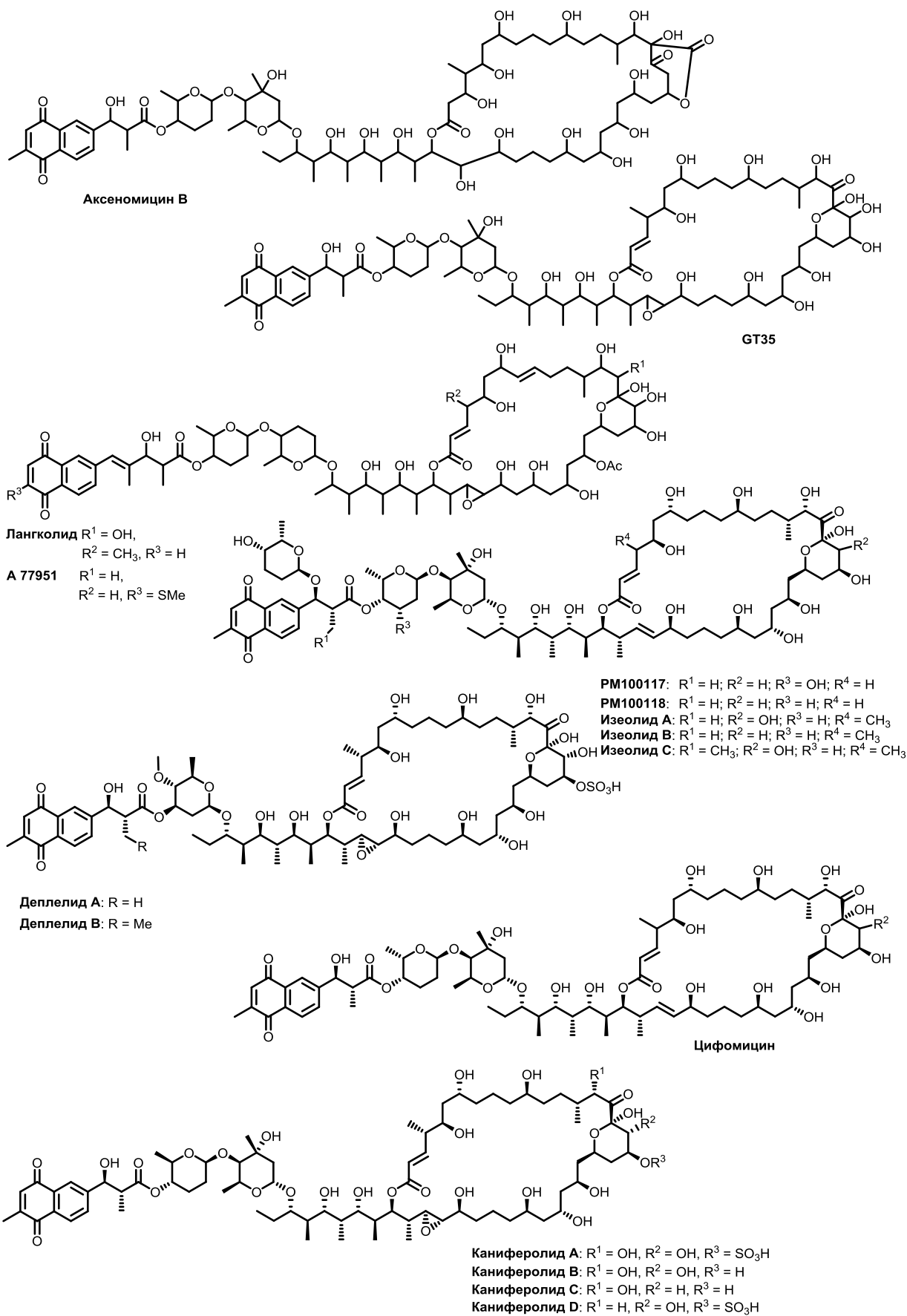
В 1973 г. был открыт и изучен антибиотик аксеномицин [139,140]. Строение аксеномицина В было изучено методами ЯМР и химической деградации, предполагаемая структура приведена ниже (Рис. 28). Было установлено, что в его составе одновременно присутствуют два агликона – нафтохиноновая кислота и полиольный макролид. Это был первый антибиотик такого типа. По данному объекту вышло лишь несколько статей [190–192], в которых сообщалось о биологических свойствах аксеномицина D (в отличие от аксеномицина В, одна из ОН-групп макролидного фрагмента сульфирована) [190],

затем публикации прекратились. В результате, строение аксеномицинов так и не было уточнено. Следует отметить ряд структурных особенностей: в частности, размер макроцикла и строение внутреннего полукетального цикла, сильно отличающихся от остальных представителей данной группы микробных метаболитов. Эти различия, наряду с недостаточно хорошо развитыми методами ЯМР-спектроскопии начала 1970-х гг., ставят под сомнение первоначально определенную структуру аксеномицина В.

Долгое время аксеномицины оставались уникальным объектом: прошло более 20 лет, прежде чем японскими исследователями была описана структура GT35 (Рис. 28) [141]. Еще через 5 лет, в 2000 г., была опубликована структура антибиотика А77951, с SMe-группой в нафтохиноновом агликоне [142]. Следующий представитель этого класса, ланглолид, был опубликован после долгой, 12-летней паузы [143]. При этом его относительная стереохимическая конфигурация была изучена весьма подробно, с привлечением современных методов ЯМР-спектроскопии.

В 2016-2018 гг испанскими и японскими исследователями были обнаружены две пары веществ – PM100117 и PM100118 [144,193,194] и деплелиды (А,В) [145] (Рис. 28). Структуры соединений были установлены через комплекс спектроскопических методов, в основном, ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , а также двумерными ЯМР (COSY, TOCSY, NOESY, ROESY, HSQC, HMBC). В случае деплелидов были проведены дополнительные ЯМР эксперименты (E.COSY, *J*-resolved HMBC), а также химическая деградация с последующей дериватизацией фрагментов, что позволило установить абсолютную конфигурацию большинства стереоцентров молекулы. Для PM100117/8 установлены только относительные конфигурации стереоцентров, однако практически идентичная структура фрагмента полиольного макролида во всех соединениях, а также очень близкие значения химических сдвигов соответствующих атомов Н и С позволяют предположить, что стереоконфигурация полиольных макролидов идентична.

В 2019 г. испанскими исследователями было обнаружено еще четыре вещества этой серии – каниферолиды А-Д. Для этой серии веществ был проведен полный комплекс методов спектроскопии ЯМР, аналогичный предыдущим исследованиям, что позволило установить относительные конфигурации всех стереоцентров. Также для них была определена абсолютная конфигурация. Сравнение полученных данных ЯМР каниферолидов, деплелидов, астолидов (полученных впервые в данной работе) и PM100117/8 позволило предположить абсолютную конфигурацию всей серии соединений (Рис. 28).[146] Для структурного семейства PM100117/8 в 2020 году были выделены еще три соединения, названные изеолидами А-С [149].



**Рис. 28.** Нафтохиноновые полиольные макролиды.

Еще одним представителем семейства нафтохиноновых полиольных макролидов является цифомицин, впервые обнаруженный в 2019 году в ассоциированном с насекомыми штамме-стрептомиците [147]. Изначально сообщалась только планарная структура этого соединения, однако позже цифомицин, наряду с родственными соединениями – GT-35 и каниферолидом С (Рис. 28), был выделен из другого штамма, ассоциированного с муравьями-листорезами [148]. Сравнение спектральных данных выделенных соединений и биоинформатический анализ генного кластера позволил установить стереоконфигурацию цифомицина.

### **1.3.4 Биологическая активность нафтохиноновых полиольных макролидов**

Аксеномицины А-D изначально позиционировались в качестве противопаразитарных препаратов. Испытания *in vivo* на мышах, зараженных ленточными червями *Hymenolipsis nana*, показали, что наибольшую активность в этом ряду имеет аксеномицин D [190]. При этом определенная *in vitro* антигельминтная (*Rhabditis macrocerca*, *H. nana*, *Schistosoma mausoni*) и антипротозойная (*Entamoeba histolytica*, *Tritrichomonas foetus*) активность аксеномицинов А, В, D отличалась несущественно и составляла 0.1–3 мкг/мл [191]. Антипаразитарная эффективность препарата была также показана на собаках, инфицированных *Taenia pisiformis*, *Dipylidium canium*, *Diphyllobothrium sp.* и на ягнятах, зараженных *Moniezia expansa*, *M. benedeni* и *Avitellina centripunctata*. Подавление паразитов в пределах 90-100% достигалось дозами аксеномицина D 5–10 мг/кг. Доза антибиотического комплекса в 20 мг/кг обеспечивало 60-100% эффективность лечения. Токсичность аксеномицина D, определенная на мышах, составила 100 мг/кг при пероральном введении и 1 мг/кг при внутривентральном введении [190]. Также для аксеномицинов была показана активность против некоторых дрожжей (МИК 0.04–0.3 мкг/мл для *Saccharomyces cerevisiae*, 0.78–6.25 мкг/мл для *Candida albicans*) [191,192].

Биологические свойства следующего представителя этого семейства, GT50, были изучены куда менее подробно. Тем не менее, для этого соединения, наряду со слабой антифунгальной активностью (МИК 10.4 мкг/мл в отношении дрожжей *Candida albicans*) был показан новый тип активности – антипролиферативная ( $IC_{50} = 2 \mu M$ ) [141]. В дальнейшем активность в отношении опухолевых клеток занимала центральное место в изучении антибиотиков этого класса. Следующий представитель этой структурной семьи, содержащий 32-членный макролид, ланголид проявил выраженную антипролиферативную активность ( $IC_{50} = 0.49–2.41 \mu M$ ) и умеренную фунгистатическую

активность против дрожжей рода *Candida* (МИК = 1.0–1.2  $\mu\text{M}$ ). Также было показано, что ланголид ингибирует рекомбинантную человеческую фосфодиэстеразу 4 типа ( $\text{IC}_{50}$  = 0.48  $\mu\text{M}$ ) [143]. Для ближайшего структурного аналога ланголида антибиотика А 77951, наряду с антифунгальной активностью, описаны иммуносупрессорные свойства [142].

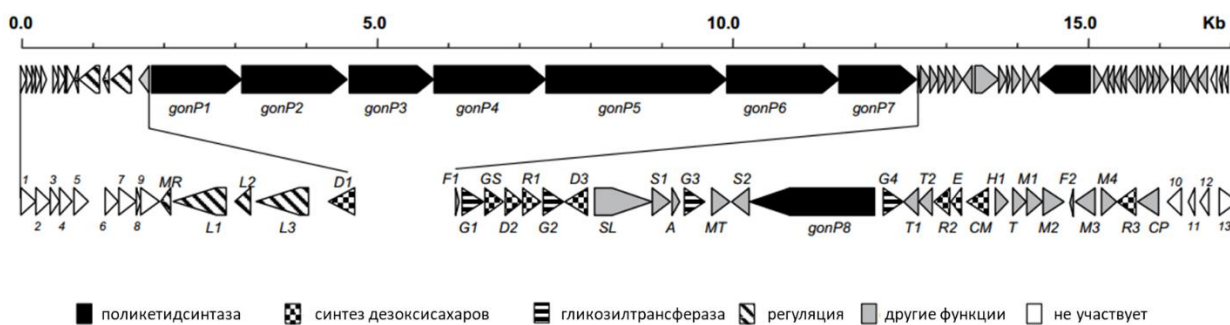
Недавно обнаруженные природные соединения РМ100117, РМ100118 показали высокую цитотоксическую активность в отношении нескольких линий опухолевых клеток ( $\text{LC}_{50}$  на уровне 1.3–4.1  $\mu\text{M}$ ) [144]. Деплелиды А,В подавляют синтез АТФ ( $\text{IC}_{50}$  = 33–70 нМ) [145]. Антипролиферативная активность деплелидов находится в интервале 0.047–0.6  $\mu\text{M}$ , спектр линий опухолевых клеток, восприимчивых к этим веществам, очень широк. При этом антифунгальная активность (ингибирующее действие по отношению к некоторым дрожжам рода *Candida*) не является столь выраженной (МИК = 5–10  $\mu\text{M}$ ). Для аналогов этих соединений изеолидов А-С дополнительно показана эффективность против фитопатогенного микромицета *Glomerella cingulata* [149]. Каниферолиды А–D также проявляют заметную антифунгальную активность на уровне 0.5–2 мкг/мл против дрожжей и 2–8 мкг/мл против грибов, а также высокую цитотоксичность по отношению к различным линиям опухолевых клеток (0.18–6.2  $\mu\text{M}$ ) [146]. Кроме того, каниферолид А оказался перспективным для лечения болезни Альцгеймера в *in vitro* модели [195].

Подводя итог, нафтохиноновые полиольные макролиды представляют собой распространенный тип вторичных метаболитов стрептомицетов. Сложность структурной организации данных антибиотиков долгое время была препятствием для их более детального изучения. Только в последние годы достигнут существенный прогресс в выделении, идентификации и установлении строения этих соединений. Широкий спектр биологической активности – антипролиферативная, антифунгальная, противопаразитарная, иммуносупрессорная – позволяет рассматривать нафтохиноновые полиольные макролиды как перспективную основу для разработки соответствующих лекарственных средств. На сегодняшний день недостаточная структурная характеристика и высокая цитотоксичность этих соединений привела к отсутствию представителей этого структурного семейства среди клинически применяемых веществ.

### **1.3.5. Биосинтез нафтохиноновых полиольных макролидов**

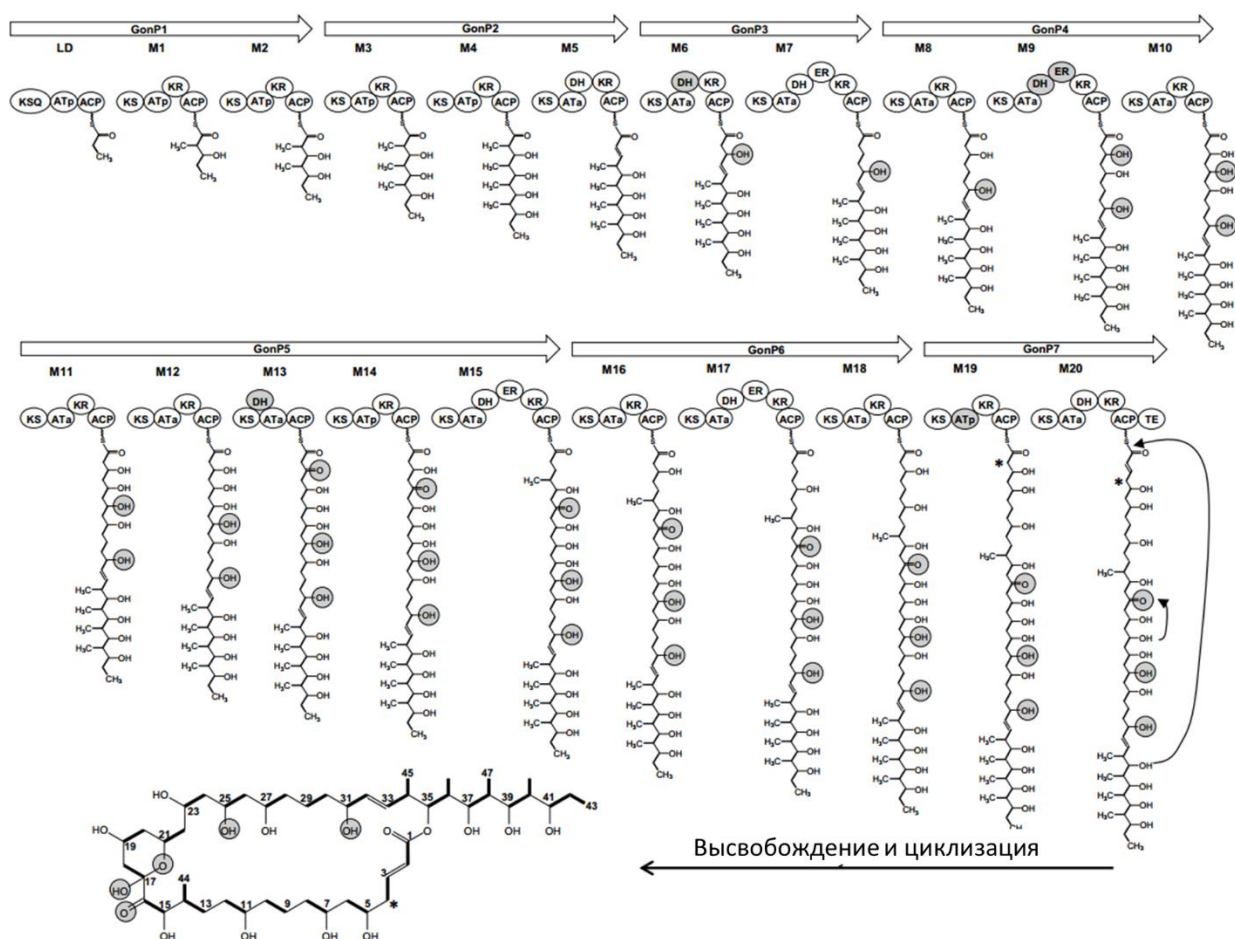
Биосинтез нафтохиноновых полиольных макролидов был впервые охарактеризован для соединений РМ100117/8 [193]. Полногеномное секвенирование штамма-продуцента *Streptomyces caniferus* GUA-06-05-006А выявило крупный биосинтетический

генный кластер (BGC, biosynthetic gene cluster), содержащий 54 открытых рамки считывания (ORFs, open reading frames), в том числе крупную поликетидсинтазу I типа (PKS, polyketide synthase), состоящую из 7 протеинов (GonP1–GonP7, Рис. 29). Ассоциация этого кластера с биосинтезом PM100117/8 была подтверждена путем получения мутантного штамма с инактивированным геном *gonP1*. Такой мутантный штамм оказался неспособен к биосинтезу PM100117/8.



**Рис. 29.** Организация биосинтетического генного кластера PM100117/8, *gonBGC* [193]

Доменная архитектура *gon* BGC, включающая стартовый домен и 20 элонгирующих доменов, в целом соответствует химической структуре выделенных поликетидов, однако содержит ряд особенностей (Рис. 30). Большая часть ацилтрансферазных доменов по своей предсказанной субстратной специфичности совпадает с реальным биосинтетическим результатом. Однако для АТ домена модуля M19 однозначно предсказывается метилмалонатная специфичность, так как он содержит характерный YASH-мотив. Тем не менее, среди продуктов биосинтеза не наблюдается соединений, содержащих метильную группу в соответствующем положении (C4, отмечено звездочкой на Рис. 30)



**Рис. 30.** Предполагаемый путь биосинтеза PM100117/8 [193]. Домены поликетидсинтазы обозначены следующими сокращениями: KS кетосинтазный домен, AT – ацилтрансферазный домен, KR – кеторедуктазный домен, DH – дегидратазный домен, ER – еноилредуктазный домен, ACP – ацилпереносящий белок. Серые круги отражают области структуры поликетиды, расходящиеся с предсказанной каталитической активностью ферментов.

Из других особенностей *gon* BGC можно отметить наличие нескольких предположительно неактивных или пропускаемых доменов (например, DH домен в модуле M6, DH домен в модуле M13, DH и ER домены в модуле M9). Кроме того, на основании гомологии с известными природными нафтохинонами была предложена схема биосинтеза нафтохиноновой части макролида. Нокдаун соответствующих генов позволил выделить из мутантов штамма-продуцента соединения, не содержащие нафтохинонового фрагмента, некоторые из которых превосходили по активности исходное соединение [193]. Аналогичный подход был применен для получения и других аналогов PM100117/8 [194], в том числе производных, не включающих одного или нескольких дезоксисахаров. В целом исследования аналогов PM100117/8 говорят о существенном влиянии структурных изменений на их биологические свойства, что делает их перспективными кандидатами для дальнейших модификаций. Кроме того, методы молекулярной биологии и биоин-



форматики могут внести существенный вклад в расширение химического пространства соединений этого типа.

Недавно был описан биосинтез еще одного представителя семейства нафтохиноновых полиольных макролидов – каниферолидов A–D [146]. Эти поликетиды также синтезируются поликетидсинтазой I типа, доменная архитектура которой во многом напоминает таковую для PM100117/8. Из особенностей следует отметить, что для одного из модулей *sca* BGC предполагается механизм «заикания» модуля для получения корректного биосинтетического результата. Кроме того, *in silico* анализ типов кеторедуктазных (KR) доменов позволил подтвердить данные об абсолютной конфигурации стереоцентров каниферолидов. Выводы о стереохимических особенностях были распространены и на остальные семейства нафтохиноновых полиольных макролидов [146]. Аналогичный анализ позволили подтвердить также и стереоконфигурацию описанного последним представителем структурного семейства – цифомицина [148].

Подводя итог, антибиотики, относящиеся к структурным классам макроциклических пептидов и макролидов представляет существенный интерес, изучению их химических свойств, путей биосинтеза и биологической активности посвящено существенное количество публикаций. Продолжающиеся исследования в этой области говорят о высоком потенциале этих соединений в качестве источника новых природных, полусинтетических и синтетических соединений с ценными фармакологическими свойствами.

## Глава 2. Результаты и обсуждение

В рамках данной работы установлена структура ряда природных соединений микробного происхождения с антибиотической активностью. С химической точки зрения изученные соединения принадлежали к классам циклических пептидов и 20- и 36-членных макролидов. Обсуждение результатов разделено на четыре раздела, посвященных четырем различным объектам разной степени новизны. В первом разделе описано установление структуры соединения, известного ранее как кристалломицин, оказавшегося идентичным известному антибиотику аспартоцину. Второй раздел посвящен выделению и характеристике нафтохиноновых полиолильных макролидов, обладающих выраженной антифунгальной активностью. Два последних раздела обсуждения результатов описывают вторичные метаболиты одного стрептомицета. Третий раздел посвящен антифунгальным макролидам семейства ирумацина, для которых был выделен новый изомер, не обладающий антифунгальной активностью. Наибольшую новизну представляет антибиотик, описанный в четвертом разделе работы. Этот липогликопептид, названный гауземицином, обладает крайне необычной структурой и механизмом действия, позволяющими отнести его к новому классу пептидных антибиотиков. Последние два раздела включают также данные полногеномного секвенирования штамма-продуцента и *in silico* анализ их биосинтетических генных кластеров с экспериментальным подтверждением ключевых этапов биосинтеза.

### 2.1 Установление структуры липопептидного антибиотика кристалломицина

Кристалломицин был описан в 1957 году и назван так из-за способности кристаллизоваться из этанола [13]. Два года спустя было опубликовано химическое исследование антибиотика [196], в результате которого было сделано заключение, что кристалломицин очень близок, если не идентичен амфомицину, выделенному несколькими годами ранее [14]. Тем не менее, прямое микробиологическое сравнение кристалломицина и амфомицина показало одинаковый спектр активности, но неполную кросс-резистентность, что позволяло предположить, что антибиотики не идентичны [197]. В дальнейшем химических работ по изучению кристалломицина не публиковалось. На сегодняшний день интерес к антибиотикам структурного семейства амфомицина возрождается в связи с тем, что их рассматривают перспективными материалами для разработки полусинтетических препаратов против мультирезистентных грамположительных патогенов. [17,79,80,198,199]

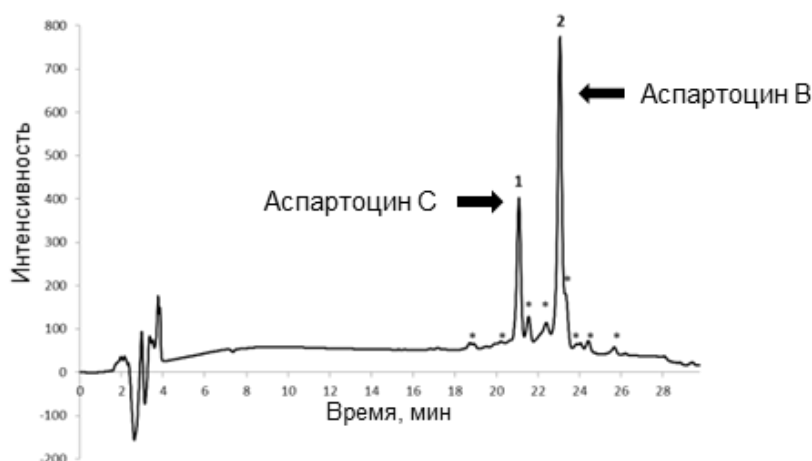
### 2.1.1. Установление структуры кристалломицина

В коллекции антибиотиков Института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе была обнаружена запаянная ампула, содержащая образец кристалломицина, выделенного более 60 лет назад. Образец, хранившийся при температуре 0–5°C, представлял собой рассыпчатый желтоватый порошок (Рис. 31).



**Рис. 31.** Фотография ампулы, ее подписи («Кристалломицин 0,4 г 7/І-57») и содержимого.

ВЭЖХ-анализ обнаруженного образца показал смесь двух основных и нескольких минорных компонентов (Рис. 32). Оба основных компонента были выделены с помощью полупрепаративной ВЭЖХ; было получено 5.6 мг антибиотика **1** и 17.3 мг антибиотика **2** (также называемые Cryst-1 и Cryst-2 в ЯМР-экспериментах). Данные масс-спектрометрии высокого разрешения (ESI-HRMS) показали следующие значения  $m/z$  (Приложение 4, Приложение 5): 1304.6731 [**1** + H]<sup>+</sup>; 1326.6550 [**1** + Na]<sup>+</sup>; 1348.6373 [**1** – H + 2Na]<sup>+</sup>; 1318.6894 [**2** + H]<sup>+</sup>; 1340.6703 [**2** + Na]<sup>+</sup>.



**Рис. 32.** ВЭЖХ профиль образца кристалломицина. Колонка Waters Sunfire C18 5 мкм, 4.6×250 мм; поток 1 мл/мин; элюент ацетонитрил (с 0.1% ТФУ) – вода (с 0.1% ТФУ) 30→60% за 25 мин, 60→75% за 1 мин, 75% в течение 4 мин, детекция по поглощению при 210 нм.

Масса соединения **1** совпала с массой аспартоцина С, а масса соединения **2** – с аспартоцинами А и В (отклонение не превышает 1 ppm). Аспартоцины относятся к классу анионных липопептидов структурного семейства амфомицина [200]. Затем кристалломицины исследовали с помощью различных методов 1D и 2D ЯМР-спектроскопии [201]. Отнесение спектра <sup>1</sup>H спектров осуществлялось с помощью стандартного подхода, основанного на комбинации двумерных спектров TOCSY и NOESY [202]. Исследование показало идентичность соединения **1** аспартоцину С (А-1437 В/сушимицин А), а компонента **2** – аспартоцину В (А-1437 G/сушимицин В) (Рис. 33). Более подробное описание ЯМР-спектроскопии находится в разделе 2.1.3.

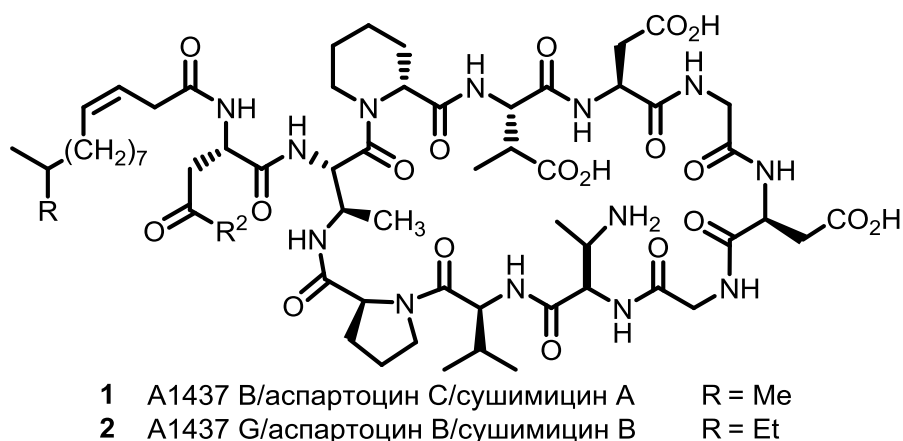


Рис. 33. Структуры компонентов антибиотика-кристалломицина.

### 2.1.2. Штамм-продуцент и спектр активности кристалломицина.

Штамм-продуцент кристалломицина 00887 был выделен в 1955 году. Штамм хранится в коллекции Института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе (под названием *Actinomyces violaceoniger* INA 00887). Секвенирование последовательности, кодирующей 16S рРНК показало, что штамм-продуцент принадлежит к роду *Streptomyces* и виду *S. griseorubens*. Последовательность нуклеотидов, кодирующих 16S рРНК штамма *Streptomyces griseorubens* была депонирована в базе данных NCBI под номером GenBank MG200163 и был проведен филогенетический анализ (Рис. 34).<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Культивирование и анализ штамма-продуцента кристалломицина проводилось в сотрудничестве с к.б.н. Маланичевой И.А. (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе)



**Рис. 34.** Филогенетическое дерево штамма INA 00887 на основе последовательности гена 16S РНК. Масштаб – 5 нуклеотидных замен на 10000 нуклеотидов. Цифры – достоверность ветвления по “bootstrap”- анализу 100 альтернативных деревьев.

ВЭЖХ-МС<sup>2</sup> анализ экстракта из культуральной жидкости штамма-продуцента показал наличие двух пиков, полностью идентичных соединениям **1** и **2** из изученного образца (Рис. 35).

<sup>2</sup> Спектры HRMS регистрировались к.х.н. Сольевым П.Н. (ИМБ РАН)

**Analysis Info**

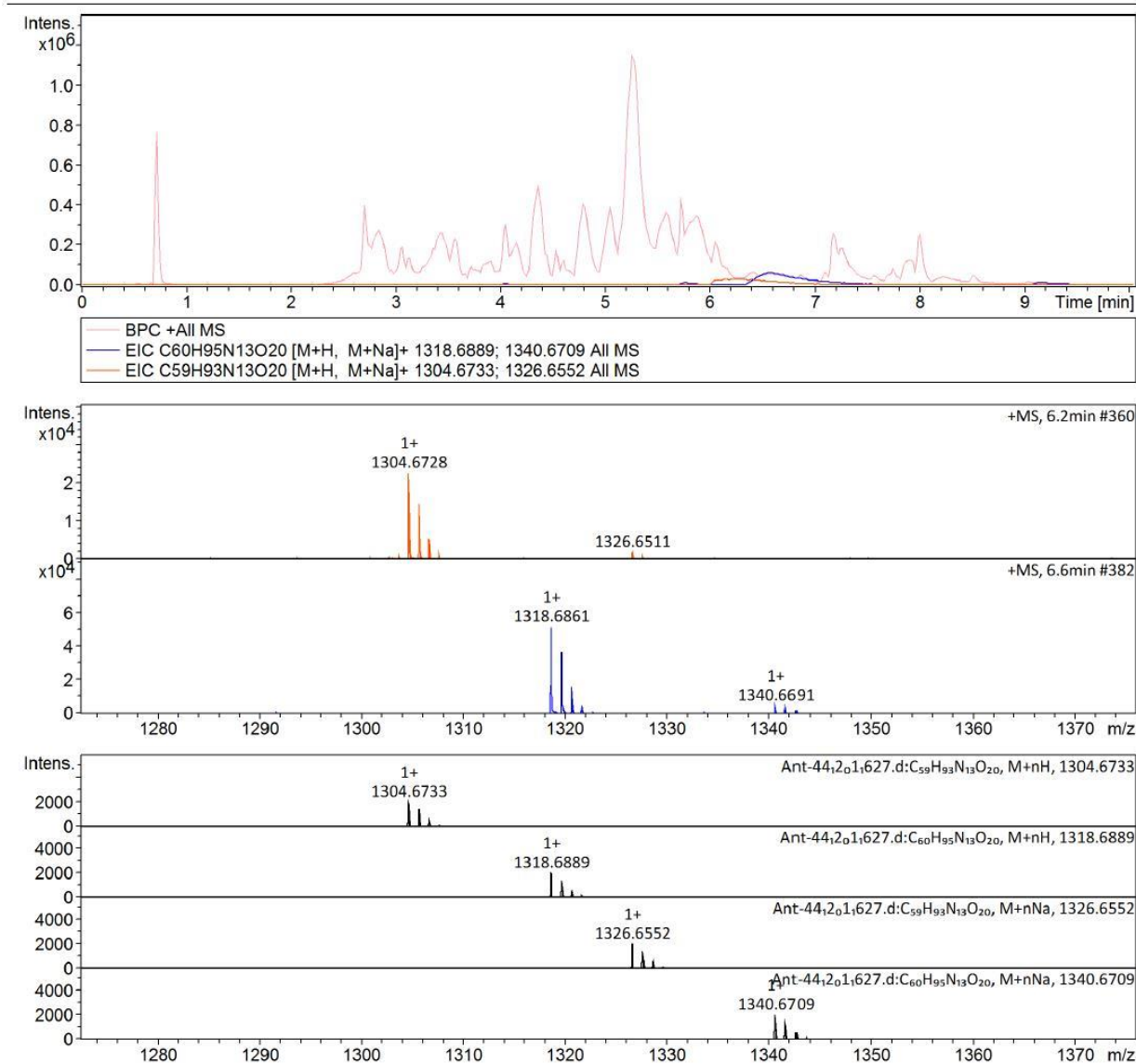
Analysis Name D:\Data\Ant-44\_12\_01\_1627.d  
Method la\_2.2.m  
Sample Name Ant-44  
Comment

Acquisition Date 1/23/2018 1:08:23 PM

Operator BDAL@DE  
Instrument compact 8255754.20088

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	6.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



**Рис. 35.** ВЭЖХ-МС анализ экстракта штамма-продуцента *Streptomyces griseorubens* INA 00887.

Был изучен спектр активности компонентов антибиотика – кристалломицина.<sup>3</sup> 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 сильное повышение активности (2-8 кратное снижение МИК) в среде, содержащей ионы

<sup>3</sup> МИК измерялись к.б.н. Грамматиковой Н.Э. (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе)

кальция (1.25 мМ). Такое поведение характерно для кальций-зависимых липопептидных антибиотиков (Таблица 5).

Таблица 5. Зависимость МИК кристалломицинов/аспартоцинов **1** и **2** в отношении грамположительных бактерий от добавления 1.25 мкМ Ca<sup>2+</sup>

Микроорганизм	Антимикробная активность, мкг/мл				
	Даптомицин	<b>1</b> (Ca <sup>2+</sup> )	<b>1</b>	<b>2</b> (Ca <sup>2+</sup> )	<b>2</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.5	4	16	2	4–8
MRSA 86	1	4	16	2	8
MRSA 88	0.5–1	4	16	2	8
MRSA 71001	0.5–1	4	16	2	8
MRSA 20450	1	2	16	1–2	8
MRSA 17	2	4	-	4	8
<i>S. epidermidis</i> C2001 (MR)	1	4	16	2	4–8
<i>S. epidermidis</i> 004-T1(MR)	1	4	32	4	16
<i>S. epidermidis</i> 20459(MR)	1	4	-	4	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4	8	-	8	16
<i>E. gallinarum</i> VP4147	8	4–8	-	4–8	16

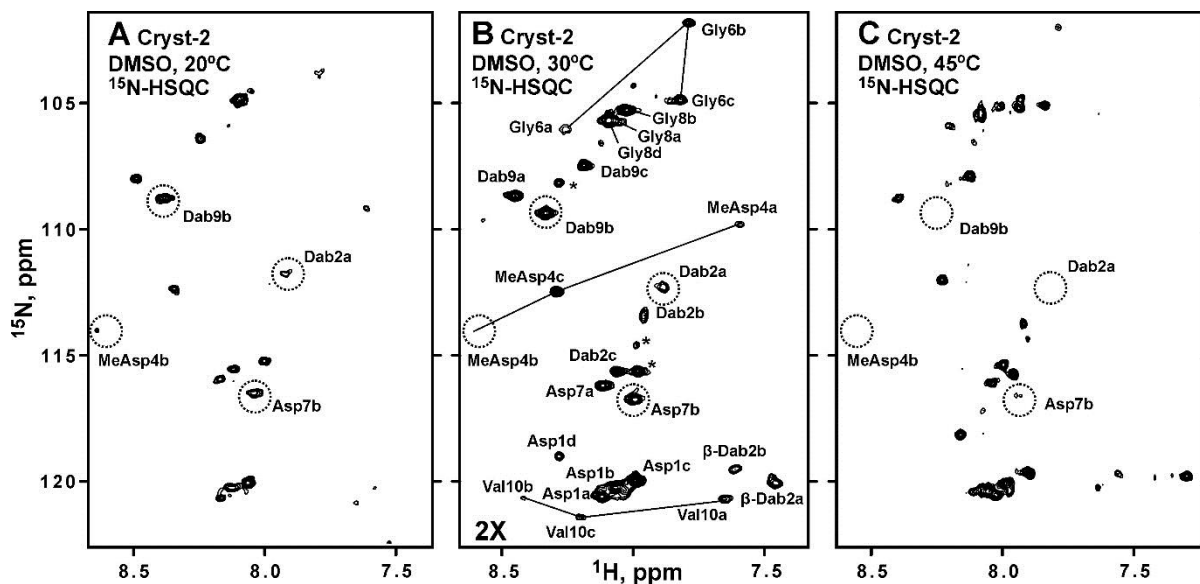
### 2.1.3. ЯМР-спектроскопия кристалломицинов, изучение конформаций липопептидных антибиотиков в растворе

Образцы основного компонента кристалломицина **2** (в описании ЯМР-экспериментов называются ‘Cryst-2’) изучались в DMSO-*d*<sub>6</sub>, CD<sub>3</sub>OD и смеси H<sub>2</sub>O + D<sub>2</sub>O.<sup>4</sup> Спектры <sup>15</sup>N-HSQC были зарегистрированы в DMSO-*d*<sub>6</sub> и показали сигналы NH-групп, указывающих на наличие в образце Cryst-2 полипептидной части. Тем не менее, наблюдаемые кросс-пики <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N имели различные интенсивности и их количество существенно превышало ожидаемое для пептида с массой около 1.3 кДа количество NH-групп (Рис. 36).

Спектры на рисунках А и С были измерены и обработаны с использованием идентичных параметров. Более длительное время измерения было использовано для спектра на рисунке В; и, следовательно, поэтому чувствительность для этого спектра выше. Полученное резонансное распределение NH-групп показано на рисунке В. Сигналы четырех различных конформационных состояний Cryst-2 отмечены строчными буквами (a, b, c, d). Кросс-пики NH MeAsp<sub>4</sub>, Gly<sub>6</sub> и Val<sub>10</sub> в конформерах a, b и c связаны линиями.

<sup>4</sup> Регистрация и интерпретация спектров ЯМР проводилась в сотрудничестве с д.ф.-м.н. Шенкаревым З.О. и к.ф.-м.н. Парамоновым А.С. (ИБХ РАН)

Кросс-пики, которые стали расширяться при 45°C, отмечены пунктирными кружками. Следует отметить, что не все ожидаемые кросс-пики HN для четырех структурных форм Cryst-2 были идентифицированы в спектрах, некоторые находятся под порогом чувствительности. Не отнесённые взаимодействия показаны звездочками, они могут принадлежать неидентифицированным атомам конформеров Cryst-2 или происходить из примесей в образце.



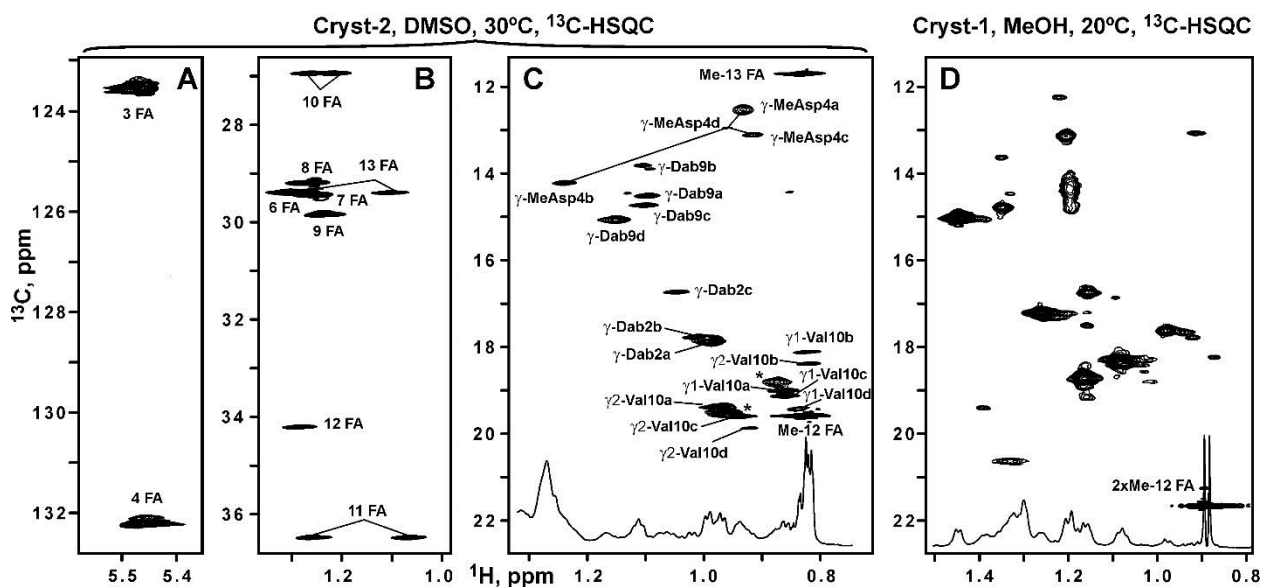
**Рис. 36.** 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC спектры Cryst-2 в DMSO- $d_6$  при 20°C (A), 30°C (B) и 45°C (C).

Сравнение спектров  $^{15}\text{N}$ -HSQC, измеренных при 20, 30 и 45°C, показало, что некоторые из этих сигналов значительно расширились (даже за предел обнаружения) при повышенной температуре (Рис. 36, пунктир). Наблюдаемое удвоение и уширение сигнала обусловлено конформационной неоднородностью молекулы Cryst-2 в растворе (см. ниже). Вероятно, соответствующие процессы конформационного равновесия происходят во временном промежутке миллисекунд, приближаясь к промежуточному режиму при 45°C, это вызывает уширение некоторых сигналов. Попытка перевести эти обменные процессы в быстрый режим путем увеличения температуры сбора данных ЯМР оказалась безуспешной из-за значительной деградации соединения Cryst-2 при 70°C. Таким образом, оптимальная температура для ЯМР-исследования Cryst-2 составила 30°C (Рис. 36).

Анализ 2D-спектров TOCSY, COSY,  $^{13}\text{C}$ -HSQC и 3D TOCSY- $^{13}\text{C}$ -HSQC выявил набор узких сигналов, соответствующих остатку жирной кислоты. Эта жирная кислота содержит 15 атомов углерода, 14 из которых связаны с атомами водорода (Рис. 37, Таблица б). Кросс-пик между 2- $\text{CH}_2$  группой жирной кислоты и HN-группой остатка Asp1, наблюдаемый в спектре NOESY, выявил связь между пептидной и липидной частями



Cryst-2, что указывает на то, что соединение является липопептидом. Разрешенный по мультиплетности  $^{13}\text{C}$ -HSQC спектр позволил различить сигналы групп  $\text{CH}$  и  $\text{CH}_2$ . Две группы  $\text{CH}$ , имеющие химические сдвиги, типичные для замещенных алкенов (5.47/123.5 и 5.46/132.2 м.д.,  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  соответственно), были отнесены к позициям 3 и 4 жирной кислоты (Рис. 37А, Таблица 6). Другая группа  $\text{CH}$  расположена в положении 12 жирной кислоты (Рис. 37В), где присоединена метильная группа (Me-12), в этом месте происходит разветвление жирной кислоты. Две метильные группы жирной кислоты (Me-12 и Me-13), имеющие химические сдвиги 0.83/11.7 и 0.82/19.6 м.д. ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  соответственно), дают характерные перекрывающиеся сигналы – квартет и триплет в спектре ПМП (Рис. 37С). Следовательно, фрагмент жирной кислоты в Cryst-2 содержит двойную связь и две метильные группы. Такая жирная кислота была ранее обнаружена в аспартоцине В [200]. Большинство групп жирной кислоты дает один набор сигналов ЯМР. Тем не менее, сигналы 2- $\text{CH}_2$ , 3- $\text{CH}_2$  и 4- $\text{CH}_2$  групп разбиваются на несколько частей (Рис. 37А). Следовательно, конформационная неоднородность молекулы Cryst-2 в растворе в DMSO происходит из равновесных процессов в пептидной части антибиотика.



**Рис. 37.** Фрагменты 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC спектров Cryst-2 (DMSO- $d_6$ , 30°C) и Cryst-1 ( $\text{CD}_3\text{OH}$ , 20°C). Получено резонансное назначение Cryst-2. Сигналы различных конформационных состояний Cryst-2 отмечены строчными буквами (a, b, c, d). (А, В) Назначение группы жирных кислот (FA) в Cryst-2. (С) Метильная область спектра Cryst-2, показывающая концевые сигналы FA и резонансы остатков mAsp4, Dab2, Dab9 и Val10. Кросс-пики mAsp4 в разных структурных формах связаны линиями. Неотнесенные резонансы показаны звездочками. (D) «Метильная» область спектра Cryst-1.

Для изучения строения пептидной части Cryst-2, спин-спиновые системы отдельных аминокислотных остатков были идентифицированы в спектрах 2D TOCSY и COSY. Последовательные связи были установлены с помощью  $\text{HN}_{i-1}\text{--HN}_i$ ,  $\text{HC}^{\alpha}_{i-1}\text{--HN}_i$  и/или

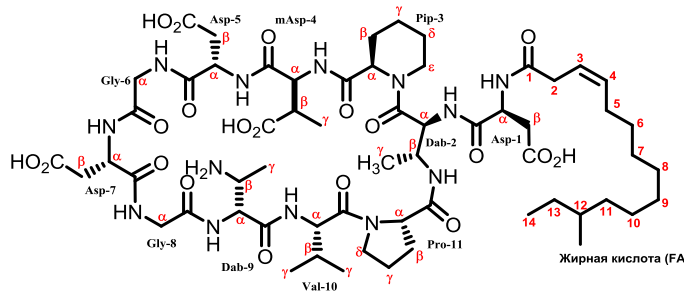
$\text{HC}^{\beta_{i-1}}-\text{HN}_i$  кросс-пиков в спектре NOESY. Наблюдаемое уширение и расщепление сигналов существенно усложнило анализ  $^{13}\text{C}$ -HMBC спектров. Из-за этого на основании химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  однозначно установить последовательность аминокислот не удалось. Полученные данные ЯМР показали, что пептидная часть Cryst-2 идентична пептидным ядрам аспартоцинов и представляет собой пептид, состоящий из 11 аминокислотных остатков и замыкающийся через  $\beta$ -аминогруппу 2,3-диаминобутановой кислоты (Dab2) [200]. Это позволило заключить, что основной компонент кристалломицина совпадает с известным липопептидом – аспартоцином В. Хорошее соответствие спектров  $^{13}\text{C}$ -HSQC соединения Cryst-2 и аспартоцина В в  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Приложение 1), а также совпадение точной массы по данным HRMS и, следовательно, брутто-формулы антибиотиков, подтверждают идентичность этих соединений.

Детальный анализ спектров ЯМР позволил идентифицировать как минимум четыре набора сигналов от большинства остатков в пептидной части Cryst-2 (Таблица 6).

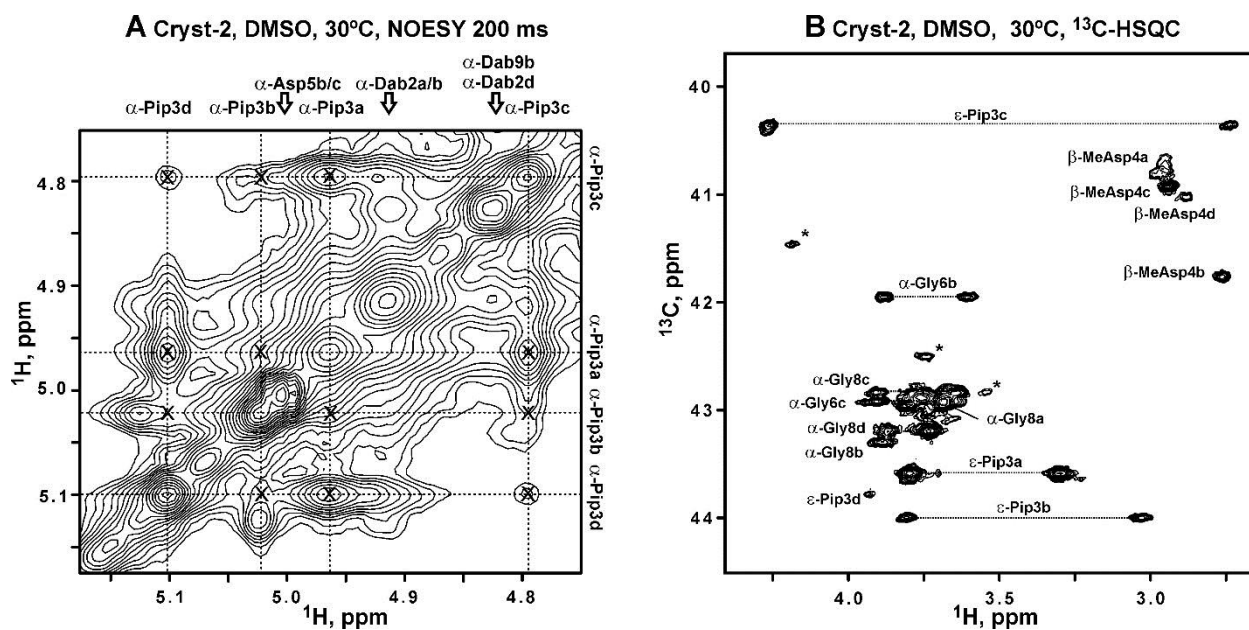
Таблица 6. Химсдвиги четырех различных конформеров липопептида Cryst-2 (2) в спектрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ , в растворе в DMSO при 30°C

		Конформеры Cryst-2							
		a		b		c		d	
		$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}(\delta_{\text{N}})$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}(\delta_{\text{N}})$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}(\delta_{\text{N}})$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}(\delta_{\text{N}})$
Asp1	$\text{H}^{\text{N}}$	8.12	120.6	8.07	120.2	7.99	120.0	8.28	119.0
	$\alpha$	4.63	50.0	4.68	50.0	4.62	49.8	4.66	50.2
	$\beta$	2.67/2.48	36.8	2.66/2.49	36.9	2.68/2.50	36.5	2.82/2.54	36.4
Dab2	$\text{H}^{\text{N}}$	7.89	112.3	7.95	113.4	8.06	115.6	8.22	–
	$\alpha$	4.91	53.0	4.92	52.9	4.66	52.4	4.82	53.4
	$\beta$	4.26	46.0	4.26	46.1	4.00	46.5	4.07	46.4
	$\gamma$	0.99	17.8	1.01	17.7	1.05	16.7	1.04	18.2
	$\beta\text{-H}^{\text{N}}$	7.34	–	7.61	119.5	7.46	120.0	7.47	–
Pip3	$\alpha$	4.96	53.6	5.02	53.1	4.79	56.7	5.10	52.8
	$\beta$	2.00/1.68	27.0	2.01/1.51	25.4	2.11/1.55	28.0	2.10/1.99	31.8
	$\gamma$	1.35/1.47	20.5	1.23/1.48	21.0	1.39	20.6	1.54/1.37	20.6
	$\delta$	1.55/1.58	24.6	1.53/1.66	24.7	1.20	24.7	1.60/1.48	24.8
	$\epsilon$	3.80/3.30	43.6	3.03/3.81	44.0	4.26/2.74	40.4	3.93	43.8
mAsp4	$\text{H}^{\text{N}}$	7.59	109.9	8.59	114.4	8.29	112.5	7.68	–
	$\alpha$	4.64	54.4	4.12	56.3	4.69	55.0	4.66	54.3
	$\beta$	2.95	40.8	2.76	41.8	2.94	40.9	2.89	41.0
	$\gamma$	0.93	12.5	1.24	14.2	0.92	13.1	0.97	12.9
Asp5	$\text{H}^{\text{N}}$	8.44	–	–	–	–	–	–	–
	$\alpha$	4.32	51.1	5.00	49.8	5.00	49.7	–	–
	$\beta$	2.74/2.58	35.5	3.18/2.67	33.3	2.59/3.10	34.0	–	–
Gly6	$\text{H}^{\text{N}}$	8.26	106.0	7.78	101.9	7.82	104.9	–	–
	$\alpha$	3.68/3.75	42.9	3.60/3.88	41.9	3.90/3.68	42.9	–	–
Asp7	$\text{H}^{\text{N}}$	8.12	116.2	7.98	116.7	–	–	–	–
	$\alpha$	4.46	50.3	4.66	–	–	–	–	–
	$\beta$	2.59/2.47	36.3	2.74/2.58	36.8	–	–	–	–
Gly8	$\text{H}^{\text{N}}$	8.02	105.2	8.03	105.7	–	–	8.09	105.7
	$\alpha$	3.80/3.68	42.9	3.88	43.3	3.90/3.64	42.8	3.73/3.87	43.2
Dab9	$\text{H}^{\text{N}}$	8.45	108.6	7.86	107.0	8.19	107.5	8.33	109.4
	$\alpha$	4.71	53.9	4.82	54.0	4.60	53.8	4.72	54.1
	$\beta$	3.61	48.1	3.66	49.5	3.57	48.3	3.58	48.2
	$\gamma$	1.10	14.5	1.11	13.8	1.10	14.7	1.16	15.0
Val10	$\text{H}^{\text{N}}$	7.65	120.7	8.41	120.5	8.21	121.4	8.14	120.3

	$\alpha$	4.25	56.9	4.38	55.7	4.25	56.9	4.41	56.3
	$\beta$	2.02	30.2	1.91	32.1	2.06	29.9	2.15	29.5
	$\gamma_1$	0.98	19.4	0.82	18.4	0.94	19.6	0.93	19.8
	$\gamma_2$	0.86	19.0	0.82	18.1	0.86	19.1	0.84	19.4
<b>Pro11</b>	$\alpha$	4.15	60.1	4.14	60.0	4.09	60.7	4.47	60.9
	$\beta$	1.70/2.08	30.0	1.70/2.08	29.9	1.79/2.05	29.9	2.09/1.99	32.1
	$\gamma$	1.92/1.82	25.1	1.90/1.81	25.1	1.96/1.80	25.0	1.89/1.70	21.8
	$\delta$	3.74/3.55	47.6	3.71/3.49	47.6	3.79/3.57	47.8	3.55/3.32	47.0
<b>FA</b>	1		170.1						
	2	2.93	34.4						
	3	5.47	123.5						
	4	5.46	132.2						
	5	1.99	27.4						
	6	1.30	29.4						
	7	1.26	29.4						
	8	1.25	29.2						
	9	1.24/1.22	29.8						
	10	1.26/1.21	26.9						
	11	1.25/1.07	36.5						
	12	1.29	34.2						
	13	1.10/1.28	29.4						
	14	0.83	11.7						
	Me-12	0.82	19.6						



Таким образом, можно предположить, что молекула антибиотика принимает как минимум четыре различные конформации в растворе. Эти формы были названы а, в, с и d и имеют относительную заселенность около 100:70:65:30 (Рис. 36В, Рис. 37С). Система внутриконформерных кросс-пиков, наблюдаемых в спектрах NOESY и ROESY (Рис. 38А, Приложение 2, Приложение 3), показывает, что эти структурные состояния молекулы Cryst-2 связаны конформационным равновесием. Используя интенсивности диагональных пиков и равновесных кросс-пиков, наблюдаемых для  $^1\text{H}^\alpha$  протона остатка Pip3 (Рис. 38А), удалось оценить характерное время протекающих процессов [201]. Равновесие между конформером а и конформерами в, с и d устанавливается быстрее (характерное время порядка 1.5 с), чем равновесия  $b \leftrightarrow c$  и  $b \leftrightarrow d$  (характерные времена  $\sim 3$  с). Самое медленное превращение наблюдалось для конформеров с и d (время около 8 с). Следовательно, соответствующие кросс-пики имели наименьшую амплитуду (Рис. 38А).



**Рис. 38.** Данные ЯМР, показывающие обменные процессы между четырьмя конформационными состояниями Cryst-2 в растворе DMSO- $d_6$  и *цис-транс*-изомерией пептидной связи Dab2-Pip3. (A) Фрагмент 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY спектра ( $t_m = 400$  мс). Показано распределение сигнала  $^1\text{H}^\alpha$  остатка Pip3 в конформерах a, b, c и d. Кросс-пики, возникающие при обмене (между конформерами), отмечены крестиками. (B) Фрагмент 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC спектра Cryst-2. Сигналы групп  $\text{CH}_2$  связаны пунктирными линиями. Показано распределение  $\text{HC}^\epsilon$ -резонансов остатка Pip3. Характерный сдвиг вверх поляризации резонанса  $^{13}\text{C}^\epsilon$  в конформере с подтвердил, что соответствующая пептидная связь Dab2-Pip3 находится в *цис*-конфигурации. Согласно данным химического сдвига, другие конформеры (a, b, d) Cryst-2 имеют связи *транс* Dab2-Pip3.

В связи с уширением и наложением сигналов, некоторые сигналы от Asp5-Asp7 фрагмента не были надежно идентифицированы в спектрах ЯМР. Например, сигнал от  $^1\text{H}^\text{N}$  в Asp5 наблюдается только для конформера a в спектрах  $^1\text{H}$  TOCSY и NOESY, но соответствующий кросс-пик не обнаружен в спектре  $^{15}\text{N}$ -HSQC. Тем не менее, удалось отнести сигналы  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  и  $^{13}\text{C}$  для четырех структурных форм фрагментов Asp1-mAsp4 и Gly8-Pro11 (Таблица 6). Связи между фрагментами были установлены с помощью NOE взаимодействий между  $\text{HN}^7$  в Dab2 и  $\text{HC}^{\alpha/\beta}$  в Pro11. Отнесение выявленных фрагментов к определенным структурным модификациям Cryst-2 также подкреплено относительной интенсивностью кросс-пиков спектра  $^{13}\text{C}$ -HSQC. В связи с существенным вкладом обменных процессов во время релаксации ядер в группах  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ , сравнение интенсивностей сигналов в  $^{15}\text{N}$ -HSQC спектрах оказалось менее надежным.

Наблюдаемые равновесные процессы могут включать *цис-транс* изомерию третичной амидной связи в пептидной части Cryst-2. Молекула содержит две таких связи – Dab2-Pip3 и Val10-Pro11. Конфигурация пептидных связей с пролином может быть определена либо с помощью характерных кросс-пиков NOE ( $\text{HC}^{\alpha}_{i-1}-\text{HC}^{\delta}_i$  для *транс*-

изомера и  $\text{HC}^{\alpha}_{i-1}-\text{HC}^{\alpha}_i$  для *цис*-изомера), либо на основании разницы химических сдвигов ядер  $^{13}\text{C}^{\beta}$  и  $^{13}\text{C}^{\gamma}$  в остатке Pro [203]. Соответствующие химические сдвиги наблюдаются в характерных областях около 30 и 25 м.д. (Таблица 6), соответственно, показали *транс*-конфигурацию связи Val10-Pro11 связи в a, b, c конформерах ( $\Delta\delta\text{C}^{\beta\gamma} \sim 5.1$  м.д.). С другой стороны, химические сдвиги  $^{13}\text{C}^{\beta}$  и  $^{13}\text{C}^{\gamma}$  конформера d (32.1 и 21.8 м.д. соответственно,  $\Delta\delta\text{C}^{\beta\gamma}$  составляет 10.3 м.д.), что соответствует только *цис*-конфигурации [203]. Наличие сильной NOE корреляции между  $\text{HC}^{\alpha}$  в остатке Val10 и  $\text{HC}^{\delta}$  в Pro11 подтвердило *транс*-конфигурацию связи Val10-Pro11 в конформерах a и c. Перегруженность этой области спектра не позволило применить данные NOE для анализа конфигурации конформеров b и d.

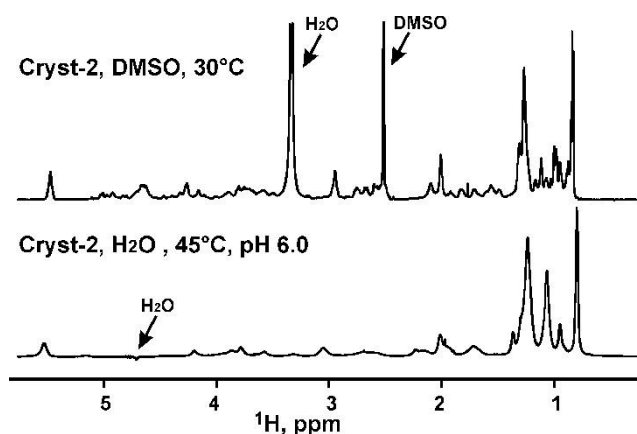
Тот же подход может быть применен для установления геометрии пептидной связи Xxx-Pip. Наблюдалось NOE взаимодействие между  $\text{HC}^{\alpha}$  в Dab2 и  $\text{HC}^{\alpha}$  в Pip3. Этот факт указывает на то, что только конформер c принимает *цис*-конфигурацию пептидной связи Dab2-Pip3. Сравнение химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  в остатке Pip3 кристалломицина Cryst-2 с величинами, опубликованными ранее для *цис*- и *транс*-изомеров пипеколиновой кислоты в продукте деградации рапамицина [204], также подтверждает эту гипотезу. Химсдвиги ядер  $^{13}\text{C}^{\alpha}$  и  $^{13}\text{C}^{\epsilon}$  в конформерах a, b, d наблюдались в области около 53 и 44 м.д. соответственно (что означает разницу в 9.4 м.д.), при этом эти атомы в конформере c дают сигналы при 56.7 и 40.4 м.д. (разница 16.3 м.д.). Эти величины хорошо соотносятся со сдвигами атомов  $^{13}\text{C}^{\alpha}$  и  $^{13}\text{C}^{\epsilon}$  в продукте раскрытия цикла рапамицина (50.7 и 43.8 м.д. для *транс*-изомера; 55.7 и 38.1 м.д. для *цис*-изомера) [204]. Интересно, что конформеры c и d, имеющие *цис*-конфигурации разных связей, соединены самым медленным из наблюдаемых обменных процессов.

Наличие конформационной неоднородности ранее было обнаружено в ЯМР-исследовании подобных липопептидов, проведенном в DMSO, метаноле и смесях ацетонитрил/вода, [38,200], но отнесение сигналов и структурная характеристика была проведена только для основных изомеров аспартоцина A и B. Полученные нами результаты согласуются с предыдущими данными о том, что *транс*-конфигурации связей Dab2-Pip3 и Val10-Pro11 являются основными для аспартоцина B.

Полученные результаты позволяют заключить, что два основных конформера Cryst-2 в растворе в DMSO (a и b) имеют одинаковые *транс*-конфигурации третичных амидных связей. Следовательно, различия в их структуре могут быть связаны с более сложными конформационными изменениями, например, флуктуациями общей конформации циклической части молекулы. Эти флуктуации должны быть достаточно медленными, чтобы давать два различных набора сигналов в спектрах ЯМР, следовательно,

конформеры а и b должны быть разделены относительно большим энергетическим/энтальпийным барьером, связанным с разрывом нескольких водородных связей или солевого мостика. Учитывая тот факт, что самые существенные различия химсдвигов коформеров а и b наблюдаются во фрагменте mAsp4-Val10 и в особенности в остатке mAsp4 (Рис. 36В, Рис. 37С, Таблица 6), можно предположить, что один из этих конформеров стабилизирован ионными взаимодействиями, включающими аминокгруппу Dab9 и кислотные группы других остатков (например, Asp1, Asp5 или Asp7).

Образец Cryst-2 также растворим в воде (+5% D<sub>2</sub>O). Получаемый таким образом раствор оптически прозрачен, но в спектре 1D <sup>1</sup>H ЯМР, зарегистрированном в интервале рН от 3 до 7, наблюдаются очень широкие сигналы (Рис. 39). Такое поведение подразумевает образование мицеллоподобных агрегатов молекулами Cryst-2 в водных растворах и согласуется с липопептидной структурой соединения [59].



**Рис. 39.** Сравнение спектров <sup>1</sup>H ЯМР образца Cryst-2 в DMSO и в воде (+5% D<sub>2</sub>O), отмечены положения остаточных сигналов растворителя, сильный сигнал воды подавлен с помощью WATERGATE.

Минорный компонент антибиотика, соединение **1** ('Cryst-1') было изучено с помощью ЯМР в CD<sub>3</sub>OH. 2D <sup>13</sup>C-HSQC спектре показал узкий интенсивный сигнал метильной группы при 0.89/21.7 м.д. ( $\delta_H/\delta_C$  соответственно, Рис. 37D). Этот сигнал соотносится с дублетом в спектре ПМР, следовательно, принадлежит к перекрывающимся сигналам метильных групп изопропильного фрагмента. Такая жирная кислота, оканчивающаяся изопропильной группой, описана для антибиотиков аспартоцинов А и С [200]. Учитывая результат масс-спектрометрии высокого разрешения (*m/z* 1304.6733), можно заключить, что Cryst-1 идентичен липопептидному антибиотику аспартоцину С. По сравнению с аспартоцином В (Cryst-2), этот антибиотик имеет идентичную пептидную часть, но другую жирную кислоту ( $\Delta^3$ -*iso*-14:1 вместо  $\Delta^3$ -*anteiso*-15:1). Жирная кислота аспартоцина С короче на одну метиленовую группу и имеет другое расположение боковой метильной группы. Наличие дополнительного набора слабых сигналов в <sup>13</sup>C-HSQC

спектре Cryst-1 (Рис. 37D) указывает на наличие конформационной неоднородности в растворе этого липопептида.

Наблюдаемая конформационная неоднородность существенно усложнила анализ спектров ЯМР образцов Cryst-1 и Cryst-2. Для дальнейших структурных исследований требуется тщательный контроль состава растворителей для поиска условий эксперимента, в которых обменные процессы подавлены или сильно замедлены.

Подводя итог, было обнаружено, что антибиотик кристалломицин, впервые описанный в 1957 году, идентичен соединениям амфомицинового семейства антибиотиков и содержит два основных компонента (идентичных аспартоцинам В и С), наряду с рядом минорных компонентов. Оба кристалломицина имеют выраженную кальций-зависимую активность против грамположительных бактерий, включая несколько штаммов, резистентных к метициллину.

## **2.2 Установление структуры новых нафтохиноновых макролидных антибиотиков астолидов А,В**

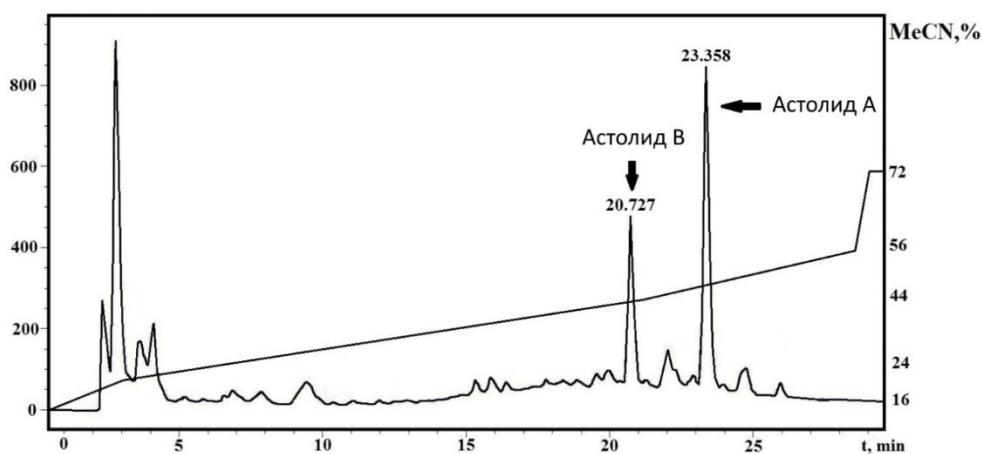
Из почвы в Саратовской области был выделен штамм, обладающий высокой антифунгальной активностью (против тест-микроорганизмов *Aspergillus niger* и *Candida albicans*). До начала этой работы вторичные метаболиты штамма-продуцента изучались в лаборатории под руководством проф. Г.С. Катрухи, была установлена подвижность активной фракции при тонкослойной хроматографии. В рамках данной работы из культуральной жидкости этого штамма были выделены в индивидуальном виде антибиотики, содержащие два фармакофорных фрагмента – нафтохиноновую кислоту и макролактонный цикл большого размера, названные астолидами А, В (3,4).

### **2.2.1. Выделение, очистка и разделение индивидуальных астолидов А,В**

Работа со штаммом продуцентом астолидов проводилась в НИИНА в течение ряда лет, предшествующих диссертации. Штамм продуцент по своим фенотипическим и генотипическим признакам был идентифицирован как *Streptomyces. hygroscopicus* и депонирован во Всероссийской коллекции промышленных Микроорганизмов (Москва, ВКПМ Ас2079). Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК депонирована в GenBank NCBI с присвоением индивидуального номера доступа – MG832042.1. Все работы по выделению и идентификации штамма продуцента проводились в лаборатории Таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов (руководитель профессор Л.П.Терехова) и в лаборатории Разработки методов поиска биологически активных соединений (руководитель д.б.н. А.С.Тренин).

Для структурной и биологической характеристики изучаемых антибиотиков требуется наработка индивидуальных соединений в значительных количествах. Для этого был разработан метод экстракции и очистки. Сырец антибиотика получали с помощью этиацетатной вытяжки из сухого бутанольного экстракта культуральной жидкости. Для дальнейшей очистки сырец антибиотика подвергали фракционированию методом оф-ВЭЖХ. Активность была обнаружена у фракций с временами удерживания 20.7 мин и 23.4 мин (Рис. 40). После лиофилизации собранных фракций получили соединения **3** и **4** в виде аморфных твердых соединений.





**Рис. 40.** Профиль ВЭЖХ астолидов А (3) и В (4). Колонка Waters XBridge 5 мкм, 4.6×250 мм; поток 0.9 мл/мин; элюент ацетонитрил–вода 16→24% за 2 мин, 24→44% за 20 мин, 44→56% за 8 мин, 56→72% за 1 мин и изократического элюирования при 72% в течение 5 мин, детекция по поглощению при 254 нм.

Метод экстракции и обогащения был затем оптимизирован для достижения более полного извлечения изучаемых антибиотиков. В доработанном методе экстракция культуральной жидкости была дополнена экстракцией биомассы с помощью метанола при ультразвуковой обработке. Для сокращения потерь активного вещества на стадии обогащения стадию высаживания этилацетатом заменяли флеш-хроматографией на обращеннофазовом сорбенте (сорбент Macherey-Nagel POLYGOPREP 100-50C<sub>18</sub>). Объединенные экстракты наносили «сухим» способом: сорбент (10–15% общего количества) добавляли небольшими порциями к метанольному раствору, при перемешивании, затем полученную взвесь высушивали в вакууме роторного испарителя и наносили остаток ровным слоем на верх хроматографической колонки. Элюировали смесью ацетонитрила с водой (по 200 мл, содержащих 30, 45 и 60% ацетонитрила). Активные вещества содержались только во фракции с 60% ацетонитрила. Данную фракцию упаривали в вакууме до удаления ацетонитрила (температура бани не выше 35°C), полученный водный раствор замораживали и лиофильно высушивали в вакууме. Для сокращения времени разделения, финальную очистку проводили на препаративной колонке Waters XBridge Prep C18 5 мкм OBD 19×150 мм, детекция по поглощению при 250 нм, элюент – 45% ацетонитрил в воде (изократическое элюирование), скорость потока – 6 мл/мин. Фракции, содержащие чистые астолиды А (3) и Б (4), собирали отдельно, упаривали в вакууме до удаления ацетонитрила (температура бани не выше 35°C), остаток замораживали и лиофильно высушивали.

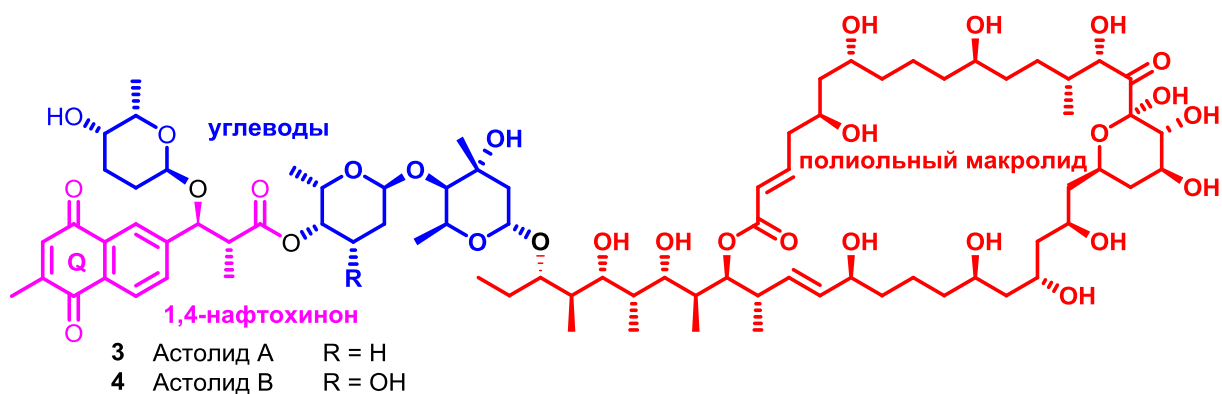
## 2.2.2. Установление структуры и относительной конфигурации астолидов А,В

Разработанный метод выделения, описанный в разделе 2.2.1, обеспечил более полное извлечение активных соединений из культуральной жидкости, а также обеспечил меньшую степень деградации астолидов, что позволило получить их в количествах, достаточных для физико-химической характеристики.

Данные масс-спектрометрии высокого разрешения позволили установить брутто-формулы соединения **3** ( $m/z$  1601.8584, расчет для  $C_{82}H_{13}O_{29}$   $[M+Na]^+$  1601.8590, 0.4 ppm) и соединения **4** ( $m/z$  1617.8533, расчет для  $C_{82}H_{13}O_{30}$ ,  $[M+Na]^+$  1617.8539, 0.4 ppm). Также были установлены физико-химические характеристики изучаемых соединений. Вещество **3** обладает следующими характеристиками:  $[\alpha]_D^{25}$  -49.7 (с 0.2, MeOH); УФ (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 205 (4.26), 254 (4.11), 337 (2.88) нм; ИК  $\nu_{max}$  3421, 2931, 1728, 1709, 1666, 1603  $cm^{-1}$ , а вещество **4**:  $[\alpha]_D^{25}$  -6.7 (с 0.2, MeOH); УФ (MeOH)  $\lambda_{max}$ , нм (log  $\epsilon$ ) 05 (4.26), 254 (4.11), 337 (2.88); ИК  $\nu_{max}$  3412, 2931, 1728, 1709, 1666, 1603  $cm^{-1}$ .

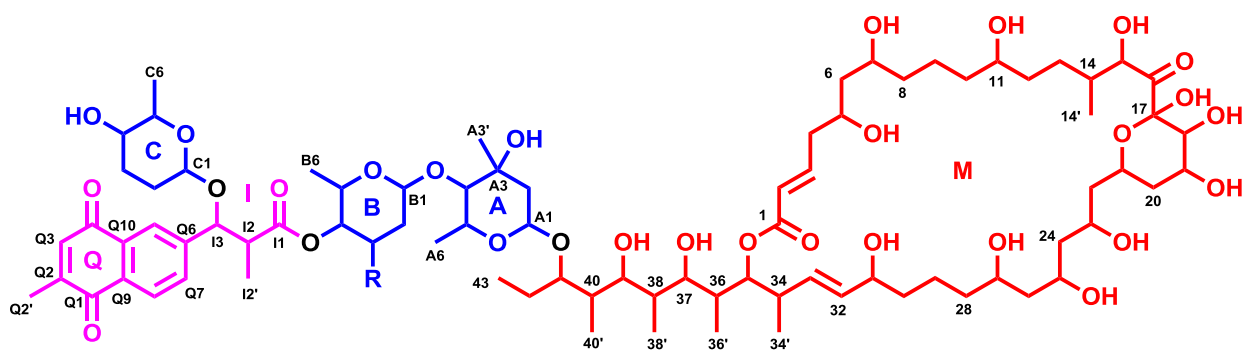
Структура соединений была установлена на основании данных ЯМР (Рис. 41).<sup>5</sup> Изучаемые антибиотики принадлежат к структурному семейству нафтохиноновых полиольных макролидов (представители этого класса рассмотрены в обзоре литературы). Несмотря на наличие близких аналогов в рамках структурного семейства, некоторые аспекты стереохимического строения таких соединений оставались неясными. Поскольку изучаемые антибиотики представляют собой аморфные соединения, получение данных рентгеноструктурного анализа не представляется возможным. Поэтому для установления пространственного строения этих веществ были применены различные методы 1D и 2D ЯМР, в том числе требующие накопления существенного количества вещества. Кроме того, сравнение стереохимических особенностей и биосинтетических кластеров сходных нафтохиноновых макролидов, включая обнаруженные немного позже каниферолиды А и В, позволило установить абсолютные конфигурации всех представителей семейства, в том числе и астолидов А,В [146].

<sup>5</sup> Спектры ЯМР регистрировались к.х.н. Новиковым Р.А. (ИМБ РАН).



**Рис. 41.** Структура астолидов А,В.

Детальный анализ данных ЯМР (Таблица 7), включая спектры  $^{13}\text{C}$ , DEPT и HSQC, выявил присутствие 12 четвертичных атомов углерода, 8 ароматических или олефиновых групп  $\text{CH}$ , 25 (**3**) или 26 (**4**) кислородсодержащих метинов, 6 алифатических метинов, 19 (**3**) или 18 (**4**) метиленов и 12 атомов углерода в метилах. Ароматические сигналы характерны для фрагмента нафтохинона, другие сигналы в слабом поле могут быть отнесены к двум двойным связям (123.36, 146.51; 135.06, 130.55 м.д.) и трем карбонилам (165.78, 207.92, 173.80 м.д.). Молекулярные формулы предполагают 18 степеней ненасыщенности; следовательно, алифатическая часть структуры должна содержать 5 кольцевых систем. Один из них представляет собой 36-членное макролидное кольцо, следующие три кольца представляют собой циклические формы сахаров, а последнее кольцо было отнесено как внутримолекулярный циклический семикеталь. Детальный анализ корреляций  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY и TOCSY вместе с корреляциями  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-COSY, HSQC-TOCSY и H2BC выявил ряд кажущихся изолированных спиновых систем: M2-M8, M9-M15, M18-M29; M30-M43, B1-B6, C1-C6, а также несколько небольших изолированных фрагментов сигналов A1-A2, A5-A6, I2'-I3 и нафтохинонов (Рис. 41). Связь между кажущимися изолированными спиновыми системами не может быть определена методами прямой корреляции (COSY, TOCSY), поэтому она выявляется методами дальних корреляций (NOESY, ROESY).



3 Астолид А: R = H

4 Астолид В: R = OH

Таблица 7. ЯМР-спектроскопические данные для астолидов А и В.

#	астолид А (3)			астолид В (4)			
	$\delta\text{H}$ (J, Hz)	$\delta\text{C}$ , тип	HMBC	$\delta\text{H}$ (J, Hz)	$\delta\text{C}$ , тип	HMBC	H2BC
M1		168.7, C			168.7, C		
M2	5.92, d (15.6)	124.7, CH	M1, M4	5.92, d (15.6)	124.7, CH	M1, M4	M3
M3	7.04, dt (15.4, 7.4)	148.1, CH	M1, M5	7.03, dt (15.6, 7.5)	148.1, CH	M1, M2, M4, M5,	M2, M4
M4	2.37, m; 2.46, m	41.3, CH <sub>2</sub>	M2, M3	2.36, m; 2.46, m	41.4, CH <sub>2</sub>	M2, M3, M5	M3, M5
M5	3.94, m	70.3, CH	M3	3.95, m	70.3, CH	M3, M7	M4, M6
M6	1.60, m	45.2, CH <sub>2</sub>	M5, M7	1.64, m	45.0, CH <sub>2</sub>	M4, M5, M6, M7	M5, M7
M7	3.79, m	71.2, CH		3.79, m	71.3, CH		M6, M8
M8	1.50, m	38.7, CH <sub>2</sub>		1.50, m	38.9, CH <sub>2</sub>		
M9	1.51, m	22.8, CH <sub>2</sub>		1.52, m	22.9, CH <sub>2</sub>		M10
M10	1.51, m	38.8, CH <sub>2</sub>		1.51, m	38.8, CH <sub>2</sub>		M9, M11
M11	3.54, m	72.8, CH		3.55, m	72.8, CH		M10, M12
M12	1.44, m; 1.60, m	36.4, CH <sub>2</sub>		1.44, m; 1.60, m	36.4, CH <sub>2</sub>		M13
M13	1.28, m; 1.65, m	31.6, CH <sub>2</sub>		1.29, m; 1.64, m	31.6, CH <sub>2</sub>		M12, M14
M14	2.22, m	36.8, CH		2.22, m	36.8, CH	M14'	M13, M14', M15
M14'	0.84, d (6.7)	14.0, CH <sub>3</sub>	M13, M14, M15	0.85, d (6.8)	14.0, CH <sub>3</sub>	M13, M14, M15	M14
M15	4.62, d (2.6)	75.7, CH	M16	4.63, m	75.7, CH		M14
M16		208.9, C			208.9, C		
M17		99.9, C			99.9, C		
M18	3.52, m	75.5, CH	M16, M17, M19	3.53, m	75.6, CH	M16, M19	M19
M19	3.89, m	69.8, CH		3.90, m	69.8, CH	M17	M18, M20
M20	1.43, m; 2.00, m	41.1, CH <sub>2</sub>	M19	1.44, m; 2.00, m	41.1, CH <sub>2</sub>	M19, M18	M19, M21
M21	4.24, m	67.7, CH		4.26, m	67.8, CH		M20, M22
M22	1.63, m	45.0, CH <sub>2</sub>		1.63, m	45.2, CH <sub>2</sub>		M21, M23
M23	4.02, m	65.9, CH		4.03, m	65.9, CH		M22, M24
M24	1.59, m	45.9, CH <sub>2</sub>		1.60, m	46.0, CH <sub>2</sub>	M23, M25	M23, M25
M25	4.05, m	68.7, CH		4.05, m	68.6, CH		M24, M26
M26	1.54, m	46.4, CH <sub>2</sub>		1.55, m	46.5, CH <sub>2</sub>		M25, M27
M27	3.76, m	71.6, CH		3.77, m	71.7, CH		M26, M28
M28	1.49, m	38.8, CH <sub>2</sub>		1.50, m	38.8, CH <sub>2</sub>		M29
M29	1.48, m	22.7, CH <sub>2</sub>		1.51, m	22.9, CH <sub>2</sub>	M27	M28

M30	1.42, m	38.7, CH <sub>2</sub>		1.42, m	38.7, CH <sub>2</sub>		M31
M31	3.96, m	72.6, CH		3.97, m	72.7, CH		M30, M32
M32	5.53, m	135.4, CH	M31	5.53, m	135.4, CH	M33, M34	M31, M33
M33	5.52, m	133.3, CH	M34	5.53, m	133.4, CH	M31, M32, M34, M34'	M32, M34
M34	2.54, m	40.6, CH		2.56, m	40.6, CH	M32, M33	M33, M34', M35
M34'	1.04, d (7.0)	17.5, CH <sub>3</sub>	M33, M34, M35	1.04, d (6.4)	17.5, CH <sub>3</sub>	M33, M34, M35	M34
M35	5.14, d (9.1)	77.6, CH	M1, M33, M36'	5.15, d (9.0)	77.6, CH	M1, M33, M34, M34', M36, M37, M36'	M34
M36	1.97, m	38.9, CH		1.97, m	39.1, CH		M37, M36'
M36'	0.91, d (6.2)	9.9, CH <sub>3</sub>	M35, M36, M37	0.91, d (6.4)	9.9, CH <sub>3</sub>	M35, M36, M37	M36
M37	3.40, m	78.7, CH		3.40, m	78.7, CH		M36
M38	1.83, m	36.2, CH		1.84, m	36.3, CH		M38'
M38'	0.91, d (6.2)	5.1, CH <sub>3</sub>	M38	0.92, d (6.4)	5.1, CH <sub>3</sub>	M38	M38
M39	3.53, m	79.6, CH		3.54, m	79.6, CH		M40
M40	2.02, m	38.8, CH		2.02, m	38.9, CH		M39, M40'
M40'	0.80, d (6.7)	10.8, CH <sub>3</sub>	M39, M40, M41	0.81, d (6.8)	10.8, CH <sub>3</sub>	M39, M40, M41	M40
M41	3.90, m	80.8, CH		3.89, m	81.0, CH	A1	M42
M42	1.41, m; 1.64, m	23.1, CH <sub>2</sub>	M43	1.43 m; 1.65 m	23.2, CH <sub>2</sub>	M43	M41, M43
M43	1.00, t (7.6)	11.6, CH <sub>3</sub>	M41, M42	1.01, t (7.3)	11.6, CH <sub>3</sub>	M41, M42	M42
A1	5.03, br.s.	96.6, CH	A3, A5	5.04, br. s	96.7, CH	M41, A3	A2
A2	1.63, m, 1.99, m	38.3, CH <sub>2</sub>		1.62 m; 1.99 m	38.2, CH <sub>2</sub>	A1, A3	A1
A3		71.4, C			71.2, C		
A3'	1.30, s	27.5, CH <sub>3</sub>	A2, A3, A4	1.29, s	27.5, CH <sub>3</sub>	A1, A2, A3, A4, A5	
A4	3.29, br. s	83.9, CH	A2, A3, A3', A5, B1	3.28, br. s	83.7, CH	A2, A3, A3', A5, B1	A5
A5	4.50, dq (6.6, 0.8)	65.3, CH		4.50, m	65.2, CH	A1, A3, A3', A4, A6	A6
A6	1.22, d (6.3)	17.8, CH <sub>3</sub>	A5	1.23, d (6.3)	17.7, CH <sub>3</sub>	A4, A5	A5
B1	4.97, br.s.	101.1, CH		5.01, br. s.	100.9, CH	A4, B2, B5, B4	B2, B3
B2	1.76, m; 1.94, m	25.3, CH <sub>2</sub>		1.96, m; 2.14, m	33.7, CH <sub>2</sub>	B1, B3, B4	B1, B3
B3	1.77, m; 2.17, m	24.1, CH <sub>2</sub>		3.87, m	66.8, CH		B2, B4
B4	4.93, m	71.4, CH		4.82, dd (5.0, 2.9)	75.5, CH	B2, B3, B5, I1	B3, B5
B5	4.27, dq (7.2, 0.5)	67.8, CH	B4, B6	4.49, m	64.6, CH	B1, B4, B6	B4, B6
B6	1.13, d (6.5)	17.6, CH <sub>3</sub>	B4, B5	1.17, d (6.60)	16.5, CH <sub>3</sub>	B4, B5	B5
I1		175.8, C			175.8, C		
I2	3.01, dq (7.2, 9.6)	48.5, CH	I1, I2', Q6	3.01, dq (7.2, 9.9)	48.5, CH	I1, I2', Q6	I2', I3
I2'	0.93, d (7.1)	14.6, CH <sub>3</sub>	I1, I2, I3	0.93, d (7.2)	14.7, CH <sub>3</sub>	I1, I2	I2
I3	4.82, d (9.6)	84.2, CH	I1, I2, I2', Q5, Q6, Q7, C1	4.81, m	84.2, CH	I1, I2, I2', Q5, Q6, Q7, C1	I2
Q1		186.4, C			186.4, C		
Q2		150.1, C			150.1, C		
Q2'	2.19, d (1.3)	16.4, CH <sub>3</sub>	Q1, Q2, Q3	2.20, d (1.5)	16.5, CH <sub>3</sub>	Q1, Q2, Q3	
Q3	6.91, d (1.6)	136.7, CH	Q1, Q2', Q9	6.92, d (1.5)	136.7, CH	Q1, Q2', Q9	
Q4		186.3, C			186.3, C		
Q5	8.06, d (1.3)	126.1, CH	I3, Q4, Q7, Q10	8.06, d (1.5)	126.1, CH	Q4, Q7, Q10	
Q6		148.8, C			148.8, C	I3	

Q7	7.86, dd (8.1, 1.3)	134.1, CH	I3, Q5, Q10	7.86, dd (8.1, 1.5)	134.1, CH	I3, Q5	Q8
Q8	8.11, d (8.0)	127.8, CH	Q1, Q6, Q9	8.11, d (8.1)	127.8, CH	Q1, Q6, Q9	Q7
Q9		133.2, C			133.2, C		
Q10		133.7, C			133.7, C		
C1	4.99, d (2.4)	101.3, CH	I3, C5	5.00, br. s.	101.4, CH	I3, C5, C3	C2
C2	1.47, m; 1.95, m	24.6, CH <sub>2</sub>		1.48, m; 1.95, m	24.6, CH <sub>2</sub>	C3	C1, C3
C3	1.62, m; 1.94, m	26.8, CH <sub>2</sub>		1.63, m; 1.95, m	26.8, CH <sub>2</sub>	C1	C2, C4
C4	3.34, br.s.	67.7, CH		3.34, br. s.	67.7, CH		C3, C5
C5	3.20, dq (6.5, 0.8)	68.4, CH	C4, C6	3.19, dq (6.6, 0.9)	68.5, CH	C4, C6, C1	C4, C6
C6	0.49, d (6.5)	16.8, CH <sub>3</sub>	C4, C5	0.49, d (6.6)	16.8, CH <sub>3</sub>	C4, C5	C5

Дальние корреляции  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  НМВС наблюдались от  $\text{H}_{\text{M18}}$  ( $\delta\text{H}$  3.36) до карбонила  $\text{C}_{\text{M16}}$  ( $\delta\text{C}$  207.92) и от  $\text{H}_{\text{M19}}$  ( $\delta\text{H}$  3.66) до четвертичного полуацетального атома углерода  $\text{C}_{\text{M17}}$  ( $\delta\text{C}$  98.81). Кроме того, корреляции от  $\text{H}_{\text{M2}}$  ( $\delta\text{H}$  5.81),  $\text{H}_{\text{M3}}$  ( $\delta\text{H}$  6.87) до карбоксильного атома углерода  $\text{C}_{\text{M1}}$  ( $\delta\text{C}$  165.78), а также дальние корреляции от  $\text{H}_{\text{M35}}$  ( $\delta\text{H}$  5.10) на  $\text{C}_{\text{M1}}$  ( $\delta\text{C}$  165.78) указывают на то, что алифатическая цепь М1–М43 включает 36-членный макролид. Использование 2D спектров HSQC–COSY, HSQC–TOCSY и H2BC в комбинации друг с другом позволяет косвенно наблюдать некоторые ОН-группы в макролидном кольце.

Рассмотрение данных НМВС позволяет установить структуру лактона с внутренним полукетальным кольцом и местами присоединения моносахаридных фрагментов. Анализ спектра НМВС  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  выявляет дальнедействующие корреляции  $\text{H}_{\text{B1}}\text{--}\text{C}_{\text{B5}}$ ,  $\text{H}_{\text{B5}}\text{--}\text{C}_{\text{B1}}$  в В1–В6 и аналогичные корреляции в спиновой системе С1–С6, поэтому эти фрагменты можно отнести к циклическим формам 2,3,6-тридезоксигексозы В и С.

Установлено, что углевод С является  $\alpha$ -родинозой. Корреляции ROE между  $\text{H}_{\text{C1}}$  и  $\text{H}'_{\text{C2}}$  и между  $\text{H}_{\text{C1}}$  и  $\text{H}'_{\text{C2}}$ , наряду с небольшой константой связи ( $J_{\text{H1--H2}} = 2.43$  Гц), позволяют предположить экваториальное положение  $\text{H}_{\text{C1}}$  и, следовательно,  $\alpha$ -гликозидную связь. Корреляция ROE между  $\text{H}_{\text{C5}}$  и  $\text{H}_{\text{C3}}$  свидетельствует об аксиальном положении  $\text{H}_{\text{C5}}$ . Небольшие вицинальные константы протонной связи  $\text{H}_{\text{C5}}$  и  $\text{H}_{\text{C4}}$  ( $J_{\text{H4--H5}} = 0.8$  Гц), а также корреляции ROE между  $\text{H}_{\text{C4}}$  и обоими протонами  $\text{H}_{\text{C3}}$  подтверждают экваториальное положение  $\text{H}_{\text{C3}}$  (Рис. 42). Большая константа связи между  $\text{H}_{\text{I2}}$  и  $\text{H}_{\text{I3}}$  в остатке изомасляной кислоты наряду с корреляцией ROE между  $\text{H}_{\text{I3}}$  и  $\text{C}_{\text{H3}}$ , но с  $\text{H}_{\text{I2}}$  позволяет предположить *эритро*-конфигурацию этого фрагмента. Малые константы связи ( $J \sim 2$  Гц) для аномерных протонов в сахарах А и В указывают на экваториальное положение этих протонов и, следовательно,  $\alpha$ -гликозидных связей. 2D ЯМР-корреляции (Рис. 42) и значительное сходство химических сдвигов и констант связи со значениями, указанными для выше-

упомянутых соединений PM100117 и PM100118, позволили идентифицировать сахар А как  $\alpha$ -аксенозу и сахар В как  $\alpha$ -родинозу и 2-дезоксид- $\alpha$ -фруктозу.

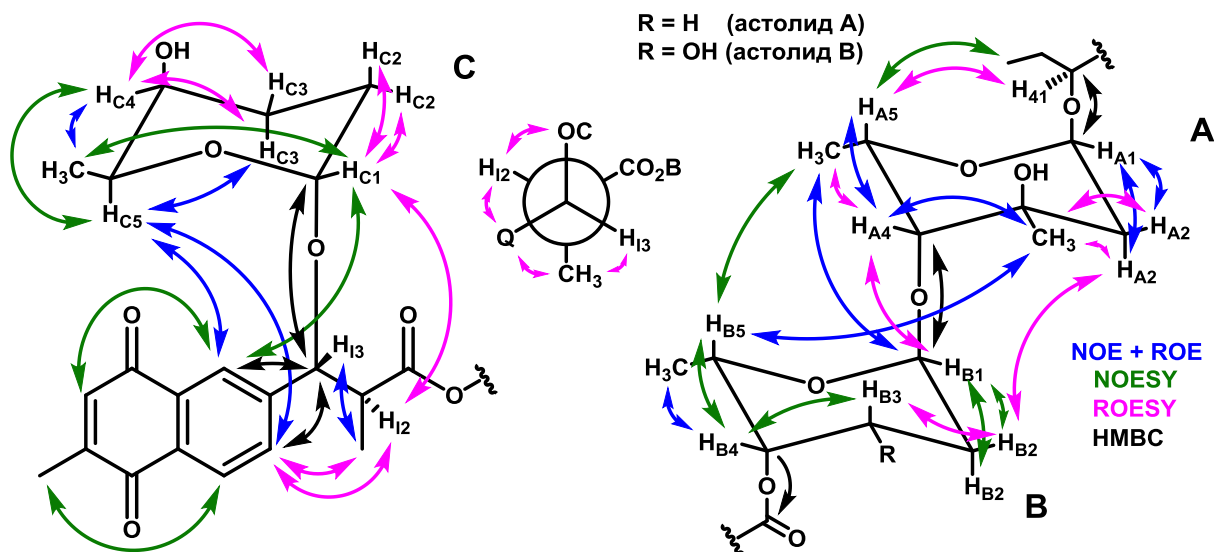
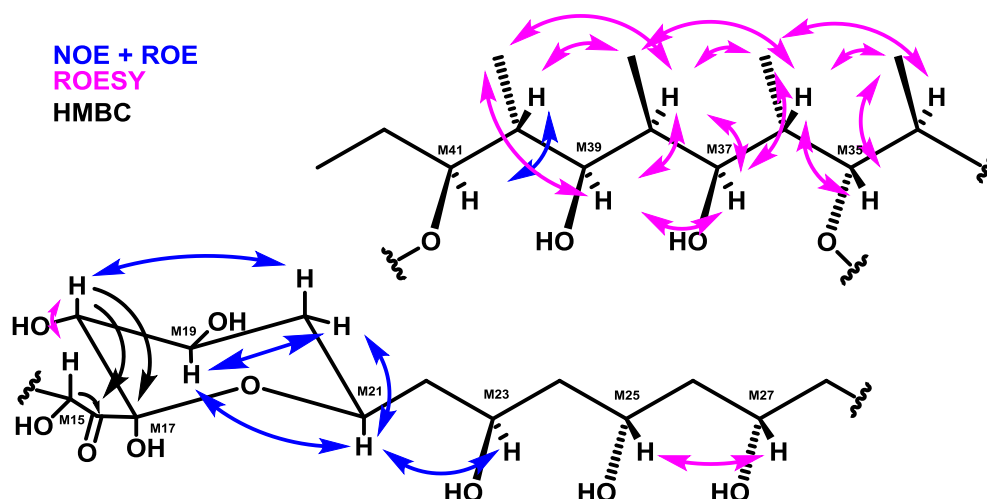


Рис. 42. Некоторые 2D ЯМР корреляции и относительная конфигурация для сахаров А, В, С.

Относительная конфигурация тетрагидропиранового кольца ( $C_{M17}-C_{M21}$ ) была получена из корреляций ROE (Рис. 42). Корреляция между  $H_{M19}$  и  $H_{M21}$  предполагает осевое положение этих протонов, а также корреляцию между  $H_{M18}$  и осевым  $H_{M20}$ . Другой протон  $H_{M20}$  взаимодействует как с  $H_{M19}$ , так и с  $H_{M21}$ , что подтверждает его экваториальное положение. Корреляция ROE между  $H_{M15}$  и осевой  $H_{M18}$  подтверждает наличие  $\alpha$ -гликозидной связи в положении  $C_{M17}$ . Корреляция ROE между  $M25$  и  $M27$  и отсутствие корреляций между  $M23$  и  $M25$  согласуются с *анти-син* конфигурацией  $C_{M23}-C_{M25}-C_{M27}$ . Наконец, стереохимия фрагмента  $M34-M40$  была установлена из корреляций ROE (Рис. 43). Взаимодействие между  $H_{M40}$ ,  $H_{M39}$  и метилом  $H_{M38'}$  наряду с взаимодействием между  $H_{M38}$  и метилом  $H_{M40'}$  предполагает *анти-син* конфигурацию блока  $M38-M40$ . Аналогичным образом, корреляции между  $H_{M38}$ ,  $H_{M37}$  и метилом  $H_{M36'}$  наряду с корреляцией между  $H_{M36}$  и метилом  $H_{M38'}$  выявляют *син/анти*-конфигурацию последовательностей  $M36-M38$ . Тот же мотив корреляции ROE для следующего блока  $M34-M36$  также предложил *син/анти*-конфигурацию (Рис. 43).



**Рис. 43.** Ключевые 2D ЯМР корреляции и относительная конфигурация для тетрагидропиранового кольца.

Таким образом, большинство относительных стереоконфигураций могут быть выведены из данных ЯМР. Однако существуют некоторые трудности в определении относительных конфигураций пар стереоцентров  $C_{M21}-C_{M23}$  и  $C_{M40}-C_{M41}$ . Действительно, в работе испанских исследователей [144] предложена *анти*-ориентация для  $C_{M21}-C_{M23}$  и *син*-ориентация для пар  $C_{M40}-C_{M41}$  в PM100117 (PM100118). Напротив, в работе японских исследователей [145] предложены противоположные относительные конфигурации для обеих пар в деплелидах А и В. Астолиды, деплелиды и соединения PM100117 имеют почти одинаковые углеродные каркасы из полиольного макролактона (с одним дополнительным 4'-Me в деплелидах, Рис. 28), очень похожие химические сдвиги соответствующих протонов и атомов углерода (см. Приложение 8 и Приложение 9) и те же относительные стереоконфигурации в последовательностях  $C_{M17}-(C_{M18})-C_{M19}-C_{M21}$ ,  $C_{M23}-C_{M25}-C_{M27}$  и  $C_{M34}-C_{M35}-C_{M36}-C_{M37}-C_{M38}-C_{M39}-C_{M40}$ . Такая степень сходства указывает на то, что их биосинтез, вероятно, происходит из очень похожих кластеров ферментов, что делает полную инверсию в M23-M27 по сравнению с M17-M21 и в M41 по сравнению с M34-M40 крайне маловероятной. Более современные методы, используемые для исследования деплелидов (химическая деградация и дериватизация, ECOSY и *J*-разрешенный HMBC) позволяют предположить, что стереохимия деплелидного макролида, вероятно, имеет место для PM100117(8) и астолидных макроциклов.

### 2.2.3. Антимикробные и цитотоксические свойства астолидов А,В

Была изучена антибактериальная активность соединений против грамположительных (*Staphylococcus aureus* ATCC 21027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) штаммов бактерий и граммотрицательного штамма (*Escherichia coli* ATCC 25922), ингибирования ро-



ста не наблюдалось вплоть до активной концентрации 160 мкг/мл. В то же время оба астолида проявляли сильный противогрибковый эффект в отношении дрожжей *C. albicans* ATCC 14053 и плесневого гриба *A. niger* ATCC 16404 (Таблица 8). Аналогично, ингибирование также было обнаружено дисково-диффузионным методом для клинических изолятов грибов и дрожжей, вызывающих заболевания человека. Различные уровни активности были продемонстрированы в отношении клинических изолятов *Aspergillus*. Оба соединения были активны в отношении *A. niger* 219, *A. fumigatus* 163, *A. flavus* 905 и не влияли на *A. ochraceus* 497 и *A. terreus* 1133. При этом все протестированные клинические изоляты дрожжей были чувствительны к соединениям в концентрации 40 мкг/диск. Экспериментально определенные значения МИК для всех тестируемых соединений позволили сделать вывод, что обе молекулы показали умеренное ингибирование обоих изолятов *C. albicans* и *A. niger* 219 (значения МИК 4 мкг/мл) и небольшое ингибирование *C. tropicalis* 1402 (МИК 8 мкг/мл), что сопоставимо с контрольным антибиотиком (амфотерицин В, Таблица 8).

Таблица 8. Антифунгальная активность астолидов (мкМ)<sup>6</sup>

Микроорганизм	Астолид А	Астолид В	Амфотерицин В
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	2.5	1.25	0.25
<i>A. niger</i> ATCC 16404	1.25	0.6	1.0
<i>C. albicans</i> 1582	2.53	2.51	1.08
<i>C. tropicalis</i> 1402	5.06	5.01	1.08
<i>A. niger</i> 219	2.53	2.51	0.27

Следует отметить, что деплелиды А,В [145] были протестированы против почти двух десятков штаммов грибов и показали значения МИК в диапазоне 5–10 мкМ для наиболее восприимчивых штаммов дрожжей и не проявили активности против трех протестированных штаммов *Aspergillus* (МИК>40 мкМ). РМ100117 и РМ100118 продемонстрировали «небольшую противогрибковую активность в отношении *Candida albicans* ATCC10231», значения не сообщались [144].

Таблица 9. Антипролиферативная активность астолидов А,В<sup>7</sup>

Клеточная линия	Тип линии	IC <sub>50</sub> (мкМ)		
		Астолид А	Астолид В	Доксорубицин

<sup>6</sup> Активность астолидов в отношении условно-патогенных микромицетов изучалась в Лаборатории разработки методов поиска биологически активных соединений под руководством д.б.н. Тренина А.С., подавление клинических изолятов изучалось д.б.н. Садыковой В.С. (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе) в сотрудничестве с Кулько А.Б (Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы)

<sup>7</sup> Цитотоксичность астолидов измерялась к.х.н. Деженковой Л.Г. (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе)

K562	лейкемия	2.7	0.7	0.18
HCT116	карцинома	3.4	1.2	0.4
HPF	псевдонормальные	2.3	0.7	0.2

Таким образом, новые нафтохиноновые неполиеновые полиолильные макролиды **3,4** (астолиды А и В), выделенные из *S. hygrosopicus*, были идентифицированы как соединения, структурно родственные недавно опубликованным антибиотикам PM100117 и PM100118, от которых они отличаются только одной гидроксильной группой в малом полукетальном цикле в макролактонной части молекулы. Следует отметить, что соединения **3** и **4** проявляют сильную антифунгальную активность в отношении грибов и дрожжей.

## 2.3 Выделение и изучение 20-членных макролидов структурного семейства ирумамицина

Следующим объектом исследования стал штамм-продуцент *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812, проявляющий выраженную антибактериальную и антифунгальную активность.<sup>8</sup> Изучение этого штамма-продуцента проводилось в НИИНА им. Г.Ф. Гаузе в течение более, чем 40 лет. Разные типы противомикробной активности ассоциированы с различными группами вторичных метаболитов, продуцируемых этим штаммом. Антифунгальные свойства оказались обеспечены гидрофобными макролидными антибиотиками.

### 2.3.1. Выделение, очистка и разделение смеси антифунгальных макролидов

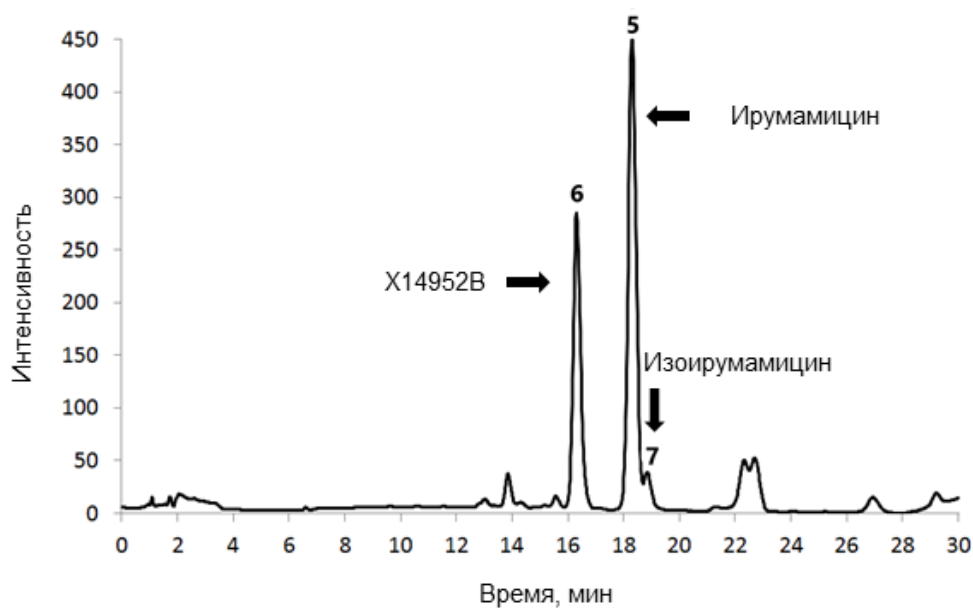
При оптимизации метода экстракции и фракционирования вторичных метаболитов, синтезируемых штаммом-продуцентом, был разработан метод разделения антибактериальной и противогрибковой фракций экстрактов. Для этого изначальные экстракты, содержащие обе фракции, упаривали досуха, а затем многократно промывали сухой остаток этилацетатом. Объединение и концентрирование экстрактов позволило отделить фракцию с противогрибковой активностью. Следует отметить, что большая часть противогрибковых соединений содержалась в экстракте биомассы.

При дальнейшем фракционировании и анализе было установлено, что противогрибковую активность проявляют бесцветные слабо поглощающие соединения, темнеющие на ТСХ при проявлении серной кислотой, что позволило предположить наличие углеводной части в молекуле.

Активные соединения были очищены с помощью хроматографии на Sephadex LH-20 с последующей препаративной ВЭЖХ на обращеннофазовом сорбенте (силанизированный силикагель С2). Были выделены три соединения: два основных компонента **5** и **6**, и один минорный компонент **7** (Рис. 44).

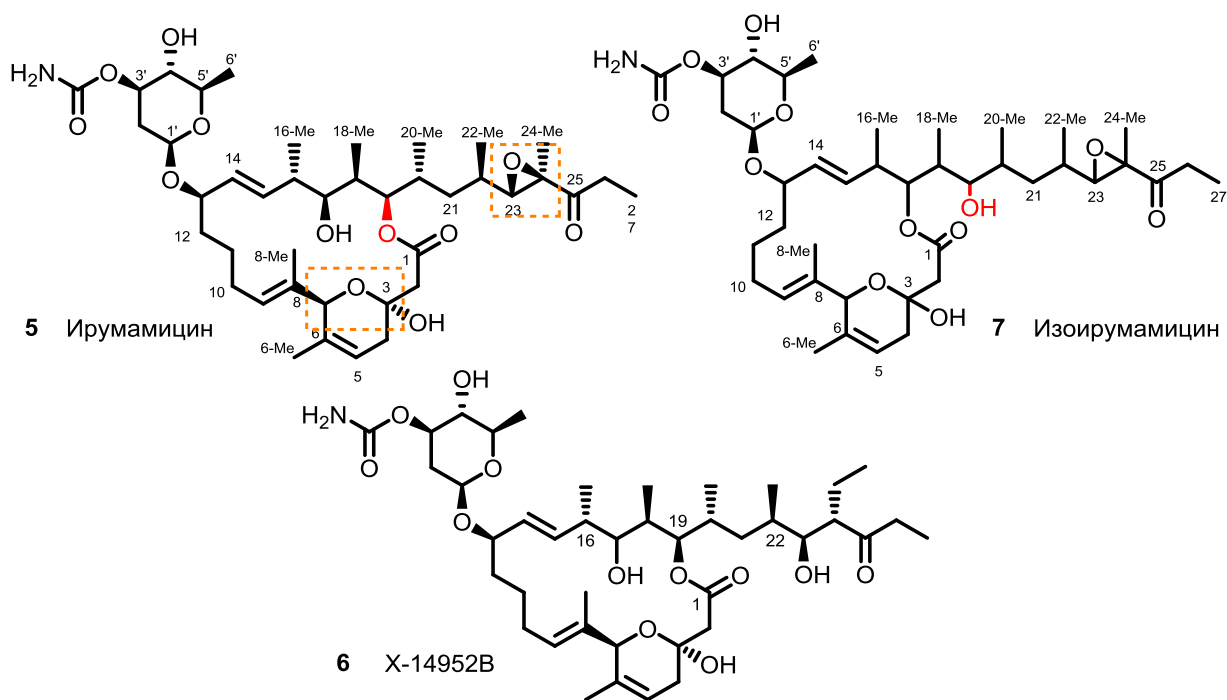
---

<sup>8</sup> Культивирование штамма *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980 для наработки активных соединений осуществлялось подразделением под руководством д.б.н. Лапчинской О.А. (Лаборатория мутагенеза и селекции продуцентов биологически активных соединений НИИНА им. Г.Ф. Гаузе).



**Рис. 44.** Профиль ВЭЖХ антифунгальной фракции после обогащения с помощью Sephadex LH-20. Колонка MN Nucleodur C18 5 мкм, 4.6×250 мм; поток 1 мл/мин; элюент ацетонитрил–вода 50→68% за 15 мин, 68→72% за 10 мин, 72→90% за 4 мин, детекция по поглощению при 206 нм.

Данные масс-спектрометрии высокого разрешения (ESI HRMS) показали, что соединения **5** и **7** имеют одинаковый состав, совпадающий с антифунгальным антибиотиком ирумамицином (для **5** и **7**  $m/z$  786.4391 и 786.4395, расчет для  $C_{41}H_{65}NO_{12}$   $[M+Na]^+$  786.4399, отклонение 1 и 0.5 ppm соответственно), в то время как компонент **6** имеет брутто-формулу  $C_{42}H_{69}NO_{12}$  ( $m/z$  802.4712, расчет для  $C_{42}H_{69}NO_{12}$ ,  $[M+Na]^+$  802.4712). Был получен полный набор данных ЯМР 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 описанное вещество X-14952B. Третий компонент смеси **7**, имеющий ту же молекулярную формулу, что и ирумамицин, оказался новым (Рис. 45).



**Рис. 45.** Структуры ирумамицина **5**, его изомера **7** и аналога X14952B **6**, нумерация атомов для отнесения сигналов. Оранжевым пунктиром отмечены фрагменты, конфигурация которых была установлена в рамках данной работы.

### 2.3.2. Установление структуры и пространственного строения макролидов на основании данных ЯМР

Ранее неописанный изомер ирумамицина **7**, содержащий уменьшенное 18-членное макролактонное кольцо, был назван изоирумамицином. Сравнение химических сдвигов и ключевых 2D корреляций для соединений **5** и **7** приведены в таблице ниже. Соотнесение полученных спектров с литературными данными приведено в приложениях (Приложение 6, Приложение 7).<sup>9</sup>

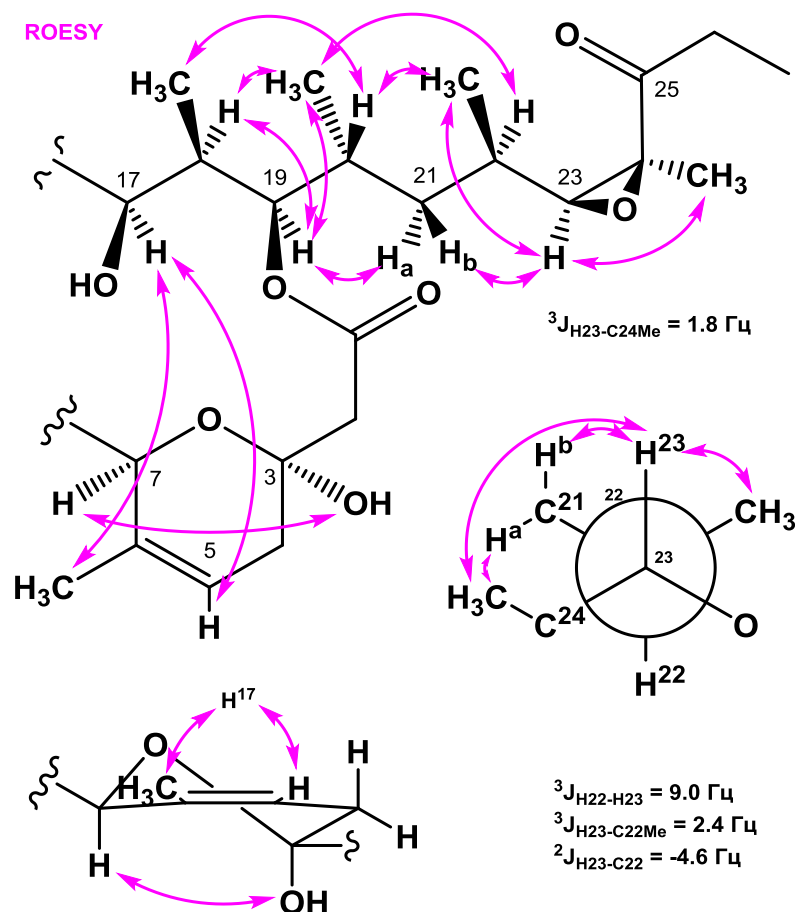
Таблица 10. Данные спектроскопии ЯМР соединений **5** и **7** (CDCl<sub>3</sub>, 400.1 МГц для <sup>1</sup>H и 100.6 МГц для <sup>13</sup>C)

#	Ирумамицин (5)			Изоирумамицин (7)		
	$\delta\text{H}$ (J, Hz)	$\delta\text{C}$ , type	HMBC	$\delta\text{H}$ (J, Hz)	$\delta\text{C}$ , type	HMBC
1	-	173.3, C	2, 19	-	172.8, C	2, 17
2	2.58, d (16.7); 2.69, d (16.7)	43.4, CH <sub>2</sub>	3-ОН	2.62, m (25.8, 15.6)	44.5, CH <sub>2</sub>	3-ОН
3	-	94.0, C	2, 3-ОН, 5	-	93.9, C	2, 3-ОН, 5
3-ОН	5.62, s	-		5.38, s	-	
4	2.14, m	35.1, CH <sub>2</sub>	2, 3-ОН, 5	2.17, m	34.9, CH <sub>2</sub>	2, 3-ОН, 5
5	5.50, m	116.8, CH	6-Me	5.51, m	116.8, CH	6-Me
6	-	133.0, C	6-Me	-	132.9, C	6-Me
6-Me	1.50, s	19.2, CH <sub>3</sub>		1.55, s	19.0, CH <sub>3</sub>	
7	4.47, s	80.1, CH	6-Me, 8-Me, 9	4.52, s	80.3, CH	6-Me, 8-Me
8	-	134.9, C	8-Me	-	134.4, C	8-Me, 10

<sup>9</sup> Спектры ЯМР ирумамицина и его аналогов регистрировались к.х.н. Новиковым Р.А. (ИМБ РАН).

8-Me	1.41, s	10.8, CH <sub>3</sub>	9	1.47s	11.3, CH <sub>3</sub>	
9	5.45, dd (10.5, 4.8)	129.3, CH	8-Me	5.44, dd (10.7, 3.7)	131.3, CH	8-Me
10	1.89, 2.13, m	27.0, CH <sub>2</sub>	9, 11	2.13, m	27.4, CH <sub>2</sub>	12
11	1.24, 1.47, m	26.0, CH <sub>2</sub>	10, 13	1.44, 1.72, m	24.7, CH <sub>2</sub>	12
12	1.45, 1.60, m	35.3, CH <sub>2</sub>		1.52, 1.46, m	34.1, CH <sub>2</sub>	
13	3.94, m	82.4, CH	15, 1'	4.04, m	82.5, CH	15, 1'
14	5.58, dd (15.4, 6.8)	134.3, CH	16	5.52, m	132.4, CH	16
15	5.24, dd (15.4, 9.4)	134.1, CH	13, 16-Me, 17	5.52, m	133.4, CH	13, 16-Me, 17
16	2.16, m	42.1, CH	14, 15, 16-Me	2.45, m	37.4, CH	16-Me, 17
16-Me	0.94, d (6.8)	17.1, CH <sub>3</sub>	15, 16	1.03, d (6.6)	16.2, CH <sub>3</sub>	
17	3.31, m	77.6, CH	15, 16, 18-Me, 19	4.85, dd (9.7, 1.0)	80.1, CH	18-Me
18	1.99, m	34.6, CH	17, 18-Me, 19	2.02, m	35.7, CH	17, 18-Me
18-Me	0.91, d (6.8)	5.4, CH <sub>3</sub>	17, 18, 19	0.99, d (6.9)	6.9, CH <sub>3</sub>	17
19	4.86, dd (8.3, 1.2)	81.5, CH	17, 18-Me, 20-Me	3.21, m	78.8, CH	17, 18-Me
20	1.79, m	32.0, CH	19, 20-Me, 21	1.71, m	32.9, CH	19, 20-Me
20-Me	0.87, d (6.7)	15.9, CH <sub>3</sub>	19, 21	0.87, d (6.5)	16.5, CH <sub>3</sub>	21
21	0.99, 1.18, m	36.0, CH <sub>2</sub>	19, 20-Me, 22-Me, 23	1.07, m	34.5, CH <sub>2</sub>	20-Me, 22-Me
22	1.49, m	30.6, CH	22-Me, 23	1.51, m	30.5, CH	22-Me, 23
22-Me	1.10, d (7.3)	17.0, CH <sub>3</sub>	21, 23	1.14, d (6.5)	17.1, CH <sub>3</sub>	23
23	2.72, d (9.0)	66.2, CH	22-Me, 24-Me	2.72, d (8.7)	66.5, CH	22-Me, 24-Me
24	-	64.4, C	22-Me, 24-Me	-	64.3, C	24-Me
24-Me	1.46, s	12.9, CH <sub>3</sub>		1.48, s	12.9, CH <sub>3</sub>	
25	-	210.8, C	23, 24-Me, 26, 27	-	210.9, C	23, 24-Me, 26, 27
26	2.41, m	28.7, CH <sub>2</sub>	27	2.41, m	28.8, CH <sub>2</sub>	27
27	1.03, t (7.6)	7.3, CH <sub>3</sub>	26	1.03, t (7.2)	7.5, CH <sub>3</sub>	26
1'	4.57, dd (9.7, 1.4)	98.3, CH	2', 5'	4.55, dd (9.7, 1.6)	98.8, CH	13, 2', 5'
2'	1.70, 2.27, m	36.8, CH <sub>2</sub>	1'	1.69, 2.29, m	36.5, CH <sub>2</sub>	
3'	4.67, m	75.4, CH	2', 4'	4.68, m	75.7, CH	2', 4'
3'-OC(O)NH <sub>2</sub>	-	157.3, C	3'	-	157.5, C	3'
4'	3.24, m	75.1, CH	3', 5', 6'	3.25, m	75.4, CH	2', 3', 5', 6'
5'	3.26, m	72.0, CH	4', 6'	3.32, m	72.1, CH	1', 4', 6'
6'	1.33, d (5.0)	17.8, CH <sub>3</sub>	4', 5'	1.35, d (6.1)	18.0, CH <sub>3</sub>	4', 5'

На основании накопленных спектральных данных были установлены ранее неизвестные стереоконфигурации эпоксидного и полукетального колец (стереоцентры C3, C7, C23, C24, Рис. 45) ирумамицина **5**. ROE корреляции во фрагменте C18-C22 согласуются с ранее опубликованными данными о пространственном строении этих соединений (Рис. 46).



**Рис. 46.** Ключевые ROESY корреляции в C18-C27 фрагменте и полукетальном кольце ирумамицина **5**

Большая вицинальная константа спин-спинового взаимодействия между протонами H23 и H23 ( $^3J_{\text{H}22-\text{H}23} = 9.0$  Гц) позволяет предположить анти конформацию этих протонов. ROE корреляции в H23–H22Me, H23–H21b и H24Me–H21a парах, наряду с большой гетероядерной константой между H23 и C22 ( $^3J_{\text{H}23-\text{C}22} = -4.6$  Гц) согласуются с антиконфигурацией в гош-конформации в C22-C23 фрагменте ирумамицина, что совпадает с пространственным строением C22-C23 фрагмента вентурицидина. Для эпоксидного кольца ROE корреляции между H24Me–H23 и H24Me–H21a, наряду с маленькой константой взаимодействия H23 и C24Me, позволяет предположить *син*-конфигурацию.

Относительная конфигурация полукетального кольца была предложена на основе ROE корреляций (Рис. 46). Кросс-пик между H7 и OH3 свидетельствует об аксиальном положении этих групп. Дальнее ROE взаимодействие между H17–H5 и H17–H6Me, наряду с отсутствием корреляции между H7 и OH3, позволяет предположить, что стереоконфигурация полукетального кольца такая же, как ранее описана для вентурицидина на основе деградации и рентгеноструктурного анализа.

К сожалению, низкое содержание изоирумамицина **7** привело к небольшому количеству индивидуального вещества и не позволило накопить достаточно качественные

спектральные данные, которые позволили бы установить относительные конфигурации стереоцентров молекулы.

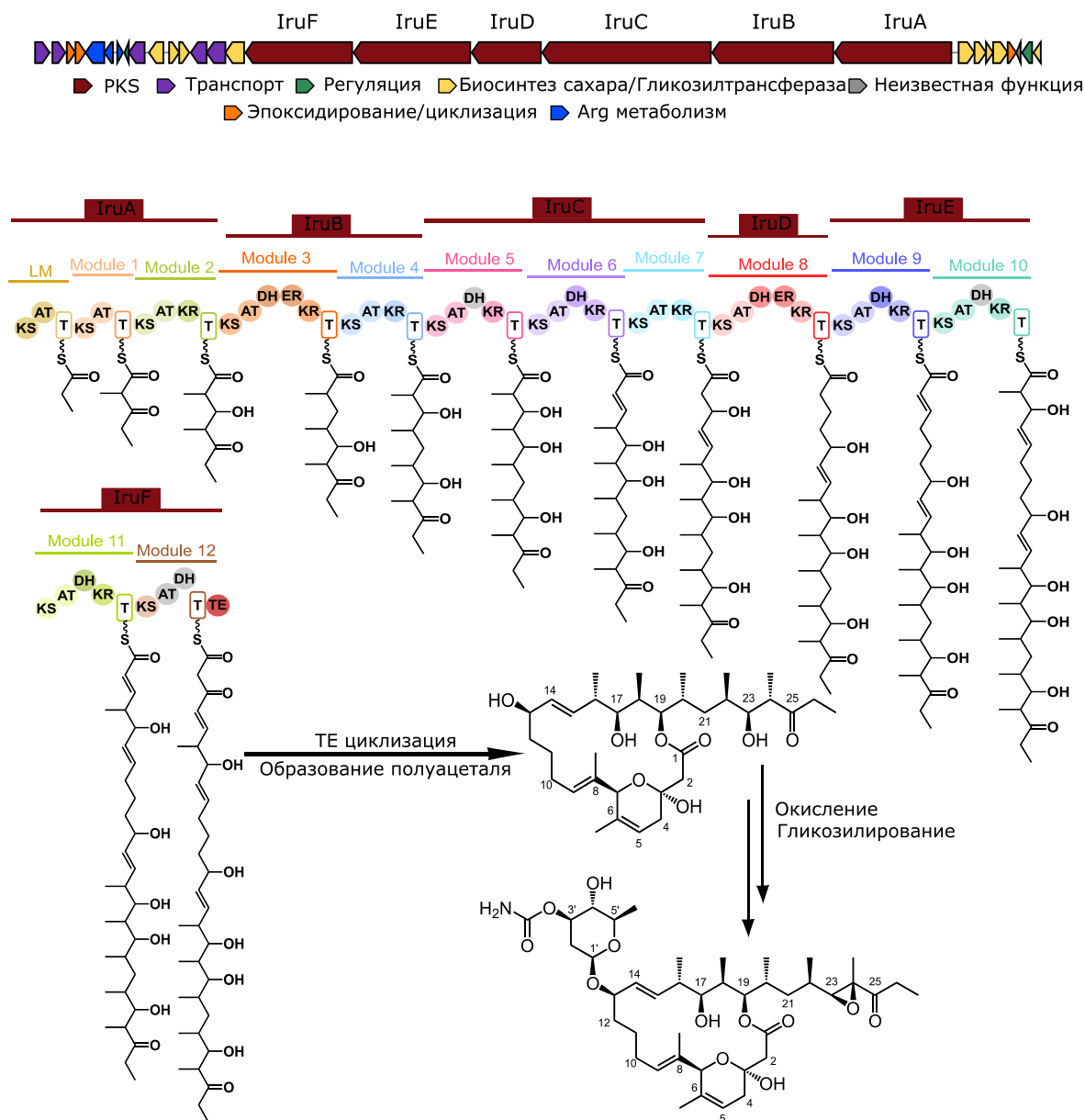
### 2.3.3 Биосинтез антибиотиков семейства ирумамицина

Несмотря на то, что ирумамицин и другие антибиотики семейства 20-членных антитрифунальных макролидов выделены и охарактеризованы довольно давно, об их биосинтезе известно немного (см. раздел 1.2.4). Для подтверждения стереоконфигурации хиральных центров ирумамицина и изучения его биосинтеза, был исследован биосинтетический генный кластер, предположительно ответственный за биосинтез этих соединений. Полногеномная последовательность штамма продуцента *Streptomyces* sp. INA-Ас-5812 была проанализирована с помощью программы AntiSMASH, обнаружен генный кластер, включающий гены, кодирующие поликетидсинтазу (PKS) I типа, предположительно ассоциированный с биосинтезом ирумамицина.<sup>10</sup> 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. [205] (Рис. 47А). 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. 47В).

---

<sup>10</sup> Полногеномное секвенирование штамма-продуцента выполнено д.б.н. Равиным Н.В. и д.б.н. Мардановым А.В. (ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии»), биоинформатический анализ проводился совместно с к.х.н. Тереховым С.С. (ИБХ РАН).





**Рис. 47.** Предполагаемый путь биосинтеза антибиотика ирумацина, доменная архитектура *Iru* PKS

### 2.3.3.1 Кетосинтазные домены (KS)

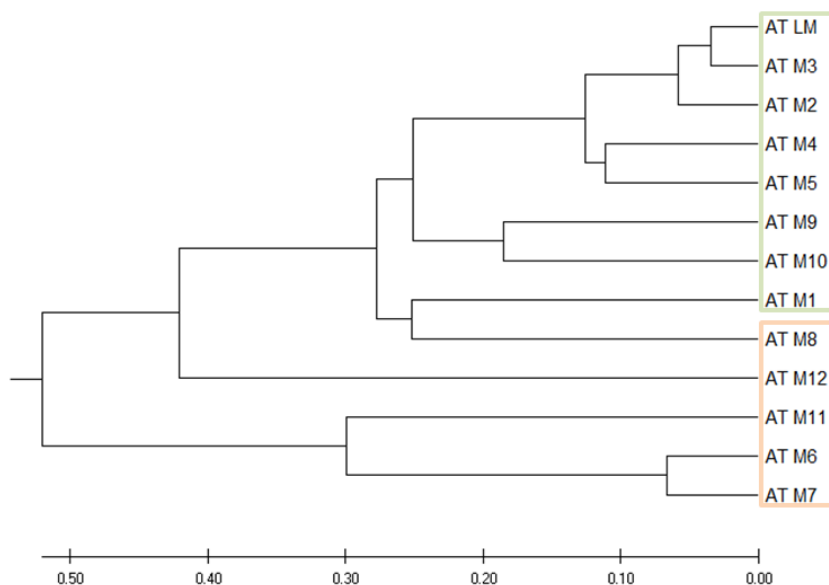
Выравнивание кетосинтазных доменов показало типичную замену цистеина на глутамин в кетосинтазном домене стартового модуля (KSQ) (Рис. 48) [206]. Консервативный мотив DTxQSxS необходим для декарбоксилирования стартового метилмалонил-коэнзимаА.

LM KS	D	S	G	Q	S	S	S
M1 KS	D	T	A	C	S	S	S
M2 KS	D	T	A	C	S	S	S
M3 KS	D	T	A	C	S	S	S
M4 KS	D	T	A	C	S	S	S
M5 KS	D	T	A	C	S	S	S
M6 KS	D	T	A	C	S	S	S
M7 KS	D	T	A	C	S	S	S
M8 KS	D	T	A	C	S	S	S
M9 KS	D	T	A	C	S	S	S
M10 KS	D	T	A	C	S	S	S
M11 KS	D	T	A	C	S	A	S
M12 KS	D	T	A	C	S	S	S
Мотив	D	T	X	C	S	X	S

**Рис. 48.** Консервативный мотив активного центра KS доменов.

### 2.3.3.2 Ацилтрансферазные домены (АТ)

Анализ UPGMA и выравнивание аминокислотных последовательностей ацилтрансферазных доменов выявило некоторые несоответствия предсказанной специфичности и наблюдаемой в выделенной молекуле специфичности. Как видно из Рис. 49, АТ домен восьмого модуля (M8 АТ) кластеризуется с метилмалонил-специфическими доменами, однако в структуре как ирумамицина, так и всех родственных макролидов в данном сайте отсутствует метильная группа. Не было выделено даже следовых количеств гомологичного соединения, содержащего метильную группу в положении C10.



**Рис. 49.** UPGMA – анализ аминокислотных последовательностей доменов в Iru PKS. Зеленым отмечены метилмалонил-специфичные домены, оранжевым – малонил-специфичные (согласно структуре синтезируемых макролидов).

Более детальный анализ внутренней структуры доменов подтверждает схожесть АТ домена восьмого модуля с метилмалонилспецифичными доменами. Так восемь метилмалонил-специфичных АТ доменов (LM, M1-M5, M9, M10) содержат типичные последовательности xVDVxQ, GHSQGE, xxSH для мотивов I, II и III, соответственно, которые ассоциированы с метилмалонатной специфичностью [207,208]. Оставшиеся домены, согласно структуре синтезируемых макролидов, должны иметь малонатную специфичность. Действительно, домены в модулях M6, M7 и M11 содержат характерные для малонат-специфических доменов [207,208] последовательности xTxYTQ, GHSI(V)GE, xAFN для мотивов I, II, III (Рис. 50). При этом ацилтрансферазный домен модуля M8 содержит последовательности, характерные для метилмалонатной специфичности, включая наиболее консервативные и существенные для реализации субстратной специфичности аминокислоты (глутамин в каталитическом центре, мотив GHSQ и объемный фенилаланин xAFN вместо серина в мотиве III) [207]. Тем не менее, продуктом работы этого модуля является именно встраивание малонатного фрагмента. Для установления структуры ирумамицина штамм-продуцент выращивали на средах, содержащих изотопно-меченные (обогащенные на 90%  $^{13}\text{C}$  ацетат и пропионат) прекурсоры биосинтеза поликетидов [137]. Эти опыты показали полное соответствие с субстратной специфичностью доменов, предположенной на Рис. 47, в том числе в положении C9-C10 однозначно наблюдалось встраивание ацетатного, а не пропионатного остатка (см. раздел 1.2.4, Рис. 23). По-видимому, селективность работы модуля M8 обеспечивается кетосинтазным доменом, а не ацилтрансферазным. Существенная роль кетосинтазных доменов в специфичности синтеза поликетидов показана, например, для модульных PKS, не содержащих ацилтрансферазных модулей (*trans*-АТ PKS) [209]. Аналогичная ситуация наблюдалась ранее для крупных полиольных макролидов PM100117/8 [193], где также наблюдалось расхождение в специфичности одного из доменов (АТ домен в модуле M19 в GonP7) при полном отсутствии метилированного в положении C4 аналога в культуральной жидкости штамма *S. caniferus* GUA-06-05-006A. Недавно был описан и подробно проанализирован биосинтез каниферолидов – ближайших аналогов макролидов PM100117/8 [146]. В случае каниферолидов, в положении C4 содержится метильная группа, то есть наблюдаемая структура согласуется с субстратной специфичностью соответствующего домена (АТ домен модуля M19 в scaP7). Интересно отметить, что именно стереоконфигурация этой единственной метильной группы не совпадает с предсказанной исходя из анализа KR-доменов биосинтетического кластера каниферолидов.

LM	R V D V V Q	G H S Q G E	Y G S H
M1	K V D V L Q	G H S Q G E	F A S H
M2	R V D V V Q	G H S Q G E	Y G S H
M3	R V D V V Q	G H S Q G E	Y G S H
M4	R V D V I Q	G H S Q G E	Y G S H
M5	R V D V V Q	G H S Q G E	Y A S H
M9	R V D V V Q	G H S Q G E	Y A S H
M10	R V D V V Q	G H S Q G E	Y P S H
Мотив	X V D V X Q	G H S Q G E	X X S H
M6	E T V Y T Q	G H S V G E	Q A F H
M7	E T V Y T Q	G H S V G E	Q A F H
M11	R T G Y T Q	G H S I G E	H A F H
Мотив	X T X Y T Q	G H S V/I G E	X A F H
M8	R D D V V Q	G H S Q G E	Y A S H
M12	D P A V A H	G I G G G E	V T A R

**Рис. 50.** Консервативные мотивы (I,II,III) АТ доменов Iru PKS. Зеленым отмечены метилмалонил-специфичные домены, оранжевым – малонил-специфичные (согласно структуре синтезируемых макролидов).

Отдельного упоминания заслуживает структура АТ домена последнего модуля M12. Анализ последовательности показывает, что этот домен не только содержит очень необычные последовательности аминокислот во всех консервативных мотивах, но не имеет серина в каталитическом центре (Рис. 50). В мотиве II серин GHS заменен на глицин, что позволяет предположить, что этот домен неактивен, так как было показано, что мутации в этой аминокислоте приводят к полной утрате активности АТ-доменов [210]. Возможным объяснением этого факта может быть итеративное удлинение цепи предыдущим доменом M11 или участие в биосинтезе на этом этапе внешнего АТ домена *in trans*. Итеративное повторение домена, так называемое «заикание», ранее описывалось для объяснения биосинтеза поликетидов на два атома длиннее, чем предполагалось из архитектуры PKS [211,212]. Для объяснения необычного биосинтеза эпотилона предлагается модель, включающая одновременно пропуск и итеративное «заикание» домена [213].

### 2.3.3.3. KR и DH домены, стереоспецифичность

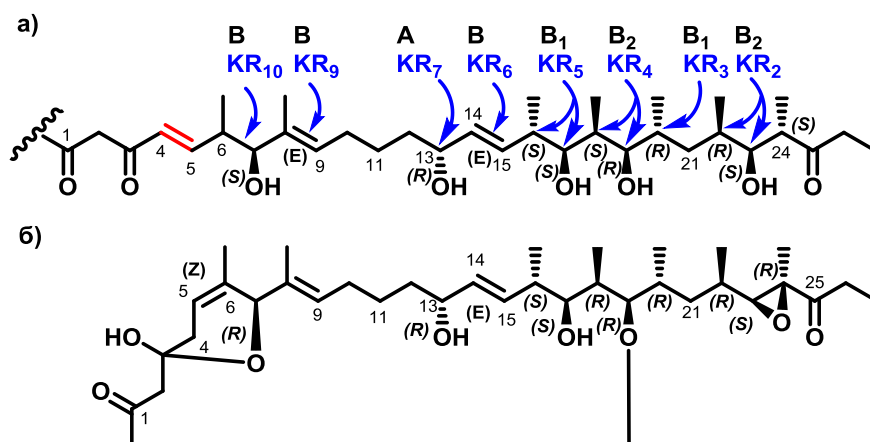
Выравнивание кеторедуктазных доменов *Iru* PKS показало наличие в доменах модулей M2-M4, M11 характерного LDD мотива, позволяющего однозначно отнести их к кеторедуктажным модулям типа В. В модулях M6,M8,M9 содержится менее распростра-

ненные аминокислотные последовательности данного мотива IDD и VDD, что также встречается в кеторедуктазных доменах типа В (Рис. 51) [214].

KR M2	H T A A V	L D D	G A L	S S L A G T V G M A G Q G N Y A	P	G N A	Type B2
KR M3	H A A G A	L D D	G V V	S S A A G A L G S A G Q G G Y A	A	A N S	Type B1
KR M4	H T A A A	L D D	G P L	S S T A G T F G A A G Q G N Y A	P	G N A	Type B2
KR M5	H A A G V	L D D	G V L	S S A A G V F G A P G Q G N Y A	A	A N A	Type B1
KR M6	H S A G V	V D D	G V I	S S A A G I L G A V G Q A N Y A	A	A N T	Type B1
KR M7	H T A G V	A Q S	T R I	S S T A G V W G G A G Q G A Y G A A N A	Q	A A N A	Type A1
KR M8	H A A G V	I D D	G V L	S S A S G V F G A P G Q A N Y A	A	A N A	Type B1
KR M9	H A A G A	V D D	G V V	S S A A G V F G S P G Q A N Y A	A	A N V	Type B1
KR M10	H A A G A	V D D	G V V	S S A A G V F G S P G Q A N Y A	A	A N V	Type B1
KR M11	H A A G V	L D D	G M V	S S A A G V F G S P G Q S N Y A	A	A N T	Type B1

**Рис. 51.** Выравнивание кеторедуктазных доменов, цветом выделены консервативные мотивы, на основании которых проведена классификация типов доменов

Наличие в доменах KR M2, KR M4 мотива YxP позволило отнести их к кеторедуктазам типа B2, в то время как все остальные кеторедуктазы типа В содержат домен YxA, что характерно для кеторедуктаз типа B2. Домен M7 содержит кеторедуктазу типа А, что подтверждается отсутствием консервативного LDD мотива и наличием мотива WxxxxQ (Рис. 51) [215]. Абсолютная конфигурация, предсказанная исходя из типов кеторедуктазных доменов, полностью согласуется с установленной ранее на основании данных ЯМР-спектроскопии [216] (Рис. 52).



**Рис. 52.** Сравнение абсолютной конфигурации и структуры агликона ирумамицина, предсказанной на основании биосинтеза (а) и известной ранее из ЯМР-исследований (б) [216]. Кеторедуктазные домены, определяющие стереохимию восстановления, отмечены синим. Следует отметить, что дескриптор конфигурации центров C24 и C7 изменяется в связи с миграцией двойной связи, гликозилированием и образованием эпоксида в конечной структуре.

Сравнение структуры агликона ирумамицина, предсказанной из биосинтеза, и установленной экспериментально показывает необычное положение двойной связи в полукетальном цикле. Обычный механизм формирования двойной связи предполагает образование  $\alpha,\beta$ -ненасыщенного соединения после элонгации в модуле, содержащем дегидратазный (DH) домен. Чаще всего происходит образование *транс*-двойной связи при дегидратации гидроксильных групп, восстановленных кеторедуктазным доменом типа В,

образование же *cis*-двойных связей как правило ассоциируют с дегидратацией продуктов восстановления кеторедуктазой типа А или дополнительной изомеризацией продукта первичной дегидратации [217,218]. В *Iru* PKS наблюдается формирование *trans*-двойной связи в модуле М6 в полном соответствии с этими принципами. Однако также в молекуле ирумамицина и его аналогов содержится *cis*-двойная связь в положении С4-С5, то есть  $\beta,\gamma$ -двойная связь.

Поликетидсинтазы I типа подразделяют на два класса в зависимости от того, закодированы ли ацилтрансферазные домены в модулях (*cis*-АТ PKS) или в виде отдельных полипептидов (*trans*-АТ PKS). Впервые сдвиг двойной связи в поликетиде из классического положения  $\alpha,\beta$  в положение  $\beta,\gamma$  был описан и изучен именно для *trans*-АТ PKS. Такие поликетидсинтазы часто демонстрируют необычную комбинаторную логику: сливаются с синтетазами нерибосомальных пептидов и содержат в модулях редкие домены, такие как метилтрансферазы, еноил-КоА гидратазы,  $\beta$ -разветвляющие домены и другие, практически не встречающиеся в *cis*-АТ PKS. Сдвиг двойной связи  $\alpha,\beta$ - $\beta,\gamma$  в поликетиде, синтезируемых *trans*-АТ PKS, осуществляется так называемым еноилизомерным доменом (ЕI домен), по структуре напоминающим дегидратазный домен [219]. Изомеризация двойной связи такими доменами наиболее подробно изучена для поликетиде бациллаена (*bacillaene*) [220,219], также описана для ризоксина (*rhizoxin*) [221] и кораллопиронина (*corallopyronin*) [222]. Известные ЕI домены имеют сходную аминокислотную последовательность, очень похожую на структуру ДН домена, но с несколькими консервативными заменами. Если в ДН доменах гистидин каталитического центра находится в мотиве NxxxxxxxP, то в большинстве ЕI доменов содержится мотив NxxxxxxxL/V, в котором пролин заменен на гидрофобную аминокислоту, чаще всего лейцин. Консервативный остаток глутамин или гистидин, входящий во второй консервативный мотив ДН домена DxxxQ/H, в ЕI доменах как правило замещен на валин или лейцин [219].

Олефиновый сдвиг в *cis*-АТ PKS менее изучен [223]. Подробно описаны три *cis*-АТ PKS, синтезирующие поликетиды, содержащие  $\beta,\gamma$  двойную связь – ансамитоцин (*ansamitocin*) [224], амбрутицин (*ambruticin*) [225] и гефирионовая кислота (*gephyronic acid*) [226]. Аналогичный стереохимический результат зафиксирован для ряда *cis*-АТ PKS, синтезирующих дисциформины А,В (*disciformycins A,B*) [227]; чаксамиксин (*chaxamycin*) [228]; хондрохлорен (*chondrocloren*) [229]; крокацин (*crocacin*) [230]; криптофизин (*cryptophysin*) [231]; диверголид (*divergolide*) [232]; гигроцин (*hygrocin*) [233]; нафтомицин (*naphthomycin*) [234]; рифамицин (*rifamycin*) [235].

Выравнивание ДН доменов в *Iru* PKS (Рис. 53) показывает наличие во всех доменах консервативного мотива каталитического центра НххххххххР, в том числе и в ДН-домене модуля М11, один из которых предположительно несет изомеразную функцию. Аналогичная ситуация наблюдалась при анализе изомеризирующего ДН домена при биосинтезе ансамитоцина [226], он не содержал характерной замены пролина на гидрофобную аминокислоту. То есть механизм осуществления  $\alpha,\beta \rightarrow \beta,\gamma$  олефинового сдвига в ирумамицине вероятно аналогичен единственному аналогу с такой архитектурой изомеризирующего домена – ансамитоцину.

	Каталитический центр													N-конец																			
DH M3	P	W	L	A	D	H	T	V	L	G	R	A	L	V	P	Y	E	R	L	A	A	T	G	Y	G	Y	G	P	T	F	Q	G	I
DH M5*	P	W	L	A	D	H	T	A	A	G	R	T	V	V	P	Y	A	R	L	A	E	A	G	L	A	H	G	P	V	F	R	G	L
DH M6	P	W	L	A	D	H	A	V	L	G	T	V	L	F	P	Y	D	T	M	S	E	G	G	F	A	Y	G	P	T	F	Q	G	L
DH M8	P	W	L	A	D	H	Q	V	L	G	R	V	L	V	P	Y	D	R	L	T	E	W	G	Y	A	Y	G	P	V	F	Q	G	L
DH M9	P	W	L	A	D	H	A	L	L	E	T	V	L	L	P	Y	G	A	L	F	E	R	G	Y	E	Y	G	P	A	F	Q	G	L
DH M10*	A	S	P	A	E	H	T	V	L	D	T	P	V	L	P	Y	G	E	L	F	A	A	G	Q	Q	F	G	P	A	L	Q	G	L
DH M11	P	W	L	A	D	H	A	V	V	G	A	V	L	L	P	Y	P	A	L	A	E	Q	G	Y	A	Y	G	P	T	F	Q	G	L
DH M12*	P	W	L	A	D	H	A	V	A	D	T	V	V	L	P	Y	A	A	L	E	E	R	G	H	V	H	G	P	A	F	R	G	L
Мотив						Н	Х	Х	Х	Г	Х	Х	Х	Х	Р							Y	X	Y									

**Рис. 53.** Консервативные мотивы дегидратазных доменов *Iru* PKS, предположительно неактивные домены отмечены звездочкой.

Согласно структуре ирумамицина, ДН домены модулей М5, М10 и М12 предположительно неактивны. Каталитический центр этих доменов содержит консервативный гистидин, однако в них отсутствует тирозин в YxY мотиве.

#### 2.3.3.4 Образование эпоксида

Согласно ранним работам по изучению механизма биосинтеза ирумамицина, в культуральной жидкости штамма-продуцента наблюдалось последовательное накопление промежуточных продуктов биосинтеза – ируманолида I и ируманолида II [118]. Эти соединения представляют собой предшественники ирумамицина, не содержащие углеродного фрагмента и эпоксида в боковой цепи (см. раздел 1.2.4, Рис. 22).

Эти данные подтверждаются отсутствием в модуле М2 ДН домена, то есть *Iru* PKS синтезирует поликетид, содержащий гидроксильную группу в 23 положении, которая претерпевает дегидратацию и эпоксидирование отдельными ферментами. Следует отметить, что в культуральной жидкости штамма-продуцента был также обнаружен аналог ирумамицина – X-14952В (Рис. 16), содержащий этильную группу в 24 положении вместо метильной. При этом X-14953В не подвергается дегидратации и сохраняет гидроксильную группу в положении 23, что говорит о специфичности соответствующего фермента в зависимости от заместителя в 24 положении. Предположительно образование эпоксида обеспечивается генами *orf3* и *orf4*, однако точное установление их функции и субстратной специфичности требует дополнительных исследований.

### 2.3.3.5 Биосинтез углевода

Финальной стадией биосинтеза ирумамицина, по-видимому, является присоединение углевода – 3'-О-карбамоил-2'-деоксирамнозы. Наиболее близким аналогом углеводной части ирумамицина является углеводный фрагмент конканамицина [236], содержащего 4'-О-карбамоил-2'-деоксирамнозу. Предполагаемые ферменты, участвующие в биосинтезе углеводного фрагмента ирумамицина, имеют высокую гомологию аналогичным ферментам из биосинтетического кластера конканамицина, за исключением карбамоилтрансферазы, что логично, так как в деоксисахаре ирумамицина наблюдается карбамидная группа находится в положении 3', а не 4'.

Исходным субстратом для синтеза углеводного остатка, исходя из анализа биосинтетического кластера, логично предположить 1-О-фосфат- $\alpha$ -D-глюкопиранозу. Orf11 и Orf12 кодируют ферменты, гомологичные тимидилтрансферазе и 4,6-дегидратазе, которые могут генерировать тимидиндифосфат-4-кето-6-деоксиглюкозу. Orf22 имеет высокую схожесть с 2,3-дегидратазой. Продуктом работы таких ферментов [237] является нестабильное соединение, содержащее енольную группу и формирующее тимидиндифосфат-3,4-дикето-2,6-дидеокси- $\beta$ -D-глюкозу в результате кето-енольной таутомерии.

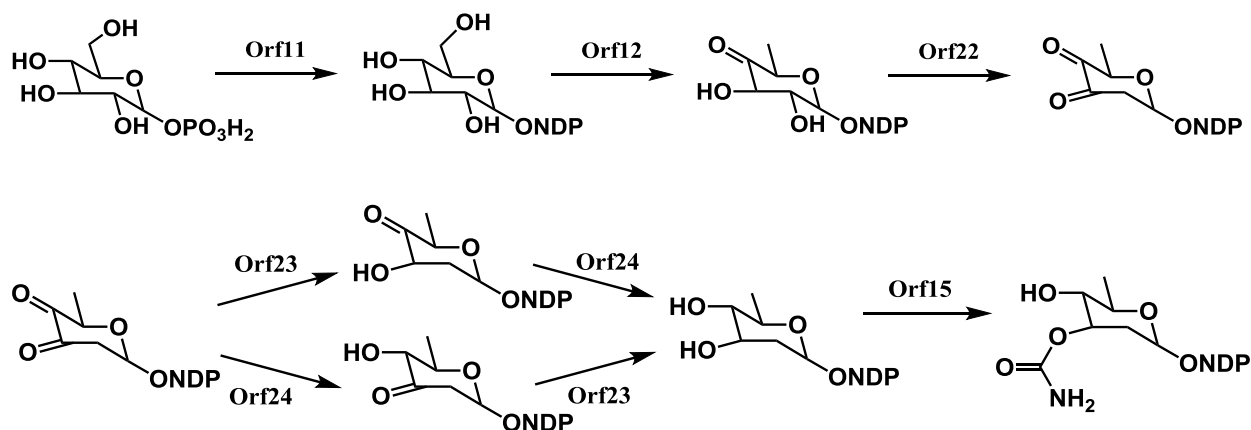


Рис. 54. Предполагаемый путь биосинтеза углеводного фрагмента.

*Orf23* и *Orf24* кодируют два фермента, обладающих высокой схожестью с 2- и 3-кеторедуктазой соответственно. Предположительно, эти два фермента работают последовательно, катализируя восстановление кетонов в положениях 2 и 3, и формируя необходимую конфигурацию гидроксильных остатков в этих положениях (Рис. 54).

Последним этапом синтеза углевода в составе изоирумамицина должно быть карбамоилирование атома С3, что, по-видимому, и происходит под действием фермента Orf15. Этот протеин обладает высокой степенью схожести с целым рядом описанных карбамоилтрансфераз, участвующих в биосинтезе углеводных остатков у макролидов. После синтеза гликозида замена агликона в нем на ранее синтезированный поликетид



катализируется ферментом Orf25, и гомологичным нескольким гликозилтрансферазам, описанным у различных стрептомицетов.

#### 2.3.3.6 Сравнение с биосинтезом вентурицидина

После проведения этого анализа был опубликован биосинтез родственного ирумамицину 20-членного антифунгального макролида вентурицидина [138]. Описанный в этой работе биосинтетический кластер *ven* имеет схожую с обнаруженным в этой работе кластером структуру. Интересно, что описанные выше уникальные особенности строения Iru PKS воспроизводятся и для вентурицидина: наблюдается неверная специфичность АТ-домена модуля, аналогичного М8 (модуль М9 VenH); АТ-домен последнего модуля полностью неактивен, а ДН-домены с возможной «сдвигающей» функцией не содержат явных аномалий. Биосинтез гликозидной части молекулы оказался полностью идентичен предсказанному нами для ирумамицина. Молекула вентурицидина не содержит эпоксидной группы (Рис. 16) и описанный биосинтетический кластер *ven* не включает ферментов, гомологичных Orf3 и Orf4, что может служить косвенным подтверждением выдвинутой гипотезы об их участии в формировании эпоксида.

Подводя итог, биосинтез ирумамицина включает ряд необычных превращений, как на стадии синтеза поликетидной цепочки, так и при постсинтетической модификации.

### 2.3.4. Биологические свойства выделенных представителей структурного семейства ирумамицина

Изначально ирумамицин и вентурицидин описывались как антифунгальные антибиотики против различных фитопатогенов, а позже предлагались в качестве антипаразитарных средств (см Раздел 1.2 обзора литературы). Для соединения X-14852В при описании упоминалась антибактериальная активность. Была изучена антибиотическая активность выделенных индивидуальных компонентов в отношении ряда тест-штаммов микроорганизмов (Таблица 11).<sup>11</sup> Антибиотические свойства ранее описанных соединений **5** и **6** хорошо коррелируют с опубликованными данными. Биологическая активность нового изомера ирумамицина оказалась неожиданной. Антифунгальные свойства изоирумамицина **7** существенно менее выражены, чем у ирумамицина **5**. Как видно из таблицы ниже, для некоторых тест штаммов изоирумамицин проявляет ингибирующее действие в концентрациях, более чем на порядок выше, чем ирумамицин.

---

<sup>11</sup> Активность 20-членных макролидов в отношении условно-патогенных микроорганизмов изучалось в Лаборатории разработки методов поиска биологически активных соединений под руководством д.б.н. Тренина А.С.

Таблица 11. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) ирумамина, X-14952B и изо-ирумамина против различных микроорганизмов

Микроорганизм	Антимикробная активность, мкМ		
	Ирумамин <b>5</b>	X-14952B <b>6</b>	Изоирумамин <b>7</b>
<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

Помимо антибиотической активности, сравнили цитотоксические свойства выделенных соединений (Таблица 12).<sup>12</sup> Все соединения показали умеренную или низкую цитотоксичность без существенной селективности. Интересно, что изомерия макролактонного кольца не повлияла на взаимодействие соединения с клеточными линиями: ирумамин **5** проявляет цитотоксичность, близкую к таковой для изоирумамина **7**.

Таблица 12. Цитотоксичность (IC<sub>50</sub>) ирумамина, X-14952B и изоирумамина в отношении нескольких линий опухолевых клеток и постнатальных фибропластов человека

Клеточная линия	IC <sub>50</sub> , мкМ		
	Ирумамин <b>5</b>	X-14952B <b>6</b>	Изоирумамин <b>7</b>
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

Снижение антифунгальной активности и сохранение цитотоксических свойств при переходе от ирумамина к изоирумамину позволяет заключить, что 20-членное макролактонное кольцо имеет ключевую роль в обеспечении конформации молекулы, необходимой для реализации антимикробной активности этого структурного семейства антибиотиков.

Наиболее изученным представителем структурного семейства 20-членных антифунгальных макролидов, к которому принадлежат полученные соединения, является вентурицидин (Рис. 16), его механизм действия аналогичен олигомицину и заключается в связывании с F<sub>0</sub> субъединицей АТФазы (см. раздел 1.2.4 обзора литературы). Чтобы проверить гипотезу о том, что ирумамин также является ингибитором митохондри-

<sup>12</sup> Цитотоксичность 20-членных макролидов измерялась к.х.н. Деженковой Л.Г. (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе).

альной АТФазы из грибов, были выделены субмитохондриальные частицы из *Saccharomyces cerevisiae* и проанализировано ингибирование АТФазы ирумамицином **5** по сравнению с олигомицином и X14953В **6**. Действительно, было обнаружено, что  $IC_{50}$  всех трех соединений весьма схожи (ирумамицин –  $0.067 \pm 0.02$  мкМ, X –  $0.05 \pm 0.01$  мкМ, олигомицин –  $0.05 \pm 0.02$  мкМ), что указывает на то, что ирумамицин является мощным ингибитором дрожжевой  $F_1F_0$ -АТФазы.<sup>13</sup>

---

<sup>13</sup> Ингибирование АТФазы изучалось к.х.н. Пестовым Н.Б. (ИБХ РАН).

## **2.4 Выделение и установление структуры компонентов липогликопептидного антибиотического комплекса гауземицинов А,В**

Первичный скрининг выявил, что оригинальный штамм-продуцент *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980, изолированный в НИИНА им. Г.Ф. Гаузе более 40 лет назад, продуцирует перспективные соединения пептидной природы с антибактериальной активностью. Работы лаборатория мутагенеза и селекции продуцентов биологически активных соединений под руководством Лапчинской О.А. позволила существенно повысить продуктивность этого микроорганизма. Структурными исследованиями антибиотического комплекса до начала этой работы занимались лаборатории под руководством проф. Г.С. Катрухи и член-корр. РАН Нифантьева Н.Е., была показана пептидная природа антибактериальной фракции, тем не менее точная структура не была установлена и публикаций по этой теме не было. В рамках данной работы были установлены структуры двух индивидуальных компонентов антибиотического комплекса. Новый антибиотик был назван гауземицином (в честь советского микробиолога Г.Ф. Гаузе).

### **2.4.1 Выделение и очистка концентрата антибиотика**

После отделения антифунгальной фракции (см. Раздел 2.3), из экстракта культуральной жидкости штамма-продуцента получали нерастворимый в этилацетате остаток, обогащенный пептидными компонентами смеси.

Первично концентрат антибиотического комплекса из культуры *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980 был получен в результате сорбции на гидрофобной смоле Амберлит XAD-2 с последующим фракционированием с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе<sup>14</sup> и обращенно-фазовой хроматографии на сорбенте С18. Полученный таким образом концентрат представляет собой смесь нескольких компонентов пептидной природы с голубой флуоресценцией. После того, как эта смесь и ее компоненты были проанализированы и стало понятно, что антибиотический комплекс обладает высокой степенью структурной новизны и выраженной антибактериальной активностью, метод выделения и очистки было решено оптимизировать.

### **2.4.2. Анализ компонентного состава концентрата антибиотика**

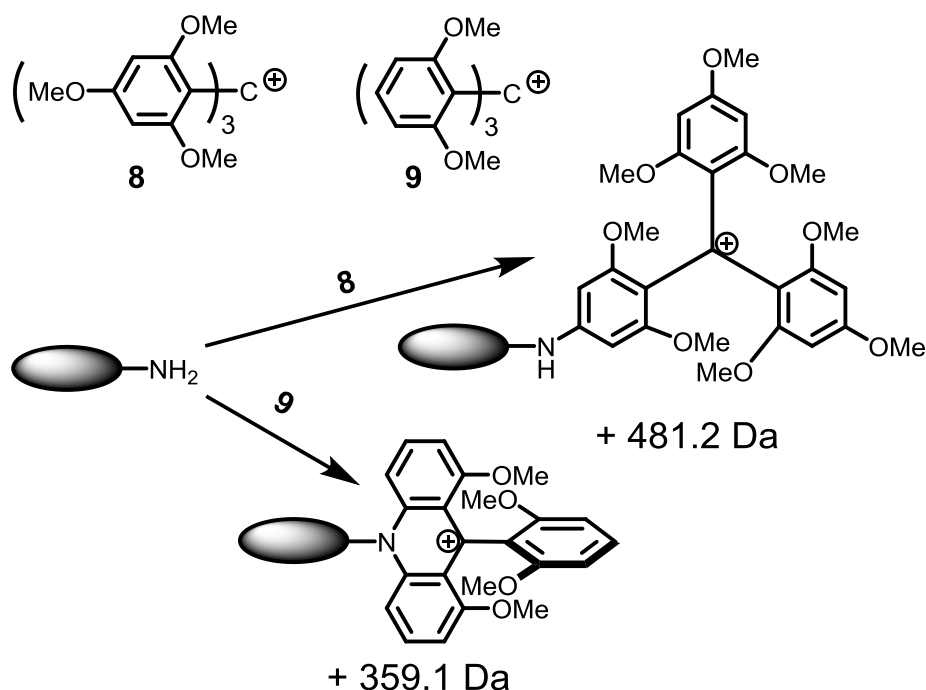
Для характеристики антибиотического комплекса и оценки его компонентного состава, в первую очередь использовали различные масс-спектрометрические методы. Концентрат антибиотика гауземицина, как оказалось, представляет собой сложную смесь

---

<sup>14</sup> Предварительные эксперименты осуществлялись с.н.с. Куляевой В.В. до начала этой работы (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе).

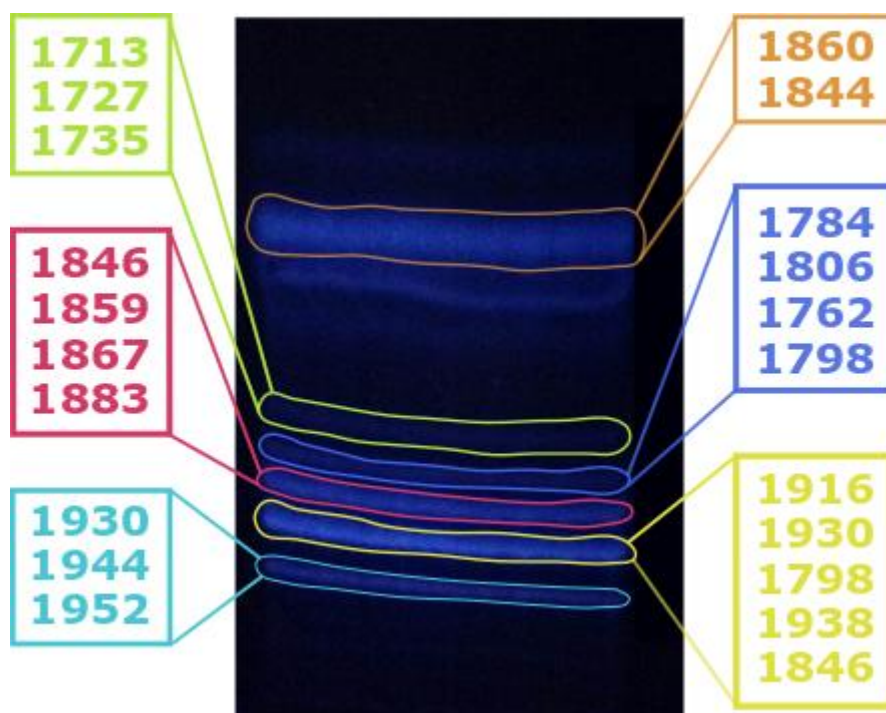
соединений, массы которых лежат в диапазоне 1650–1950 Да. Масс-спектры всей смеси оказались слишком сложными для интерпретации из-за близости масс пептидов и наложения масс ионов  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  и  $[M+K]^+$  различных компонентов смеси. Поэтому для получения информативных спектров использовали предварительное фракционирование. Для простоты здесь и далее все массы анализируемых соединений округлены до целых.

Гауземицины имеют характерную голубую флуоресценцию, позволяющую детектировать их с помощью тонкослойной хроматографии. Наилучшее разделение при использовании немодифицированного силикагеля достигалось при элюировании смесью 1-пропанол–вода 7:2. Фракции с препаративной ТСХ анализировали с помощью масс-спектрометрии. Для облегчения интерпретации спектров использовали дериватизацию масс-спектрометрическими метками, гексаметокситритильным и нонаметокситритильным катионами (Рис. 55) [238,239]. Этот подход позволяет получать заряженные производные анализируемых молекул вместо набора ионов с различными катионами.



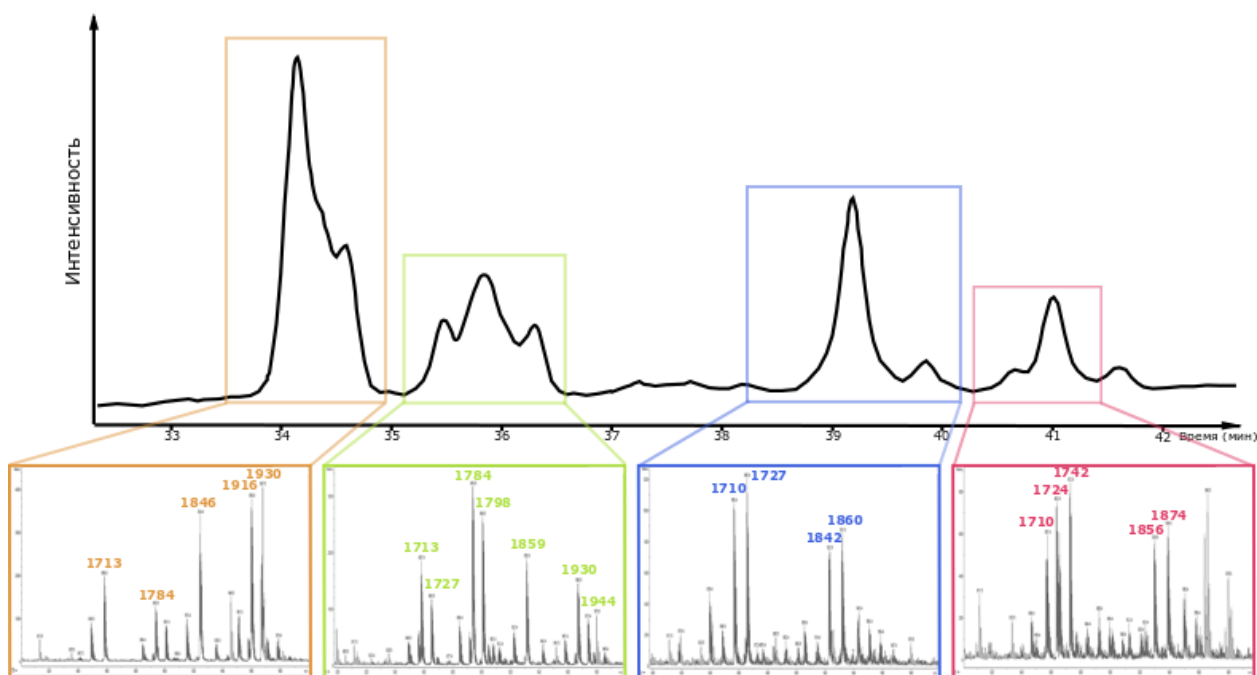
**Рис. 55.** Метод дериватизации первичных аминов масс-спектрометрическими метками.

На рисунке (Рис. 56) представлены основные массы компонентов, которые удалось обнаружить в масс-спектрах фракций с препаративной ТСХ. Отражены те компоненты, относительная интенсивность пиков в масс-спектре которых превышала 10%, однако фракции содержали также множество минорных компонентов.



**Рис. 56.** Препаративная ТСХ концентрата гауземицина на НРТСХ пластинах с немодифицированным силикагелем, длина 20 см, элюент 1-пропанол–вода 7:2. Детекция УФ 365 нм. Приведены основные компоненты, определенные на основе масс-спектров собранных фракций и их дериватизации.

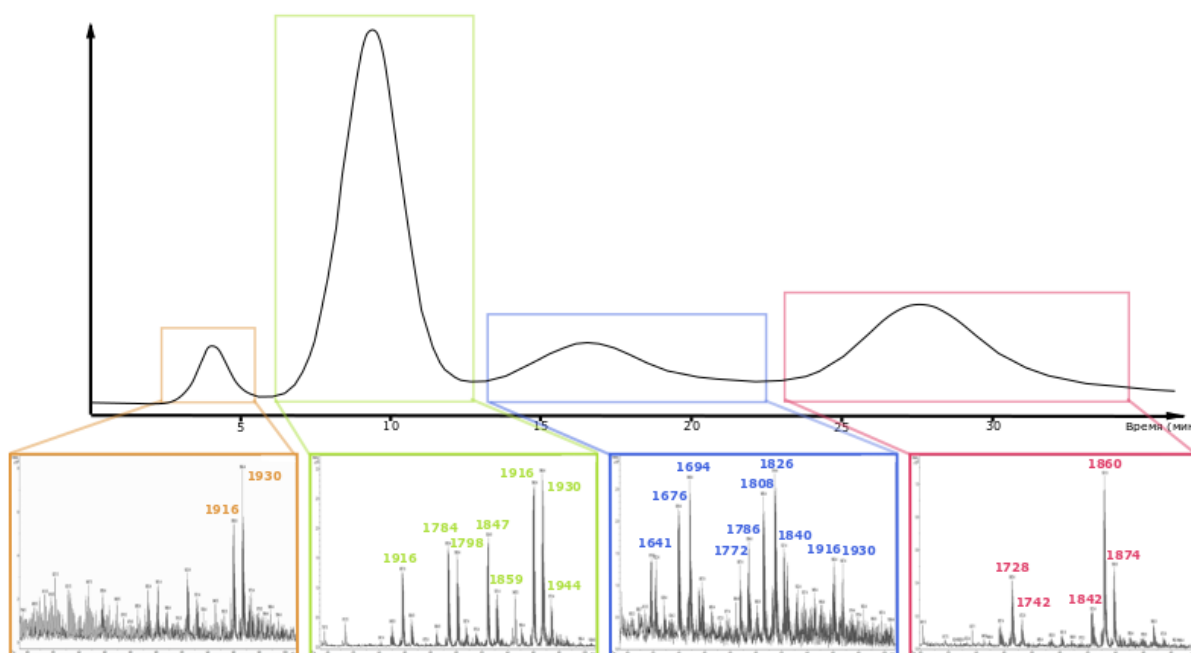
Следующим подходом к разделению и характеристике компонентов антибиотического комплекса являлась хроматомасс-спектрометрия на обращенно-фазовом сорбенте (С18), в результате которой в концентрате были обнаружены четыре группы пиков, заметно отличающихся по хроматографической подвижности (Рис. 57)



**Рис. 57.** Хроматомасс-спектрометрический анализ концентрата антибиотика гауземицина. Хроматограмма получена в линейном градиенте ацетонитрила

(0→100%), в масс-спектрах наблюдаются двухзарядные ионы ( $[M+2H]^{2+}$ ), на рисунке для простоты отображены соответствующие им массы незаряженных молекул, округленные до целых.

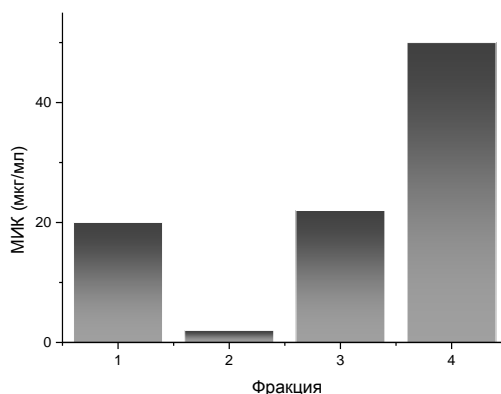
На основании пептидной природы исследуемых антибиотиков, их полярности и поведению в растворе, предположили наличие в боковых цепях гауземицинов ионогенных групп. Поэтому для разделения смеси была использована ионообменная хроматография. Разделение на слабом анионите в аналитических условиях позволило добиться разделения концентрата на четыре фракции. Фракции были собраны и проанализированы с помощью масс-спектрометрии (Рис. 58).



**Рис. 58.** Масс-спектрометрический анализ фракций, собранных с ионообменной хроматографии (полупрепаративная колонка 7.5x150 мм со слабым анионитом, градиент LiCl 0→25% за 25 мин, 25→80% за 5 мин).

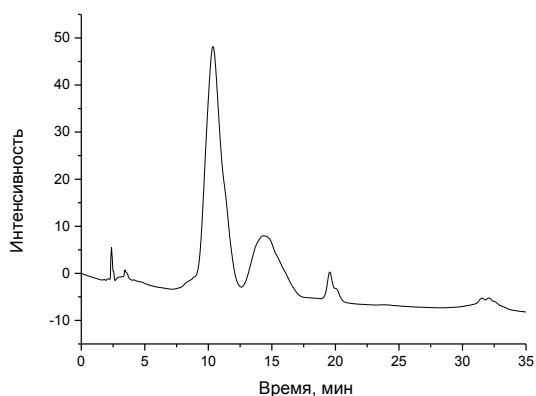
Из приведенных хроматограмм (Рис. 56, Рис. 57, Рис. 58) видно, что антибиотический комплекс содержит множество компонентов, причем различные физико-химические методы разделения приводят к совершенно разному распределению компонентов по фракциям. Для определения наиболее приоритетных компонентов, была оценена минимальная ингибирующая концентрация фракций с ионообменной хроматографии (Рис. 58) в отношении стафилококков. Из-за высокого содержания соли (LiCl) и компонентов буфера (BisTris) в результирующих фракциях, обессоливание представляло затруднительную задачу, поэтому полное обессоливание проводили для 2 фракции, а для остальных вводили нормировочные коэффициенты по поглощению при 360 нм.<sup>15</sup>

<sup>15</sup> Измерение биологической активности для гауземицинов проводилось в сотрудничестве с к.б.н. Грамматиковой Н.Э. (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе).



**Рис. 59.** Минимальная ингибирующая активность фракций с ионообменной хроматографии против стафилококка (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213).

Дальнейшее изучение антибиотика было сконцентрировано на компонентах, содержащихся во второй фракции на ионообменной хроматографии. Основными веществами в этой фракции являются вещества с массами 1916 и 1930 Да (отличие на 14 Да предполагает, что соединения являются гомологами), также существенно содержание компонентов с массой 1847, 1784 и 1798 Да (Рис. 58). Эти массы в случае обращенно-фазовой хроматографии локализованы в первой и второй группах пиков (Рис. 57). Выводы подтверждаются хроматограммами второй фракции с ионообменной смолы, полученными на обращенно-фазовой аналитической колонке (Рис. 60).



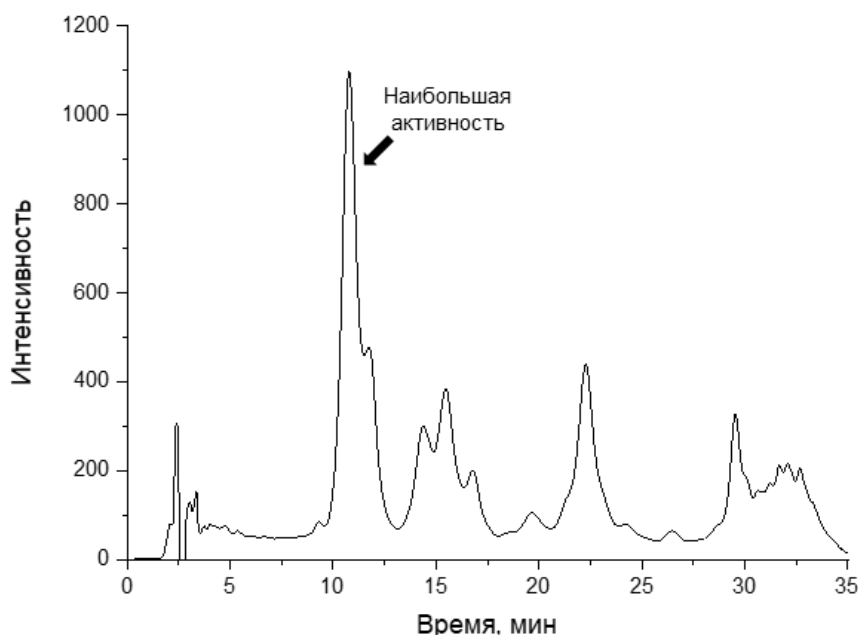
**Рис. 60.** Профиль обращенно-фазовой ВЭЖХ второй фракции с ионообменной смолы. Колонка Waters Sunfire C18 5 мкм, 4.6×250 мм; градиент буфера (1:4 1-пропанол–ацетонитрил с 0.1% ТФУ) в воде с 0.1% ТФУ за 36→42% за 25 мин, затем 42→64% за 5 мин и 64→35% за 5 мин.

На основании полученных данных было решено сосредоточить дальнейшие исследования на основных компонентах активной фракции, содержащихся в первой и второй группах пиков.



### 2.4.3. Фракционирование концентрата и выделение индивидуальных веществ

Как видно из данных фракционирования концентрата, антибиотический комплекс гауземицина весьма богат компонентами, их подвижность и распределение по фракциям при хроматографии на сорбентах разной природы меняется драматически. В результате подбора условий для хроматографии на ионообменной смоле было обнаружено, что для оптимального разделения требуется использование градиента ионной силы при постоянном значении рН. Полученные таким образом фракции содержали очень большое количество низкомолекулярных примесей, требующих трудоемких процедур для их удаления. Поэтому для масштабирования разделения и получения индивидуальных компонентов решено было использовать комбинацию гель-фильтрации (для удаления низкомолекулярных примесей), обращенно-фазовой хроматографии (для удаления смолы, наработки концентрата и отделения первой и второй групп пиков) и нормальнофазовой хроматографии (для разделения индивидуальных компонентов). На первых стадиях разделения контроль осуществлялся с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ, для которой были подобраны условия, обеспечивающие наилучшее разделение четырех групп пиков (Рис. 61).

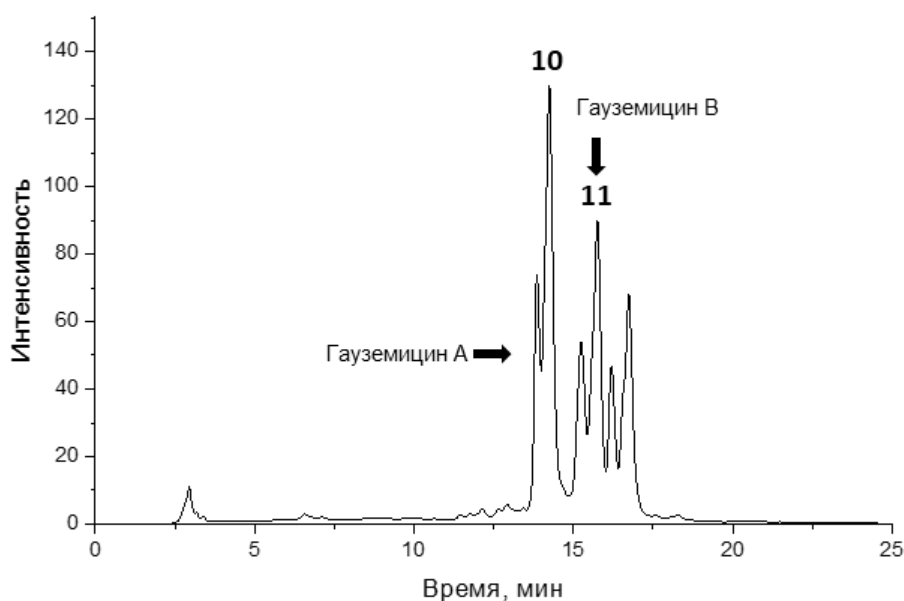


**Рис. 61.** Профиль обращенно-фазовой ВЭЖХ концентрата в оптимизированных условиях, колонка Waters Sunfire C18 5 мкм, 4.6×250 мм; градиент буфера (1:4 1-пропанол–ацетонитрил с 0.1% ТФУ) в воде с 0.1% ТФУ за 36→42% за 25 мин, затем 42→64% за 5 мин и 64→35% за 5 мин.

Для удаления низкомолекулярных примесей экстракт пропускали через картридж с Sephadex G15. При нанесении 12 г экстракта, в среднем удавалось получить 7 г смеси, содержащий антибиотический комплекс и высокомолекулярные гидрофобные примеси

(«смолу»). Собранные фракции содержали концентрат антибиотика гауземицина. Для обогащения смеси первой и второй группой пиков, наносили вещество меньшими порциями на картридж с силикагелем С18 меньшего диаметра и элюировали ступенчатым градиентом ацетонитрила в воде в нейтральных условиях. В результате этих операций удалось получить первую группу пиков и практически полностью удалить высокомолекулярные примеси. Дальнейшее разделение смеси методом обращенно-фазовой хроматографии затруднительно, так как даже в оптимизированных условиях компоненты практически не отделяются друг от друга.

Для наработки индивидуальных компонентов из первой группы пиков были подобраны условия для нормальнофазовой хроматографии. Согласно данным масс-спектрометрического анализа, эта фракция содержит три компонента – соединения с массами 1847, 1916 и 1930 Да.<sup>16</sup> Два основных компонента были выделены и названы гауземицинами А, В **10,11** (массы 1847 и 1916 Да). В оптимизированных условиях на нормальнофазовой ВЭЖХ наблюдалось удвоение пиков каждого из веществ (Рис. 62). Это предположительно связано с наличием различных конформеров, взаимопревращение которых затруднено.



**Рис. 62.** Профиль нормальнофазовой ВЭЖХ первой группы пиков с обращенной фазы, колонка колонку Waters (Силикагель, 5 мкм, 4,6×250 мм), градиент воды с 0.1% ТФУ в органическом элюенте (1:4 1-пропанол–ацетонитрил с 0.1% ТФУ) 5→25% за 20 мин.

<sup>16</sup> Текущий масс-спектрометрический контроль при наработке гауземицинов проводился в сотрудничестве с Чистовым А.А. (ИБХ РАН).

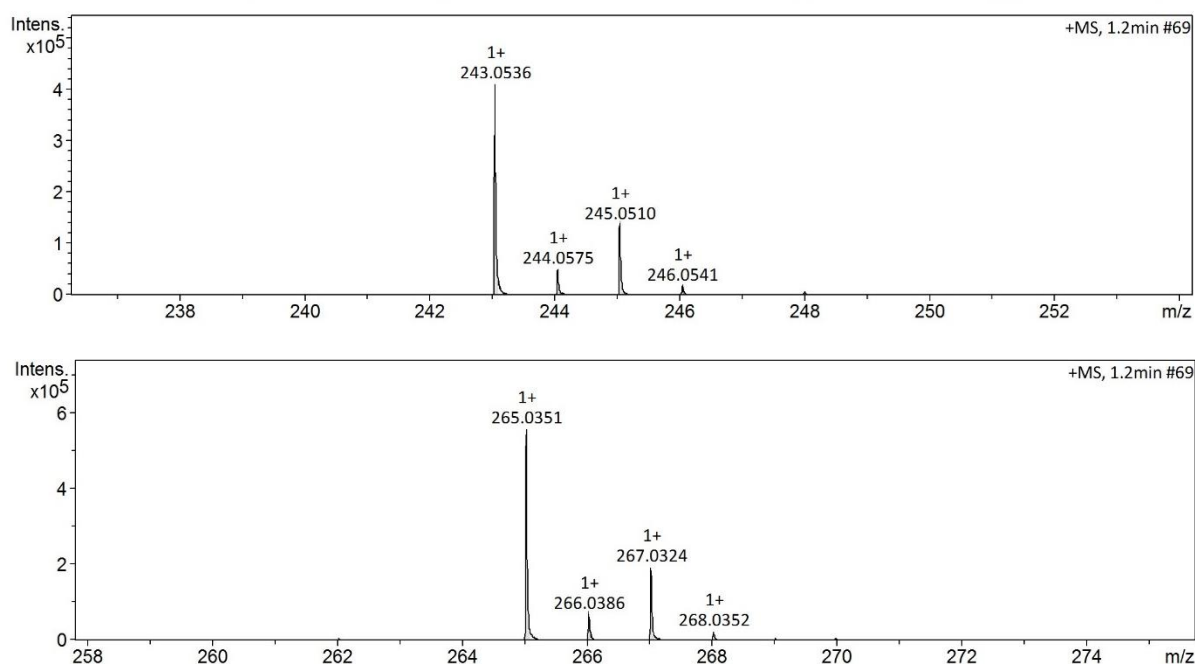
#### 2.4.4. Изучение аминокислотного состава и идентификация флуоресцентной аминокислоты L-4-хлоркинуренина

В результате исследования компонентного состава антибиотика было обнаружено, что все индивидуальные соединения имеют пептидную природу и обладают собственной флуоресценцией (Рис. 56). Для выяснения природы этой флуоресценции был изучен аминокислотный состав антибиотика.

Гидролиз антибиотического комплекса проводили по стандартному методу для гидролиза пептидов [240], заключающемуся в нагреве в 6М HCl в запаянной ампуле при 110°C в течение 120 ч. Флуоресцентная фракция была выделена с помощью препаративной ТСХ (в системе бутанол–ацетон–уксусная кислота 16:13:7). Затем эту фракцию разделяли методом оф-ВЭЖХ (линейный градиент ацетонитрила в 0.1% ТФУ от 10 до 50% за 30 мин), что позволило выделить флуоресцентную аминокислоту в индивидуальном виде. Масс-спектр высокого разрешения с этого соединения показал, что выделенное соединение имеет состав C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Наличие одного атома хлора в молекуле дополнительно подтверждается характерным изотопным распределением в масс-спектре, обусловленным природным содержанием <sup>35</sup>Cl и <sup>37</sup>Cl (Рис. 63). Рассчитанные формулы ионов и интенсивности пиков в спектре следующие: [C<sub>10</sub>H<sub>11</sub><sup>35</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, 243.0531 (100%); [C<sub>10</sub>H<sub>11</sub><sup>37</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, 245.0501 (32%); [C<sub>10</sub>H<sub>11</sub><sup>35</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+Na]<sup>+</sup>, 265.0350 (100%); [C<sub>10</sub>H<sub>11</sub><sup>37</sup>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+Na]<sup>+</sup>, 267.0321 (32%).<sup>17</sup>

---

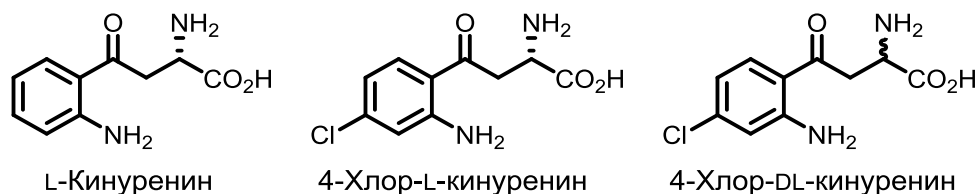
<sup>17</sup> Спектры HRMS хлоркинуренина регистрировались к.х.н. Сольевым П.Н. (ИМБ РАН)



**Рис. 63.** Изотопное распределение для ионов  $[M+H]^+$  (верхний) и  $[M+Na]^+$  (нижний) в спектре HRESIMS соединения  $C_{10}H_{11}ClN_2O_3$ , выделенного из кислотного гидролизата антибиотика гауземицина.

Если выделенное соединение является  $\alpha$ -аминокислотой  $H_2N-CHR-CO_2H$ , оно должно содержать боковой радикал R, имеющий состав  $C_8H_7ClNO$  и 5 степеней ненасыщенности. Учитывая наличие голубой флуоресценции, предположили, что соединение имеет структуру хлор-замещенного кинуренина (Рис. 64).

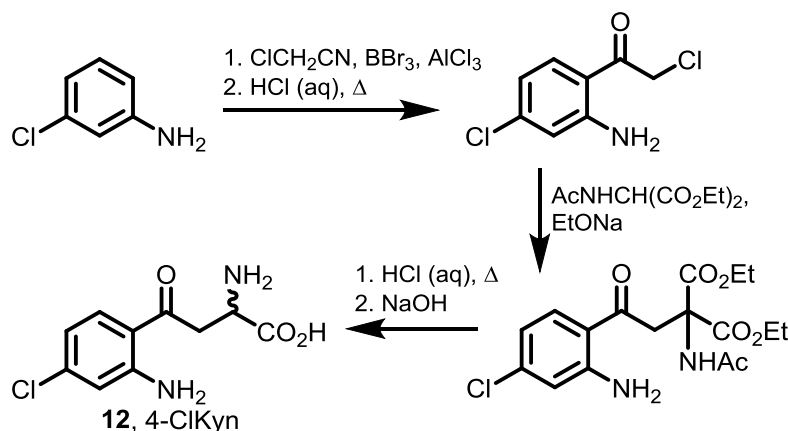
L-Кинуренин – метаболит триптофана, способный проникать через гематоэнцефалический барьер и играющий важную роль в живых организмах [241,242]. Даптомицин и его аналоги – хорошо изученные L-кинуренин-содержащие пептиды [24,243,244]. Недавно было обнаружено, что L-кинуренин входит в состав небольших циклопептидов, названных нидуланинами [245] и пептидов против протеина ВИЧ [246]. Интересно, что единственный D-кинуренин-содержащий природный пептид, дискодермин E, был выделен 25 лет назад [247].



**Рис. 64.** Структурные формулы кинуренина его хлор-замещенных аналогов.

4-Хлор-L-кинуренин (Рис. 64) был ранее обнаружен только в одном природном пептиде – таромицине [41,51]. Синтетический 4-хлор-DL-кинуренин был описан как соединение, в 80 раз более сладкое, чем сахароза [248]. Тем не менее, флуоресцентные

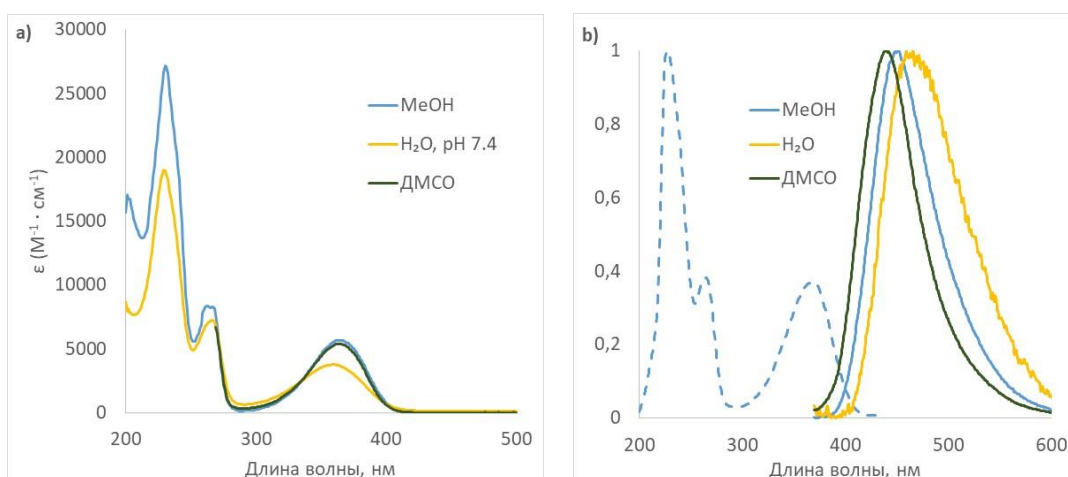
свойства L-4-ClKyn или DL-4-ClKyn ранее не сообщались ни для синтетических, ни для встречающихся в природе соединений. Поэтому было решено синтезировать эту аминокислоту, чтобы исследовать ее флуоресцентные свойства. Рацемический 4-ClKyn был получен (Рис. 65) в соответствии с ранее описанным подходом [249].



**Рис. 65.** Схема синтеза 4-хлоркинуренина

Синтетический 4-ClKyn и выделенное соединение C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> имеют одинаковые спектры флуоресценции и время удерживания на ВЭЖХ. Используя метод Мерфи [250,251], была определена стереоконфигурация аминокислоты, полученной из гидролизата. Синтетический рацемический 4-ClKyn был использован в качестве стандартного соединения в методе Мерфи, чтобы установить абсолютную конфигурацию природного соединения. Согласно предыдущим данным, производное D-хлоркинуренина с реагентом Мерфи L-FDAA удерживается на ВЭЖХ дольше, чем производное L-аминокислоты [41]. Время удерживания производных природных и синтетических образцов 4-ClKyn выявило L-конфигурацию природного соединения. Этот результат согласуется с конфигурациями как 4-ClKyn в таромицине А [41], так и негалогенированного Kyn в даптомицине [24].

Затем были изучены спектральные и фотофизические свойства синтетического 4-ClKyn в различных растворителях (Рис. 66) и сравнили их с литературными значениями для нехлорированного кинуренина Kyn [252].



**Рис. 66.** Спектры 4-хлоркинурина в различных растворителях: а) UV-Vis спектр; б) нормализованный спектр возбуждения (пунктирная линия) и спектр флуоресценции, с  $5 \cdot 10^{-5}$  М,  $\lambda_{em}$  для возбуждения 448 нм,  $\lambda_{ex}$  для испускания 360 нм

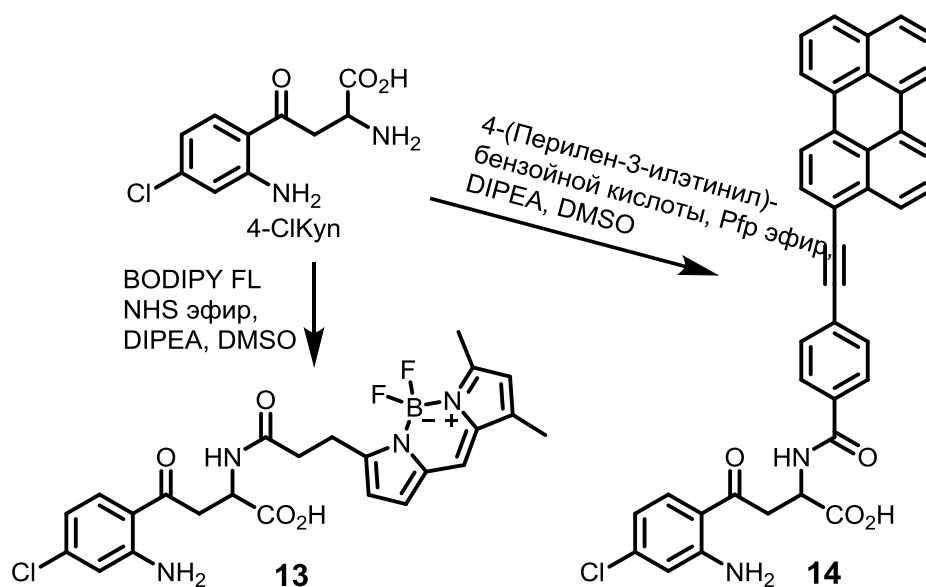
4-ClKyn имеет широкую полосу поглощения около 360 нм, очень похожую на Kyn. Напротив, максимумы эмиссии 4-ClKyn во всех растворителях составляют смещение примерно на 20 нм по сравнению с флуоресценцией Kyn, хотя сольватохромные эффекты растворителя на излучение 4-ClKyn или Kyn аналогичны (Таблица 13). Примечательно, что квантовый выход флуоресценции всегда выше для 4-ClKyn по сравнению с Kyn, с той же тенденцией влияния полярности растворителя.

Таблица 13. Некоторые спектральные и фотофизические свойства 4-ClKyn и их сравнение со свойствами Kyn

Вещество	Растворитель	UV/Vis $\lambda_{max}$ , нм ( $\epsilon$ , $M^{-1}cm^{-1}$ )	Испускание $\lambda_{max}$ , нм	$\Phi$ , %
4-ClKyn	H <sub>2</sub> O, pH 7.4	359 (3800)	468	0.15
	MeOH	365 (5700)	452	4.5
	DMSO	364 (5400)	440	13
Kyn [252]	H <sub>2</sub> O, pH 6.6	361 (4850)	500	0.082
	MeOH	367 (6100)	474	0.79
	DMSO	368 (6500)	461	9.0

Слабое поглощение 4-ClKyn хромофора и умеренные значения квантового выхода флуоресценции приводят к довольно низкой яркости флуоресценции по сравнению с обычными флуоресцентными красителями. Для дальнейшей оценки потенциала флуоресценции 4-ClKyn были получены конъюгаты 4-ClKyn с флуоресцентными акцепторами. В качестве акцепторов были выбраны яркие флуоресцентные молекулы, BODIPY FL и 3-фенилэтинилперилен (PEPe), поглощение которых значительно перекрывается с флуоресценцией 4-ClKyn. Аминокислоту ацилировали активированным красителем (в

виде оксисукцинимидного или пентафторфенилового эфира)<sup>18</sup>, получая конъюгаты BODIPY FL и PEPE **13** и **14** соответственно (Рис. 67).



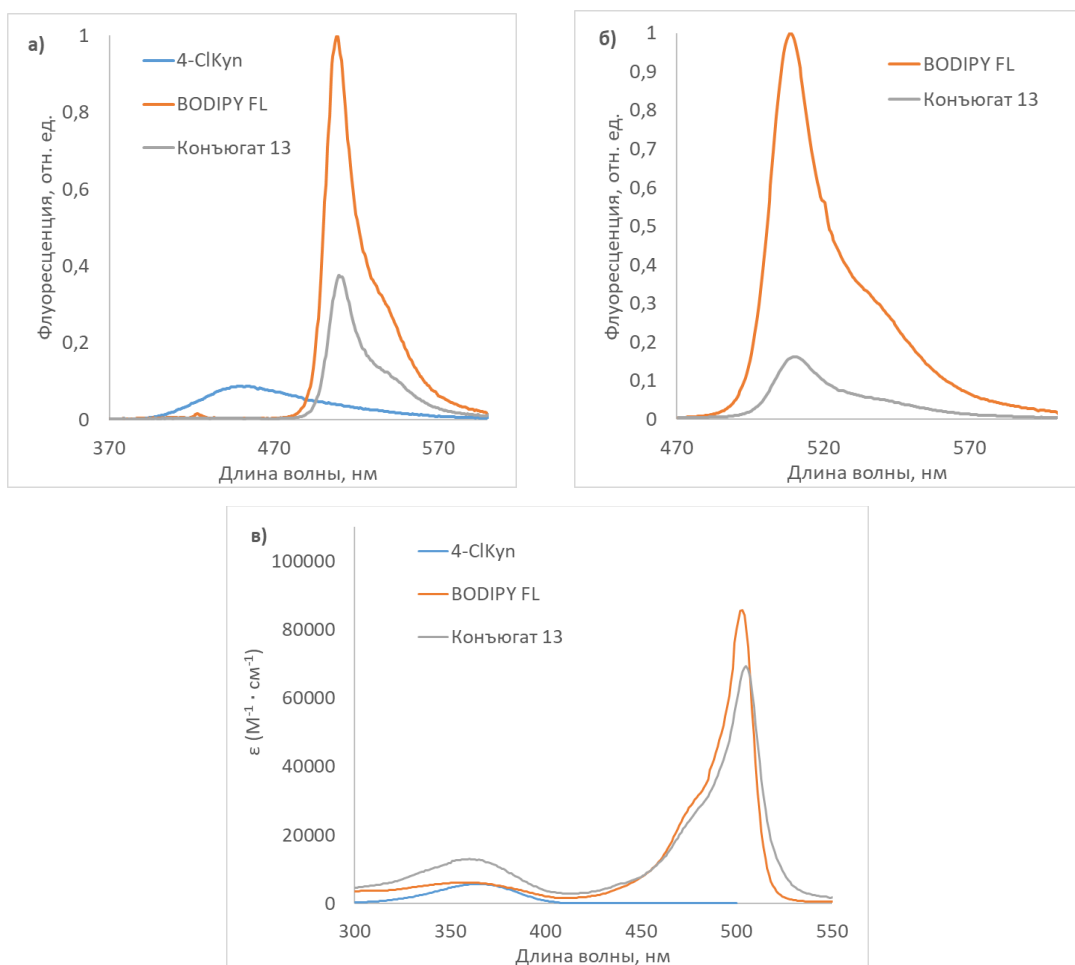
**Рис. 67.** Синтез FRET-конъюгатов **13** и **14** с флуоресцентными акцепторами

В случае BODIPY FL конъюгата **13** при возбуждении при 360 нм остаточной флуоресценции 4-ClKyn не наблюдалось, что свидетельствует об эффективном FRET (Рис. 68a). Однако в конъюгате в сравнении с исходным красителем BODIPY наблюдалось значительное гашение флуоресценции акцептора: когда излучение возбуждается при 450 нм: яркость флуоресценции BODIPY FL убывает приблизительно в 6 раз в конъюгате по сравнению с красителем (Рис. 68b). Таким образом, 4-ClKyn служит эффективным гасителем флуоресценции для BODIPY.

Наиболее распространенными механизмами тушения флуоресценции флуорофоров на основе BODIPY, являются фотоиндуцированный перенос электронов, photoinduced electron transfer (PET) и фотоиндуцированный внутримолекулярный перенос заряда, photoinduced intramolecular charge transfer (ICT) [253]. Наиболее заметное различие между этими механизмами заключается в отсутствии выраженных спектральных сдвигов в случае тушения флуоресценции по механизму PET. Гашение флуоресценции соединения **13** не сопровождалось каким-либо смещением излучения (Рис. 68), таким образом, PET является наиболее вероятной причиной снижения флуоресценции. Тем не менее, возбуждение при максимуме возбуждения 4-ClKyn флуорофора (360 нм) приводит к частичной компенсации гашения флуоресценции BODIPY (интенсивность флуоресценции уменьшается в 2.6 раза) за счет передачи резонансной энергии и полного от-

<sup>18</sup> Пентафторфениловый эфир 4-(периллен-3-илэтинил)бензойной кислоты предоставлен Проскуриным Г.В. (ИБХ РАН)

сутствия донорной флуоресценции в результирующем спектре (Рис. 68а). Спектр поглощения конъюгата **13** по сравнению со спектром поглощения исходного красителя BODIPY FL показывает небольшую разницу в  $\lambda_{\text{max}}$ : 505 нм против 503 нм, соответственно, наряду со значительным падением оптической плотности:  $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) 69 000 против 86 000 (Рис. 68с). Это подтверждает некоторое слабое взаимодействие основного состояния между красителями в конъюгате **13**, например, это возможно за счет формирования *J*-агрегата [254]. Действительно, линкер между модулями ClKyn и BODIPY в **3** довольно гибкий и подходящий для их укладки.

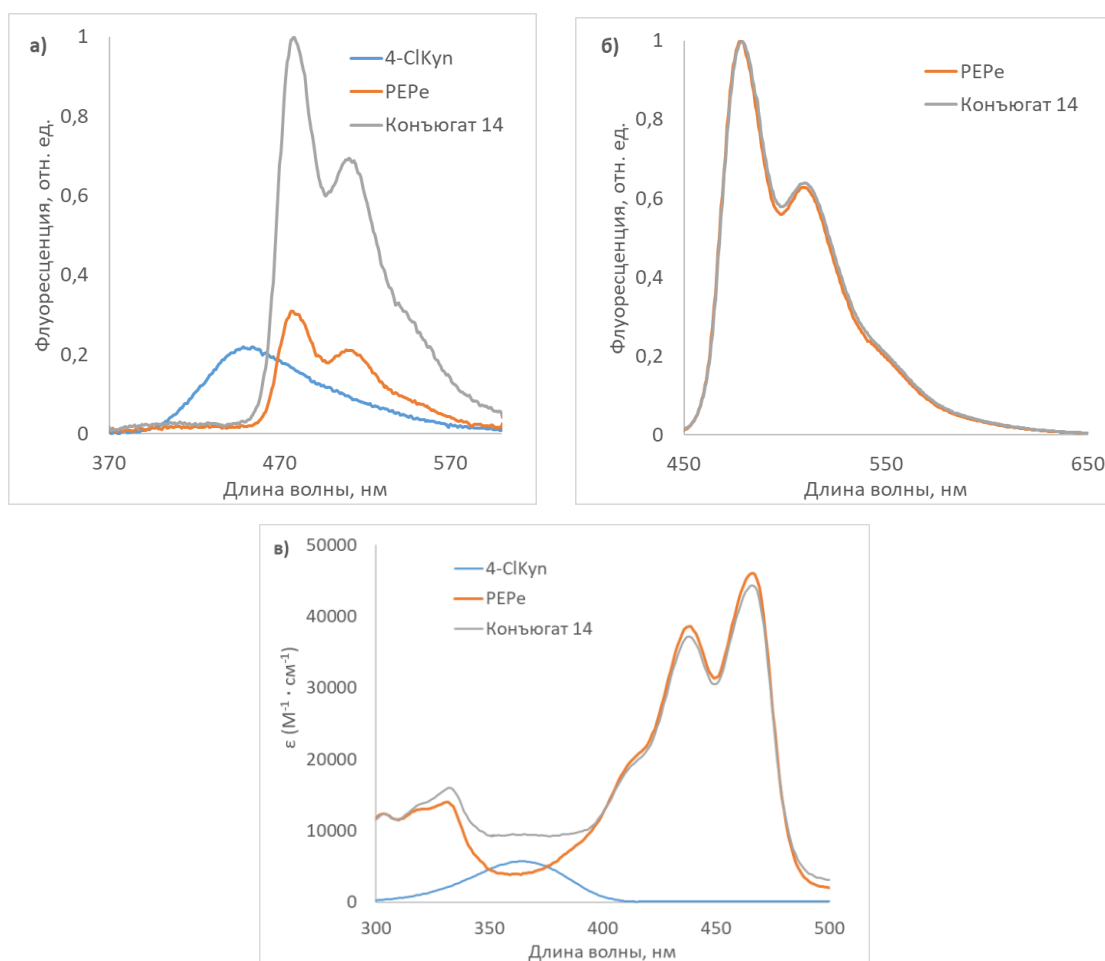


**Рис. 68.** Спектральные данные 4-ClKyn, BODIPY амида и конъюгата **13**, с  $6 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  в MeOH: сравнительные спектры флуоресценции а)  $\lambda_{\text{ex}} 360 \text{ nm}$ ; б)  $\lambda_{\text{ex}} 450 \text{ nm}$ ; в) спектры поглощения флуорофоров и конъюгата **13**

Спектры флуоресценции конъюгата **14** также указывают на эффективную передачу энергии от донора (4-ClKyn) к акцептору (PERe): эмиссии 4-ClKyn в конъюгате не наблюдается. Флуоресценция PERe в конъюгате значительно усиливается при возбуждении при 360 нм (Рис. 69а). Действительно, флуоресценция PERe не зависит от остатка 4-ClKyn при возбуждении при 440 нм (Рис. 69б). Этот факт свидетельствует о том, что



PEPe является перспективной флуоресцентной меткой для дальнейших исследований пептидных антибиотиков, содержащих 4-ClKyn.



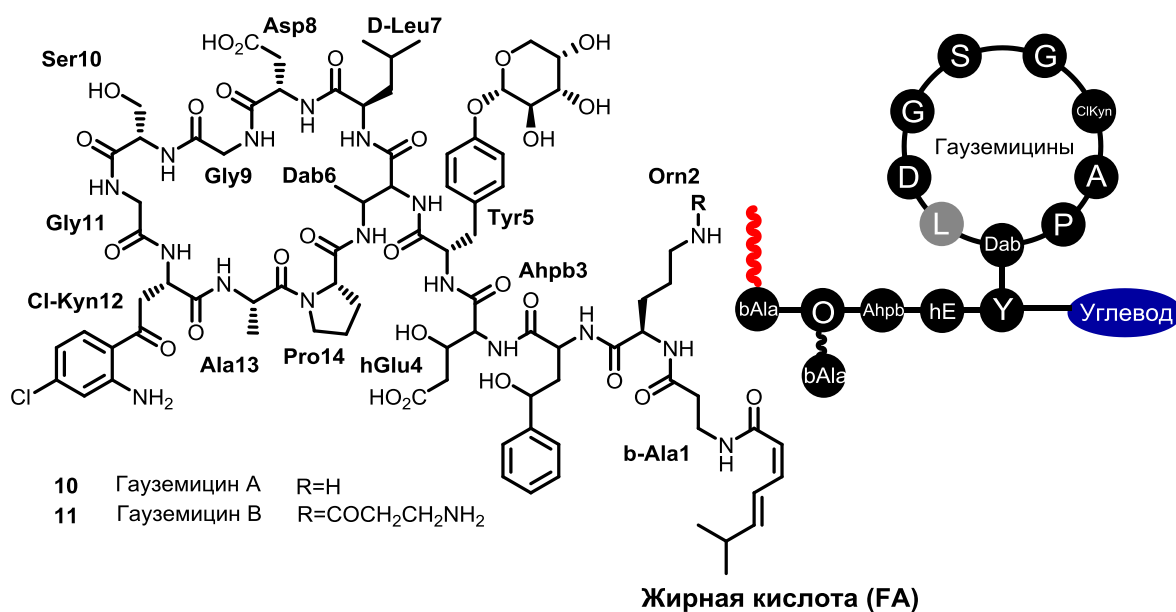
**Рис. 69.** Спектральные данные 4-ClKyn, PEPe амида и конъюгата **14**, с  $4 \cdot 10^{-7}$  M в MeOH: сравнительные спектры флуоресценции а)  $\lambda_{ex}$  360 нм; б)  $\lambda_{ex}$  440 нм; в) спектры поглощения флуорофоров и конъюгата **14**

Синтез флуоресцентных конъюгатов с подходящими акцепторами FRET пептидных антибиотиков дает возможность использовать информативные методы благодаря повышенной флуоресценции. Например, олигомеризация даптомицина была успешно изучена с использованием конъюгата антибиотика с FRET-акцептором [255,256].

#### 2.4.5. Установление структуры индивидуальных гауземицинов А,В с помощью ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии

В результате применения разработанного подхода, состоящего из ряда хроматографических стадий, удалось получить индивидуальные гауземицины А и В в количествах, достаточных для физико-химической характеристики. 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  $C_{84}H_{116}ClN_{17}O_{28}$  ( $m/z$  1845.788, расчет 1845.786, 1.1 ppm) и

$C_{87}H_{121}ClN_{18}O_{29}$  ( $m/z$  959.41873, расчет 959.41905, 0.3 ppm), соответственно. Структуры гауземицинов А,В (**Рис. 70**) были определены из данных ЯМР-спектроскопии, измеренных в  $DMSO-d_6$  при 30 и 45°C.<sup>19</sup> Корректность определения состава компонентов подтверждена определением тонкой изотопной структуры для гауземицина В (Приложение 11).

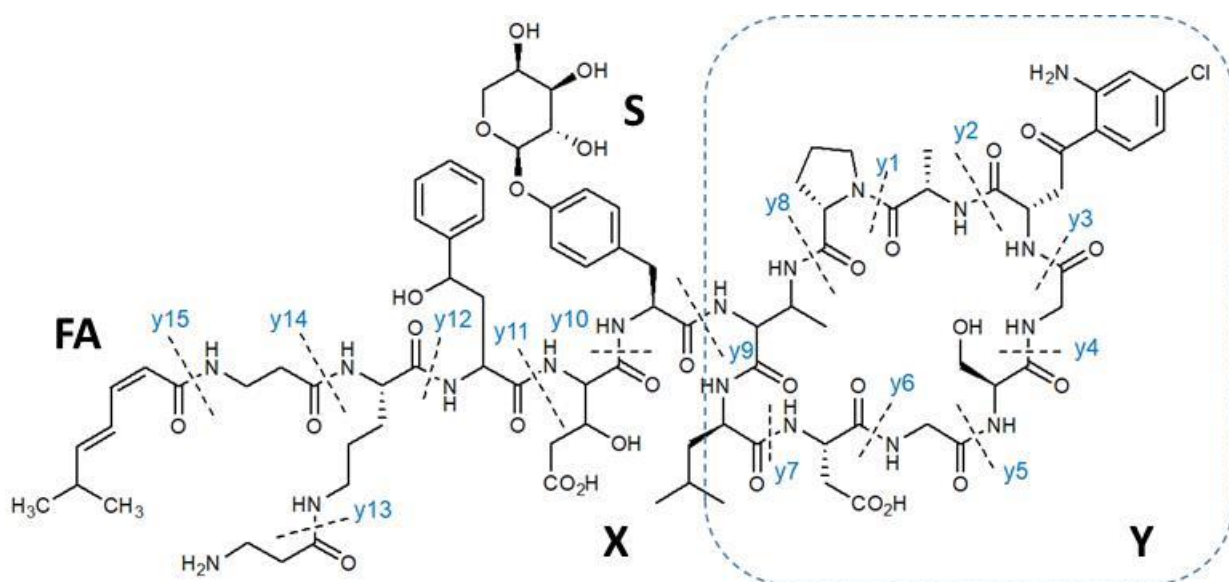


**Рис. 70.** Структуры индивидуальных компонентов антибиотического комплекса – гауземицинов А (**10**) и В (**11**).

Аминокислотный состав и предполагаемая структура подтвердились с помощью спектров масс-фрагментации. Метод MS/MS FTICR<sup>20</sup> позволяет проверять структуру соединений с использованием CID-фрагментации родительского иона с идентификацией аминокислотной последовательности и необычных заместителей по точной массе. Автоматический подход, используемый в нисходящей протеомике, нельзя было использовать из-за присутствия особых структурных фрагментов, в частности, циклического пептида. Предлагаемая фрагментация гауземицина В представлена ниже. Участки в пептидных связях, которые подвергаются фрагментации под действием CID, выделены пунктирными линиями. Ожидалась типичная картина у-фрагментации.

<sup>19</sup> Регистрация спектров ЯМР и интерпретация конформационного состава гауземицинов проводилась д.ф.-м.н. Шенкаревым З.О. и к.ф.-м.н. Парамоновым А.С. (ИБХ РАН).

<sup>20</sup> Спектры FTICR и фрагментации гауземицина В зарегистрированы к.х.н. Жеребкером А.С. (Сколтех).



**Рис. 71.** Фрагментация гауземидина **11**. X соответствует целой молекуле, Y – ее циклическому фрагменту; FA, S соответствуют олефиновому и углеводному фрагментам соответственно. Пунктирные линии указывают места фрагментации в MS/MS.

Фрагментация проводилась в столкновительной ячейке при различных напряжениях (Таблица 14). Практически полная структура может быть проверена с помощью эксперимента MS/MS. При низких энергиях обнаружено разделение циклических и линейных фрагментов. Удаление углеводного фрагмента происходило при 10 эВ. Фрагментация циклического фрагмента наблюдается только при высокой энергии столкновения. Расщепление цикла может происходить почти по любой пептидной связи, но в основном цикл расщепляется по связи пролин-аланин (y8-y1). Дальнейшая идентификация последовательности по точной массе фрагмента и разнице масс позволила подтвердить предложенную структуру (Рис. 70).

Таблица 14. ESI-MS/MS данные для соединения **11** ( $m/z$ ,  $[M+2H]^{2+}=959.41873$ ). фрагментация (CV = 10-40 eV) и структурное отнесение

Масса фрагмента, $m/z$	CV	Молекулярная формула	Заряд, $z$	Родительский ион, $m/z$	$\Delta M$ , Да	Отщепленный фрагмент	Структурное отнесение
959.41814	0 eV	$C_{87}H_{123}Cl_1N_{18}O_{29}$	2				X=[M+2H]
950.41295	10 eV		2	959.41818	18.01046	H <sub>2</sub> O	[X-H <sub>2</sub> O]
893.39710	10 eV		2	959.41818	132.04216	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	[X-S]
701.34925	25 eV	C <sub>34</sub> H <sub>49</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub>	1				[X-Y-y10]
683.33940	25 eV	C <sub>34</sub> H <sub>47</sub> N <sub>6</sub> O <sub>9</sub>	1	701.34925	18.00985	H <sub>2</sub> O	[X-Y-y10-H <sub>2</sub> O]
556.31265	25 eV	C <sub>29</sub> H <sub>42</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	1	683.33940	127.02675	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	[X-Y-y10-y11]
538.30171	25 eV	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	1	556.31265	18.01094	H <sub>2</sub> O	[X-Y-y10-y11-H <sub>2</sub> O]
379.23335	25 eV	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	1	556.31265	177.07930	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	[X-Y-y10-y11-y12]
665.32861	30 eV	C <sub>34</sub> H <sub>45</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	1	683.33965	18.01104	H <sub>2</sub> O	[X-Y-y10-2H <sub>2</sub> O]
308.19620	30 eV	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	1	379.23339	71.03719	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO	[X-Y-y10-y11-

							y12-y13]
1085.44421	30 eV	C <sub>48</sub> H <sub>66</sub> Cl <sub>1</sub> N <sub>12</sub> O <sub>15</sub>	1	922.38131	163.06390	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	[Y+y10-S]
Фрагментация циклопептидного фрагмента							
922.38131	40 eV	C <sub>39</sub> H <sub>57</sub> Cl <sub>1</sub> N <sub>11</sub> O <sub>13</sub>	1				Y
904.37063	40 eV	C <sub>39</sub> H <sub>55</sub> Cl <sub>1</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	1	922.38131	18.01068	H <sub>2</sub> O	Y-H <sub>2</sub> O
851.34448	40 eV	C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> Cl <sub>1</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	1	922.38131	71.03683	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO	Y-y1
627.30942	40 eV	C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> N <sub>8</sub> O <sub>10</sub>	1	851.34448	224.07548	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Y-y1-y2
570.28766	40 eV	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> N <sub>7</sub> O <sub>9</sub>	1	627.30942	57.02176	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NO	Y-y1-y2-y3
483.25553	40 eV	C <sub>21</sub> H <sub>35</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>	1	570.28766	87.03213	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Y-y1-y2-y3-y4
426.23418	40 eV	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	1	483.25553	57.02135	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NO	Y-y1-y2-y3-y4-y5
382.24483	40 eV	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>		426.23418	43.98935	CO <sub>2</sub>	Y-y1-y2-y3-y4-y5- CO <sub>2</sub>
311.20666	40 eV	C <sub>15</sub> H <sub>27</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	1	426.23418	115.02752	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	Y-y1-y2-y3-y4-y5- y6

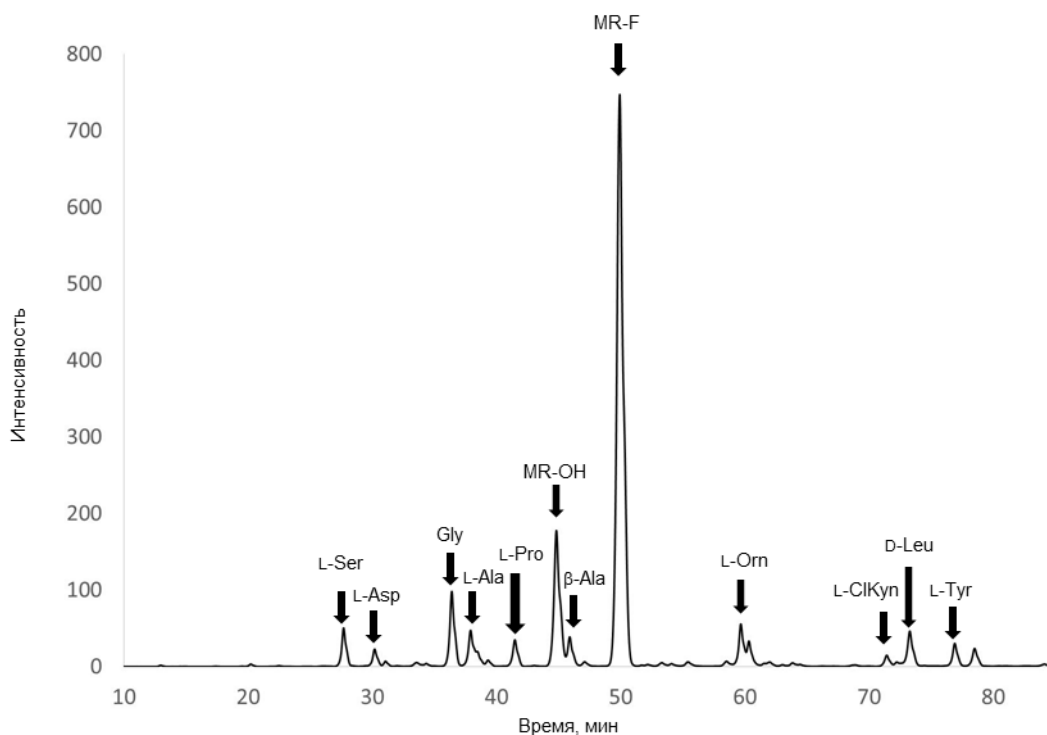
Дериватизация продуктов гидролиза индивидуальных компонентов по методу Мерфи позволила установить абсолютные конфигурации большинства аминокислотных остатков (Таблица 15). Время удерживания производных аминокислот различной конфигурации устанавливали на стандартных образцах аминокислот.

Таблица 15. Анализ продуктов гидролиза гауземицина дериватизацией реагентом Мерфи. Колонка Waters Sunfire C18 5 мкм, 4.6×250 мм; градиент ацетонитрила в буфере (0.1 М NH<sub>4</sub>OAc/TFA с рН 3.0) 10→50% в течение 90 мин, скорость потока 1 мл/мин. Детекция при 340 нм.

Аминокислота	RT L-изомера, мин	RT D-изомера, мин	RT для образца гауземицина (среднее, коррекция по внутреннему стандарту), мин
Ser	27.87	30.53	27.70
Asp	30.15	34.39	30.21
Gly	36.69		36.43
Ala	37.85	46.62	37.93
Pro	41.49	46.26	41.49
β-Ala	46.01		45.91
Orn	59.88	56.05	59.69
ClKyn	71.54	78.88	71.44
Leu	63.25	73.56	73.31
Tyr	76.53	81.62	76.93

2-Амино-4-гидрокси-4-фенилмасляная кислота (Ahrb3) и гидроксиглутаминовая кислота (hGlu4) разлагались в условиях кислотного гидролиза (6М HCl, 110°C, 120 ч), другие аминокислоты дают нормальные продукты дериватизации (Рис. 72). D-конфигурация была идентифицирована только для остатка Leu7. На хроматограмме наблюдаются неидентифицированные пики с временем удерживания 60.37 мин и 78.55 мин, предположительно являющиеся продуктом реакции реагента Мерфи с диаминобутановой кислотой Dab6 и продуктами разложения Ahrb3 соответственно. Масс-

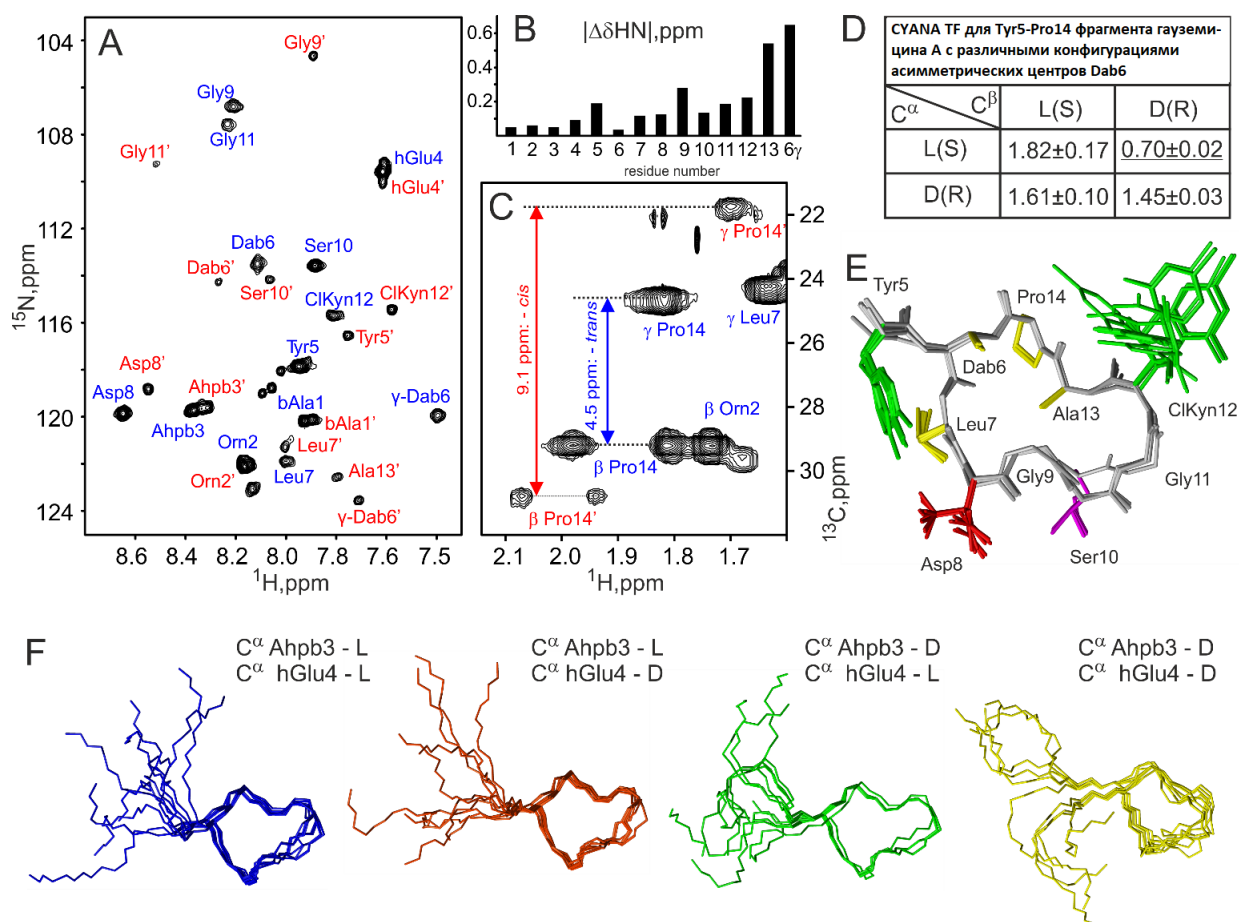
спектрометрический анализ деривата концентрата гауземицина (Приложение 12) показал наличие пика с массой производного Dab в области времени удерживания, близкой к Orn, что подкрепляет эту гипотезу. В гидрофобной области хроматограммы не было зарегистрировано масс, соответствующих производным аминокислот. Наличие для каждой аминокислоты только одного пика на извлеченной хроматограмме ионного тока по массе производного в деривате гидролизата концентрата говорит о том, что вероятнее всего для гауземицинов не характерна изомерия конфигурации аминокислот.



**Рис. 72.** Хроматограмма деривата гидролизата концентрата гауземицина.

L-Конфигурация фрагмента арабинозы была идентифицирована с помощью слабого кислотного гидролиза (2M TFA, 50°C, 6 ч) гауземицина А и последующего сравнения оптического вращения изолированного материала с D- и L-арабинозой.

Окончательное подтверждение структуры проводилось на основании данных ЯМР (Приложение 13). Характерный паттерн сигналов в спектрах 2D TOCSY, NOESY и естественного содержания  $^{15}\text{N}$ -HSQC (Рис. 73А) подтвердил присутствие пептидного фрагмента в гауземицине А. Спиновые системы отдельных остатков и соответствующие типы остатков были идентифицированы в спектрах  $^{13}\text{C}$ -HSQC 2D TOCSY, COSY естественного содержания. Также использовалась информация из спектров  $^{13}\text{C}$ -HMBC и  $^{13}\text{C}$ -HSQC.



**Рис. 73.** ЯМР-исследование гауземидина А. (А) Спектр  $^{15}\text{N}$ -HSQC гауземидина А в  $\text{DMSO-d}_6$  ( $45^\circ\text{C}$ , 800 МГц, естественное содержание). Сигналы основной и второстепенной форм (Ala13-Pro14 - *транс* и *цис*) отмечены синим и красным соответственно. (В) Разница в химических сдвигах  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ( $|\Delta\delta\text{HN}| = \sqrt{(\Delta\delta\text{H})^2 + (\Delta\delta\text{N}/5)^2}$ ) амидных групп гауземидина А между основной и второстепенной формами. (С) Фрагмент спектра  $^{13}\text{C}$ -HSQC естественного содержания. Различие в химических сдвигах  $^{13}\text{C}$  для групп  $\text{C}\beta\text{H}_2$   $\text{C}\gamma\text{H}_2$  Pro14 подтверждает отнесение основной и минорной форм к *транс*- и *цис*-изомерам пептидной связи Ala13-Pro14 соответственно. (D) Расчет пространственной структуры фрагмента Tyr5-Pro14 основной формы гауземидина с четырьмя возможными абсолютными конфигурациями остатка Dab6. Более низкие значения целевой функции CYANA (среднее  $\pm$  стандартное отклонение) указывают на то, что конфигурация L/R ( $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$ ) лучше соответствует данным ЯМР. (E) Набор из 10 лучших структур фрагмента Tyr5-Pro14 гауземидина А с L/R конфигурацией остатка Dab6. Показаны только тяжелые атомы. Ароматические, гидрофобные, отрицательно заряженные и полярные боковые цепи показаны зеленым, желтым, красным и пурпурным соответственно. Группа  $\alpha$ -арабинозы, присоединенная к Tyr5, в расчетах не учитывалась. (F) Каркасное представление наборов полноразмерных структур гауземидина А (основная форма), рассчитанных с различными абсолютными конфигурациями атомов  $\text{C}\alpha$  в остатках Ahrb3 и hGlu4. В каждом случае показаны десять лучших структур. Группа жирных кислот не указана. Для каждой молекулы гауземидина наблюдали два набора сигналов ЯМР с соотношением интенсивностей  $\sim 2:1$ . Это, вместе с обменными кросс-пиками, наблюдаемыми в 2D спектрах NOESY (время перемешивания  $\tau_m = 200\text{--}400$  мс), выявило конформационную гетерогенность гауземидина А в растворе. Процесс обмена между двумя структурными формами идет с характерным временем около 0.1 с.

Последовательные связи между отдельными спин-системами были установлены с помощью кросс-пиков  $\text{HN}_i-1 - \text{HN}_i$ ,  $\text{HC}\alpha_i-1 - \text{HN}_i$  и/или  $\text{HC}\beta_i-1 - \text{HN}_i$ , наблюдаемых в спектрах NOESY. Некоторые межостаточные связи были дополнительно подтверждены кросс-пиками в спектрах  $^{13}\text{C}$ -HMBC. Сигнал  $\text{HN}\gamma$  дополнительной боковой цепи в области амидных протонов выявил присутствие остатка 2,3-диаминомасляной кислоты (2,3-Dab или Dab). Характерные контакты NOE между боковыми цепями Dab6 и Pro14 показали макроциклическую структуру в полипептидном фрагменте гауземицина А. 9-членный цикл (Dab6-Pro14) замкнут связью между амидной группой боковой цепи Dab6 и Pro14 (Рис. 70). N-концевая часть (от  $\beta\text{Ala}1$  до Tug5) полипептидного фрагмента является линейной.

Разница в химическом сдвиге  $^1\text{H}$  и  $^{15}\text{N}$  амидных групп основной цепи и боковой цепи между двумя конформационными изоформами гауземицина А увеличивалась в сторону Pro14 (Рис. 73В). Следовательно, соответствующий обменный процесс может быть вызван *транс-цис*-изомеризацией пептидной связи Ala13-Pro14. Действительно, наблюдаемые различия в химических сдвигах  $^{13}\text{C}\beta$  и  $^{13}\text{C}\gamma$  (Рис. 73С) выявили *транс*-конфигурацию в основной форме и *цис*-конфигурацию в минорной форме гауземицина А [203].

N-концевую жирную кислоту идентифицировали с использованием спектров 2D COSY, TOCSY и  $^{13}\text{C}$ -HMBC. Не наблюдалось удвоения сигналов жирной кислоты, что указывает на то, что процесс конформационного обмена не влияет на эту часть молекулы. Вичинальные протон-протонные константы спин-спинового взаимодействия  $^3J$   $^1\text{HC}\alpha-^1\text{HC}\beta$  (11.4 Гц) и  $^1\text{HC}\gamma-^1\text{HC}\delta$  (15.6 Гц) показали, что соответствующие двойные связи в фрагменте жирной кислоты имеют *цис*- и *транс*-конфигурации, соответственно (Рис. 70). Константы взаимодействия  $^1\text{HC}\beta-^1\text{HC}\gamma$   $^3J$  имеют амплитуду 11.0 Гц, что, вероятно, соответствует *транс*-конфигурации этой частично двойной связи [257]. Остаток жирной кислоты образует большую сопряженную систему с предпочтительно плоской конформацией. Эта система также содержит две другие частично двойные связи (пептидную связь NH-C' и связь между атомами C' и C $\alpha$ ). Низкая интенсивность кросс-пика NOESY, наблюдаемая между сигналом  $^1\text{HN}$   $\beta\text{Ala}1$  и  $^1\text{HC}\alpha$  жирной кислоты, согласуется только с *транс-цис*- или *цис-транс*-конфигурацией этих связей. Анализ молекулярных моделей в вакууме показал, что обе эти конфигурации возможны, но Ван-дер-Ваальсово взаимодействие может привести к неплоской геометрии на связи C'-C $\alpha$ .

В спектрах ЯМР наблюдались сигналы, соответствующие углеводному фрагменту. Корреляция NOESY между  $^1\text{HC}\alpha$ ,  $^1\text{HC}\gamma$  и  $^1\text{HC}\epsilon$  (Приложение 15), наряду с большими константами вичинального взаимодействия  $^3J$   $^1\text{HC}\alpha-^1\text{HC}\beta$  (6.8 Гц) и  $^1\text{HC}\beta-^1\text{HC}\gamma$  (8.4

Гц) предполагала аксиальное положение  $\text{HC}\alpha$ ,  $\text{HC}\beta$ ,  $\text{HC}\gamma$  и, следовательно,  $\alpha$ -гликозидную конфигурацию. Небольшие вицинальные КССВ  $^3J \text{ } ^1\text{HC}\gamma\text{-}^1\text{HC}\delta$  (3.5 Гц) и  $^1\text{HC}\delta\text{-}^1\text{HC}\epsilon$  (1.7 Гц, 3.0 Гц), а также кросс-пик NOESY между  $^1\text{HC}\delta$  и  $^1\text{HC}\epsilon$  подтверждают экваториальное положение  $\text{HC}\delta$ . Назначение сигналов, вицинальные  $J$ -связи и данные оптического вращения позволили идентифицировать этот сахар как  $\alpha$ -L-арабинопиранозу. Явные кросс-пики  $^{13}\text{C}$ -NMBC и NOESY, наблюдаемые между сигналами  $^1\text{HC}\alpha$   $\alpha$ -арабинозы и  $^{13}\text{C}\zeta$  или  $^1\text{HC}\delta$  Tyr5 (Приложение 15), подтверждают присоединение арабинозы к пара-положению тирозинового кольца.

Такой же набор спектров ЯМР был получен для гауземицина В. Сигналы групп жирной кислоты и сахара, а также основная цепь пептидного фрагмента в гауземицине В были идентичны наблюдавшимся в гауземицине А. Наблюдался также аналогичный процесс конформационного обмена, связанный с *транс-цис*-изомеризацией пептидной связи Ala13-Pro14. Единственными значительными различиями в спектрах ЯМР гауземицина В по сравнению с компонентом А были изменения в спиновой системе Orn2 и наличие дополнительной спиновой системы, соответствующей остатку  $\beta$ -аланина, присоединенному к аминогруппе боковой цепи Orn2 ( $\beta\text{Ala}$  [Orn2]). Кросс-пики  $^{13}\text{C}$ -NMBC и NOESY, наблюдаемые между сигналами  $^{13}\text{C}'$  и  $^1\text{HC}\beta$  остатка  $\beta\text{Ala}$  [Orn2] и сигналами  $^1\text{HC}\delta$  и  $^1\text{HN}\epsilon$  боковой цепи Orn2 (Приложение 16), подтвердили наличие пептидной связи между амидной группой  $\text{HN}\epsilon$  боковой цепи Orn2 и карбонильной группой  $\beta\text{Ala}$  [Orn2]. Это согласуется с разницей масс в 71.04 Да между гауземицинами А и В из масс-спектрометрического анализа.

Конфигурация шести стереоцентров в гауземицине остается неопределенной (два центра при атомах  $\text{C}\alpha$  и  $\text{C}\gamma$  Ahrb3, два центра при  $\text{C}\alpha$  и  $\text{C}\beta$  hGlu4 и два центра при  $\text{C}\alpha$  и  $\text{C}\beta$  Dab6, Рис. 70, красные кружки). Была предпринята попытка определить эти конфигурации из данных ЯМР. С этой целью были выполнены несколько циклов расчета пространственной структуры гауземицина А в программе CYANA 3.98 [258], варьируя конфигурацию соответствующих центров и рассчитывая наборы структур, сравниваемых по значению функции CYANA, которая является мерой соответствия данных ЯМР расчетным структурам.

Чтобы уменьшить влияние конформационного обмена, вводили ограничения межпротонного расстояния из спектров NOESY, измеренных с короткими временами смешивания (50 и 100 мс) при 30°C. Ограничения по двугранному углу были получены из амплитуд связей  $^3J_{\text{HH}}$ . Из-за ограничений чувствительности расчеты проводились только для основной формы гауземицина А (*транс*-Ala13-Pro14). Группы жирных кислот и сахара не учитывались в расчетах, поскольку они не показали контактов NOE с



остальной частью молекулы (за исключением контактов с  $^1\text{HN}$   $\beta\text{Ala1}$  и  $^1\text{H}\delta$   $\text{Tyr5}$ , Приложение 15).

Изменение конфигурации шести асимметрических центров привело к 64 возможным вариантам. Чтобы упростить эту задачу, расчеты проводили поэтапно. На первом этапе рассчитывали структуры фрагмента макроцикла ( $\text{Tyr5-Pro14}$ ) с четырьмя возможными конфигурациями остатка  $\text{Dab6}$  (Приложение 17, Приложение 18). Наилучшее соответствие экспериментальным данным ЯМР наблюдалось в случае конфигурации L/R атомов  $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$  (Рис. 70D). Результирующий набор из 10 структур с конфигурацией L/R показан на Рис. 70E.

После этого рассчитали структуры полной молекулы, варьируя конфигурации асимметрических центров в остатках  $\text{Ahrb3}$  и  $\text{hGlu4}$ , но фиксируя конфигурацию L/R для  $\text{Dab6}$  (Приложение 19, Приложение 20). Однако из-за высокой мобильности N-концевого фрагмента полученные данные о корреляциях NOE и  $^3J$  были недостаточными для различения конфигураций  $\text{Ahrb3}$  и  $\text{hGlu4}$ . Чтобы подтвердить это, рассчитали структуры полноразмерного пептидного фрагмента гауземицина А с разной хиральностью атомов  $\text{C}\alpha$  в остатках  $\text{Ahrb3}$  и  $\text{hGlu4}$  (конфигурации  $\text{Ahrb3}$   $\text{C}\gamma$  и  $\text{hGlu4}$   $\text{C}\beta$  были зафиксированы на R). Анализ полученных структурных ансамблей (Рис. 70F) показал, что неопределенности, внесенные в структуру пептида из-за неизвестной хиральности и повышенной подвижности N-концевого фрагмента, сопоставимы.

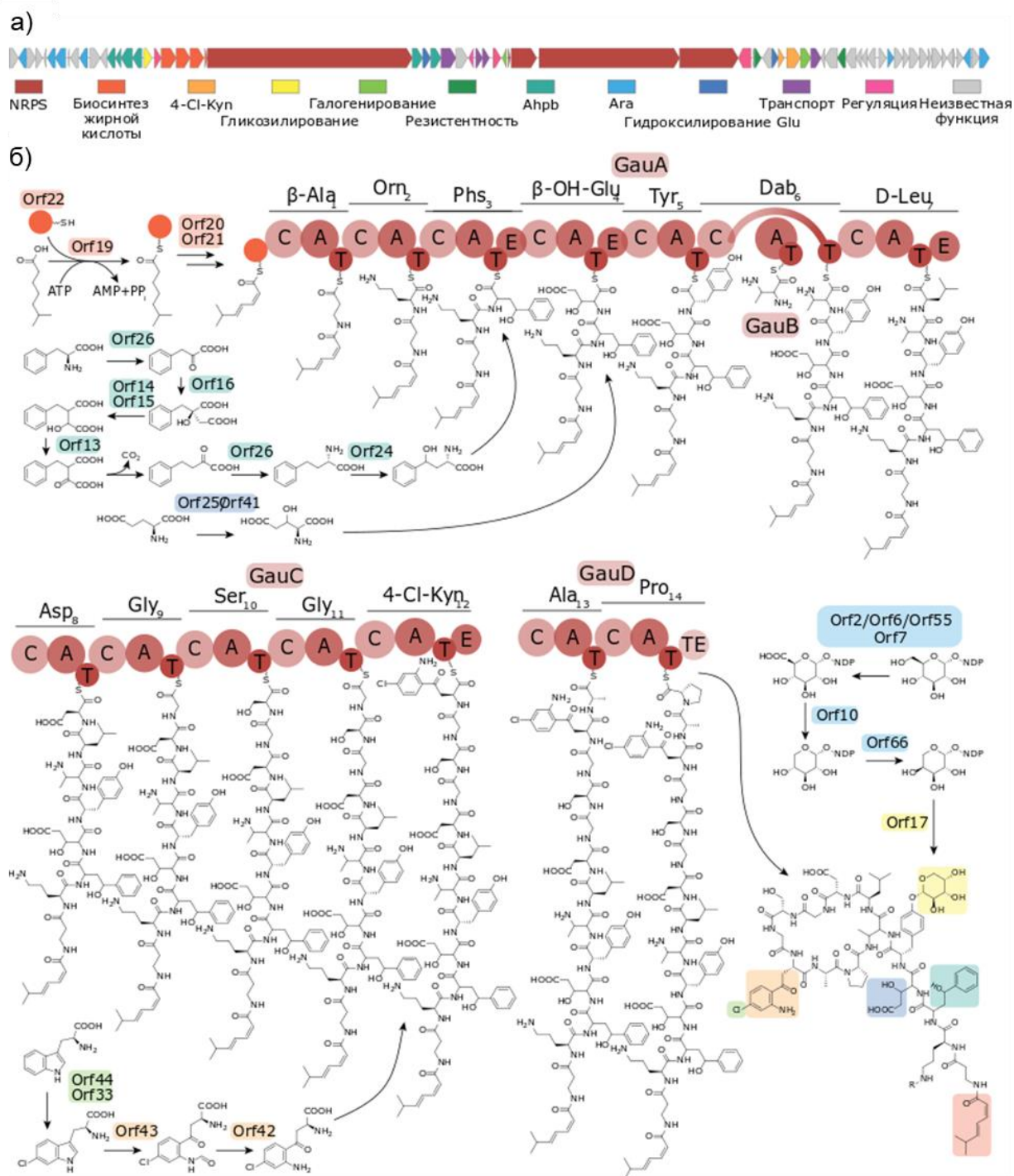
Таким образом, было обнаружено, что гауземицины представляют собой макроциклические пептиды, содержащие 14 аминокислот, включая непотеиногенные остатки и остатки с D-конфигурацией. Некоторые структурные мотивы в молекулах гауземицина очень редки для биологически активных природных продуктов. Гликозилирование остатка тирозина довольно необычно для природных пептидов [259,260], и нет примеров гликозилирования пентозой. 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. Хотя кинуренин является довольно распространенным метаболитом триптофана, обнаруженным в природных соединениях, его хлорированный аналог ранее был обнаружен в единственном семействе антибиотиков – таромицинах [41,51].  $\beta$ -Гидроксиглутаминовая кислота ( $\text{hGlu4}$ , Рис. 70) является редкой в природных пептидах и встречается в виде различных диастереомеров [261–265]. 3-Амино-4-гидрокси-4-фенилбутановая кислота ( $\text{Ahrb3}$ ) и  $\text{N}\epsilon$ -( $\beta$ -аланиноил)орнитин ( $\text{Orn2}$ ) (Рис. 70) ранее не обнаруживали в составе природных пептидов.

#### 2.4.6. Биосинтез гауземицинов

Структурная новизна гауземицинов позволяла предположить наличие интересных особенностей в пути их биосинтеза.<sup>21</sup> Анализ генома выявил большой (68 ORF) кластер биосинтетических генов NRPS (BGC), который был назван *gau* BGC (Рис. 74, GenBank accession number MZ394730).

---

<sup>21</sup> Полногеномное секвенирование штамма-продуцента выполнено д.б.н. Рапиным Н.В. и д.б.н. Мардановым А.В. (ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии»), биоинформатический анализ проводился совместно с к.х.н. Тереховым С.С. (ИБХ РАН).



**Рис. 74.** (а) Фрагмент предсказанного *gau* BGC (Orf1–Orf62) с некоторыми из предложенных функций; (б) Модульная архитектура линии сборки гауземидина NRPS и предлагаемый биосинтез гауземидина А. А, домен аденилирования; С, домен конденсации; Е, домен эпимеризации; Т, тиоляционный домен; ТЕ, домен тиоэстеразы. Биосинтетические пути необычных аминокислот и модификаций предсказываются на основе гомологии белков. Они могут происходить до или после сборки NRPS. NDP указывает, что нуклеотид не может быть определен.

Общая архитектура и сходство белков в кластере *gau* была проанализирована в сравнении с известными кластерами родственных соединений (Приложение 21, Приложение 22). Четыре основных гена NRPS гауземидина BGC содержат 14 модулей, ответ-

ственных за введение  $\beta$ -Ala1-Orn2-Ahpb3-hGlu4-Tyr5-D-Leu7 (*gauA*), Dab6 (*gauB*); Аминокислоты Asp8-Gly9-Ser10-Gly11-ClKyn12 (*gauC*) и Ala13-Pro14 (*gauD*) (Приложение 23). BGC родственных циклических липопептидов малацидина [42], фриулимицина [85] и ласпартомицина [86] содержат NRPS (MlcK, PstB и LpmB соответственно), аналогичные GauA. Кроме того, все они имеют специальный модуль, взаимодействующий *in trans* с соответствующими доменами А-Т (MlcA, PstA, LpmA и 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 (Приложение 24).

В отличие от других циклических липопептидов, GauA имеет особенно большое количество модулей, определяющих уникальный пептидильный линкер, расположенный между N-концевым хвостом жирной кислоты и макролактамным кольцом (Рис. 74). Этот линкер содержит пять остатков непротеиногенных или модифицированных аминокислот. Родственные малацидин, фриулимицин и ласпартомицин имеют линкер из одной аминокислоты, в то время как более отдаленные антибиотики, подобные даптомицину, имеют три экзоциклических N-концевых остатка. Единственными подобными соединениями с линкером из пяти аминокислот являются румицины, о которых сообщалось лишь в патентной литературе [40], без упоминания биосинтетического происхождения.

Следующий GauC NRPS содержит уникальную комбинацию модулей, кодирующих пептидную последовательность DGSG-ClKyn. Этот фрагмент сильно отличается от родственных последовательностей KhDDGmD, mDDGDG-Dab, GDGDG-dThr и Orn-DADGS малацидина, фриулимицина, ласпартомицина и даптомициноподобных антибиотиков, соответственно. Следовательно, эта последовательность отличается от классического мотива DXDG Ca<sup>2+</sup>-зависимых липопептидов. Последний модуль в белке GauC, интегрирующий остаток 4-Cl-кинуренина, содержит домен эписмеризации, что позволяет предположить D-конфигурацию этой аминокислоты. Тем не менее, не было обнаружено никаких следов производного Мерфи, соответствующего D-4-Cl-Kyn в спектрах LCMS дериватизата продуктов гидролиза гауземицинов ни для отдельных компонентов, ни для случая концентрата антибиотика. В то время как домен эписмеризации обеспечивает смесь конфигураций, можно предположить, что нижележащий домен C представляет собой <sup>1</sup>C<sub>L</sub>-катализатор [266] и избирательно реагирует с цепями, заканчивающимися хлорированным кинуренином в L-конфигурации. Кроме того, домен эписмеризации, расположенный в терминальном модуле белка GauC, может быть неактивным, как ранее со-

общалось для ComB и StaB NRPS из комплестатина и A47934 BGC, соответственно [267].

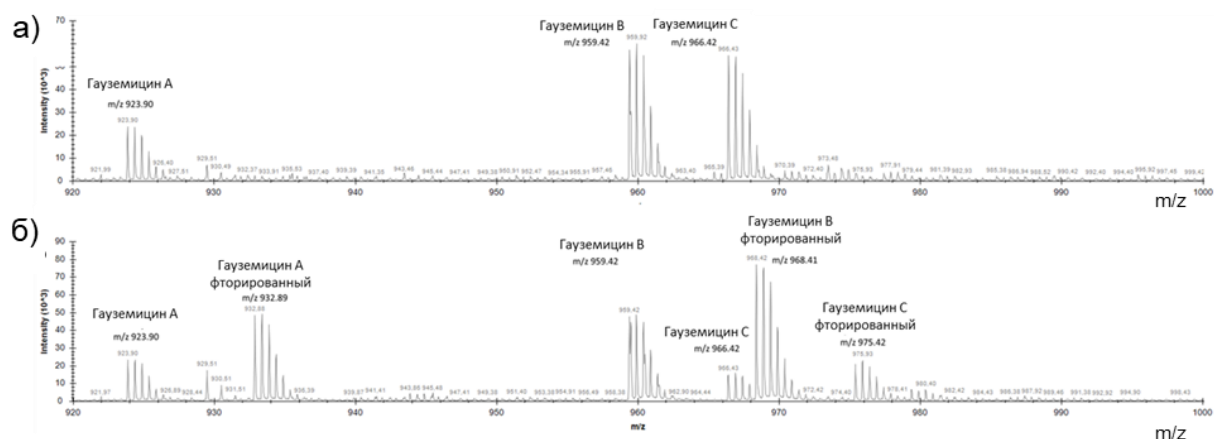
Последний GauD NRPS кодирует фрагмент AP, который аналогичен концевым последовательностям VmP, VP, IP в родственных малацидине, фриулицидине, румицидине и ласпартомицидине. Эта консервативная последовательность подчеркивает структурную значимость конечного пролина в липопептидах, содержащих макролактамы, вероятно, обеспечивая конформацию, оптимальную для замыкания цикла.

Недавно подробно описан биосинтез 4-Cl-Kyn из L-Trp [103]. Кластер Gau не содержит полного квартета ферментов, описанных ранее для BGC даптомицин-подобного антибиотика таромицина. Однако он содержит три ключевых фермента, необходимых для превращения L-Trp в 4-Cl-Kyn, напоминающих триптофан-2,3-диоксигеназу, флавин-зависимую галогеназу и флавинредуктазу (Orf 43, 44 и 33, соответственно, идентичность 50%, 79% и 59%). Заключительный этап биосинтеза 4-Cl-Kyn в квартете таромицина катализируется кинуренинформамидазой. Однако это не скорость-определяющая стадия [103], и в случае гауземицинов она может быть спонтанной или катализироваться неспецифической гидролазой, например, соседней предполагаемой  $\alpha,\beta$ -гидролазой (Orf42).

GauA опосредует включение необычной ароматической аминокислоты 2-амино-4-гидрокси-4-фенилбутановой кислоты (Ahrb3), которая не была описана в природных пептидах. Ahrb3 не подвергался хлорированию ни в одной из полученных структур, включая те второстепенные компоненты, которые были обнаружены с помощью масс-спектров. Это отличает Gau от таромицина BGC, кодирующего включение двух хлорированных аминокислот, 6-Cl-Trp и 4-Cl-Kyn, происходящих из L-Trp. Следовательно, Ahrb3 весьма вероятно не является продуктом модификации триптофана. Предположительно, предшественником Ahrb3 является фенилаланин и биосинтез протекает с образованием гомофенилаланина [268]. Гены, предположительно участвующие в биосинтезе гомофенилаланина (Рис. 74), демонстрируют высокое сходство с ранее описанными ферментами (Приложение 22, Orf13-Orf16). Orf13-Orf16 и Orf26 очень похожи на соответствующие белки в ломавитицине BGC40 штамма *Salinispora pacifica* DPJ-0016 (идентичность 67–54%). Хотя их роль в биосинтезе ломавитицина неясна, они предположительно ответственны за биосинтез Ahrb3, и предполагаемая тирозин аминотрансфераза Orf26 участвует в этом процессе. Заключительным этапом предлагаемого биосинтеза Ahrb3 является гидроксирование гомофенилаланина, обеспечиваемое соответствующей оксигеназой. Этот этап может быть опосредован предполагаемой цитохром P450 монооксигеназой Orf24, аналогичной Tlo29 и Tlo23 (идентичность 34% и 32% соответствен-

но) родственного теломицина BGC. Plo29 и Plo23 представляют собой монооксигеназы цитохрома P450, ответственные за (s)- $\beta$ -гидроксилирование Pro и Leu соответственно [269].

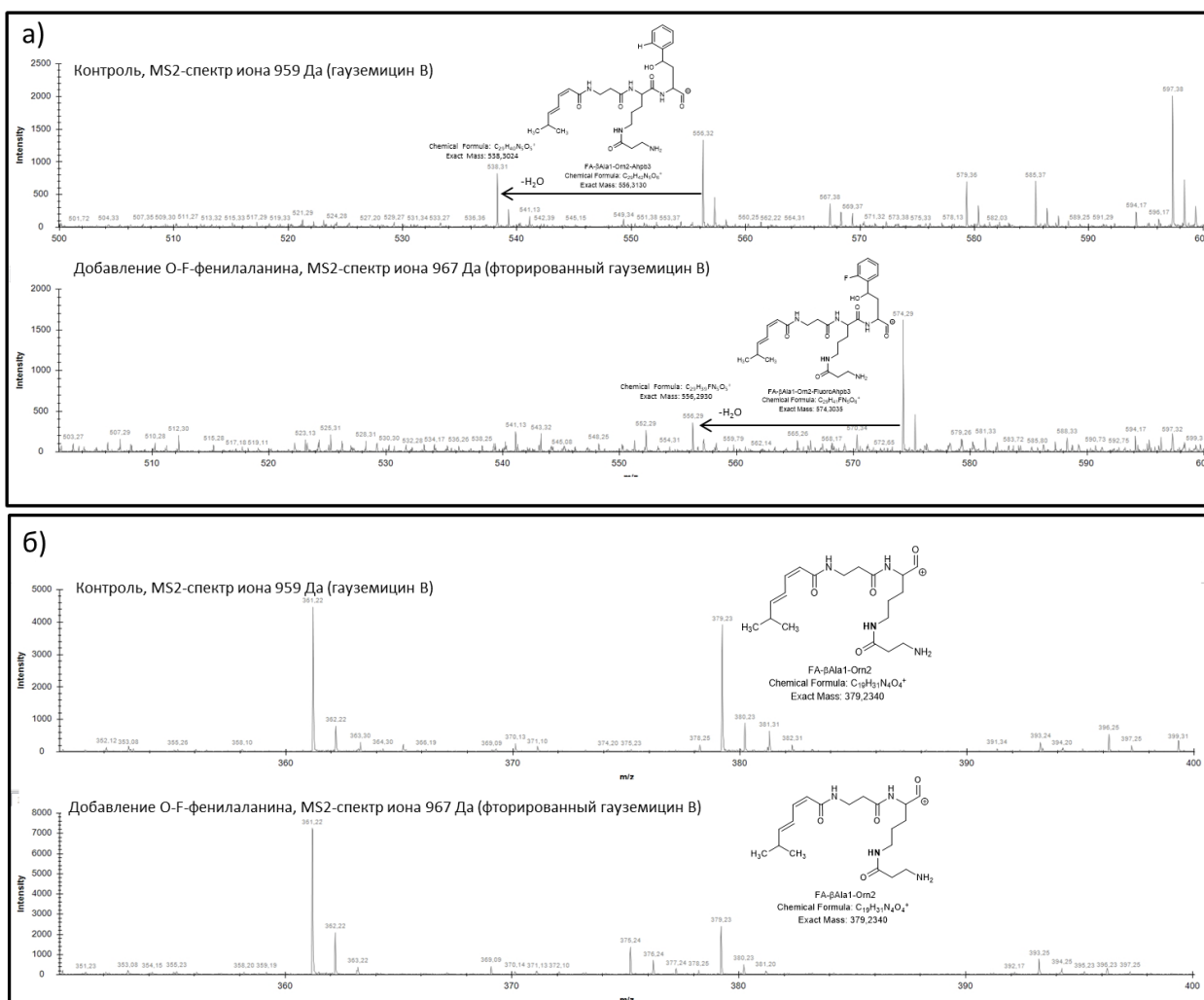
Чтобы подтвердить участие фенилаланина в качестве субстрата для биосинтеза гауземицинов, добавляли фторированные производные фенилаланина (2-F-Phe, 4-F-Phe) в культуральную жидкость при культивировании *Streptomyces* sp. INA-Ac-5812. Действительно, анализ LCMS показал,<sup>22</sup> что в молекулы гауземицинов включался один атом фтора, для каждого из компонентов наблюдалось появление монофторированного аналога (Рис. 75).



**Рис. 75.** Сравнение ключевых областей масс-спектра экстракта культуральной жидкости штамма-продуцента *Streptomyces* sp. INA-Ac-5812 при культивировании (а) без добавок модифицированных аминокислот; (б) с добавлением в среду при культивировании фтор-фенилаланина до конечной концентрации 2 мМ.

Включение было проиллюстрировано появлением интенсивных ионов с  $m/z$  932.9 и 968.4, соответствующих монофторированным молекулам гауземицинов А и В, соответственно. Положение включения фтора было подтверждено с помощью фрагментации пептидов с помощью LCMS/MS. Наблюдался прирост массы  $^{19}\text{F}$  по сравнению с  $^1\text{H}$  (18 Да) в ионе фрагмента FA- $\beta$ Ala1-Orn2( $\beta$ Ala)-[F]Ahrp3 (Рис. 76А), но не в последующем фрагменте FA- $\beta$ Ala1-Orn2( $\beta$ Ala) (Рис. 76В).

<sup>22</sup> Хроматомасс-спектрометрический анализ экстрактов проводился к.б.н. Бирюковым М.В. (МГУ им. М.В. Ломоносова).



**Рис. 76.** Масс-спектры фрагментации ESI-LCMS CID гауземицина В и его фторированного аналога (а) область масс, соответствующая иону FA- $\beta$ Ala1-Orn2( $\beta$ Ala)-[F]Ahp3; (б) область масс, соответствующая иону FA- $\beta$ Ala1-Orn2( $\beta$ Ala).

Gau BGC содержит ряд ферментов, участвующих в редких модификациях. Orf20 и Orf21 представляют собой ацил-CoA дегидрогеназы, похожие на CdeF и CdeG (54% и 54% идентичности соответственно), из недавно описанного пути биосинтеза кадазидов [43]. И гауземицины, и кадазиды имеют редкие остатки ненасыщенных (2Z,4E) жирных кислот. Другой модифицированный аминокислотный остаток в гауземицинах - это  $\beta$ -OH-Glu4. Гидроксилирование Glu может катализироваться предполагаемой диоксигеназой Orf25 или Orf41, аналогично диоксигеназе KtzP (49% и 41% идентичности, соответственно), осуществляющей стереоспецифический синтез эритро- $\beta$ -гидроксиглутаминовой кислоты в биосинтезе куцнерида [264].

Постсинтетическая модификация, которая предположительно происходит после сборки с помощью NRPS, представляет собой гликозилирование Tug5. Предлагаемое гликозилирование включает биосинтез NDP- $\alpha$ -L-арабинопиранозы из NDP- $\alpha$ -D-глюкозы.

Специфичность нуклеотидов здесь не может быть определена, в этот процесс может быть вовлечена предполагаемая неохарактеризованная нуклеотидилтрансфераза Orf68. Гликозилирование вероятно осуществляется предполагаемым белком семейства гликозилтрансфераз 2 Orf17. Orf17 является единственной гликозилтрансферазой в Gau BGC и имеет некоторое сходство (33% идентичности) с гликозилтрансферазой HasX из BGC липопептида хассаллидина [270]. Подобно гауземицину, хассаллидин содержит арабинозу. Хотя невозможно точно предсказать все ферменты, участвующие в биосинтезе арабинозы, можно допустить, что предполагаемые дегидрогеназы Orf2, Orf6, Orf7 и/или Orf55 опосредуют первичное окисление NDP- $\alpha$ -D-глюкозы, Orf10 является предполагаемой декарбоксилазой и Orf66 участвует в стадии эпимеризации (Рис. 74). Хотя гомологи Orf10, Orf55 и Orf66 также идентифицированы в BGC хассаллидинов (HasP, HasL и HasP, соответственно), они имеют лишь умеренное сходство (23–27%), недостаточное, чтобы однозначно предположить их функцию. Ряд открытых рамок считывания не может быть точно охарактеризован на основании исключительно гомологии белков (особенно область Orf46–Orf67). Вероятно терминальная часть Gau BGC содержит ферменты, участвующие в метаболизме сахара и жирных кислот, которые могут быть ответственны за синтез минорных компонентов антибиотического комплекса.

#### 2.4.7. Биологическая активность антибиотического комплекса и индивидуальных компонентов – гауземицинов А,В

Гауземицины – это циклические липогликопептиды, похожие на анионные липопептиды, но с полностью отличной пептидной последовательностью. Более того, гауземицины не содержат классического  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего мотива DXDG, характерного для кальций-зависимых антибиотиков [25]. Чтобы определить потребность в кальции для антибиотической активности гауземицинов, измеряли МИК гауземицинов в отношении ряда штаммов после добавления 0.45 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (Таблица 16).<sup>23</sup>

Таблица 16. Зависимость МИК гауземицинов от добавления 0.45 мМ  $\text{Ca}^{2+}$

Тест-микроорганизм	МИК (мкг/мл)					
	Гауземицин А		Гауземицин В		Рамопланин	
	без $\text{Ca}^{2+}$	0.45 мМ $\text{Ca}^{2+}$	без $\text{Ca}^{2+}$	0.45 мМ $\text{Ca}^{2+}$	без $\text{Ca}^{2+}$	0.45 мМ $\text{Ca}^{2+}$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0.5	0.5	1	1	4	4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592 (MRSA)	0.5	0.5	1	0.5	4	4

<sup>23</sup> Биологическая активность гауземицинов изучалась к.б.н. Грамматиковой Н.Э. (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе).



<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	0.25	0.25	0.5	0.5	4	4
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>64	64*	>64	>64	2*	2*
<i>Enterococcus faecium</i> 3576 (VanR)	64*	64*	>64	>64	2*	2*
<i>Enterococcus gallinarum</i> 1308 (VanR)	>64	>64	>64	>64	2*	2*
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>64	>64	>64	>64	>64	>64

\*заметное снижение плотности роста

Несмотря на то, что ранее сообщалось о кальций-зависимом механизме действия одного из пептидных антибиотиков, выделенных из штамма *Streptomyces roseoflavus* INA-Ас-5812 [271], не наблюдалось выраженной зависимости от  $\text{Ca}^{2+}$  для антибактериальной активности гауземицина. Такое поведение уникально среди анионных липопептидов и гликопептидов, включая недавно открытые малацидины [42] и кадазиды [43].

Гауземицины обладают выраженной активностью в отношении грамположительных бактерий, в том числе метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), но 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 (Таблица S24). Наряду с энтерококками *Streptococcus* sp. и виды *Mycobacterium tuberculosis* практически не проявляли чувствительности к гауземицинам. Таким образом, гауземицины обладают видоспецифичной активностью в отношении грамположительных бактерий, что может быть полезно для разработки терапевтических средств узкого спектра действия, рассматриваемых как один из подходов к преодолению распространения резистентности к антибиотикам [272].

Таблица 17. Спектр антибактериальной активности гауземицинов

Тест-микроорганизм	МИК (мкг/мл)				
	Гауземицин А	Гауземицин В	Рамопланин	Даптомицин (+ $\text{Ca}^{2+}$ )	Ванкомицин
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0.5	1	4	n/a	n/a
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592 (MRSA)	0.5	1	4	n/a	n/a
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	0.25	0.5	4	n/a	n/a
<i>Enterococcus fae-</i>	>64	>64	2	n/a	n/a

<i>calis</i> ATCC 29212					
<i>Enterococcus faecium</i> 3576 (VanR)	64	>64	2	n/a	>64
<i>Enterococcus gallinarum</i> 1308 (VanR)	>64	>64	2	n/a	>64
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>64	>64	>64	n/a	>64
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	32	>32	n/a	0.06	0.25
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	>32	32	n/a	0.25	0.5
<i>Streptococcus pyogenes</i> 7004	16	32	n/a	0.06	0.25
<i>Streptococcus pyogenes</i> P6	16	32	n/a	0.06–0.125	0.25
<i>Streptococcus pyogenes</i> P26	16	32	n/a	0.06	0.25
<i>Streptococcus agalactiae</i> S 17	>32	>32	n/a	0.5	0.5
<i>Streptococcus anginosus</i> Cp 16	>32	>32	n/a	0.5	0.25
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	>40	>40	n/a	n/a	n/a

n/a – не измерялось

Для дальнейшей оценки клинических перспектив полученных соединений была изучена активность гауземицинов против 62 клинических изолятов *Staphylococcus* sp., в некоторых случаях наблюдался МИК значительно ниже, чем у гликопептидов и даже даптомицина (0.125–1.0 мкг/мл). Таким образом, можно предположить, что гауземицины являются перспективными антибактериальными средствами. 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 с использованием теста МТТ. Измеренные значения IC<sub>50</sub> (5–10 мкг/мл, Таблица 18)<sup>24</sup> были значительно выше, чем МИК, что указывает на относительно большой терапевтический индекс. Принимая во внимание эти уникальные биологические особенности, было реше-

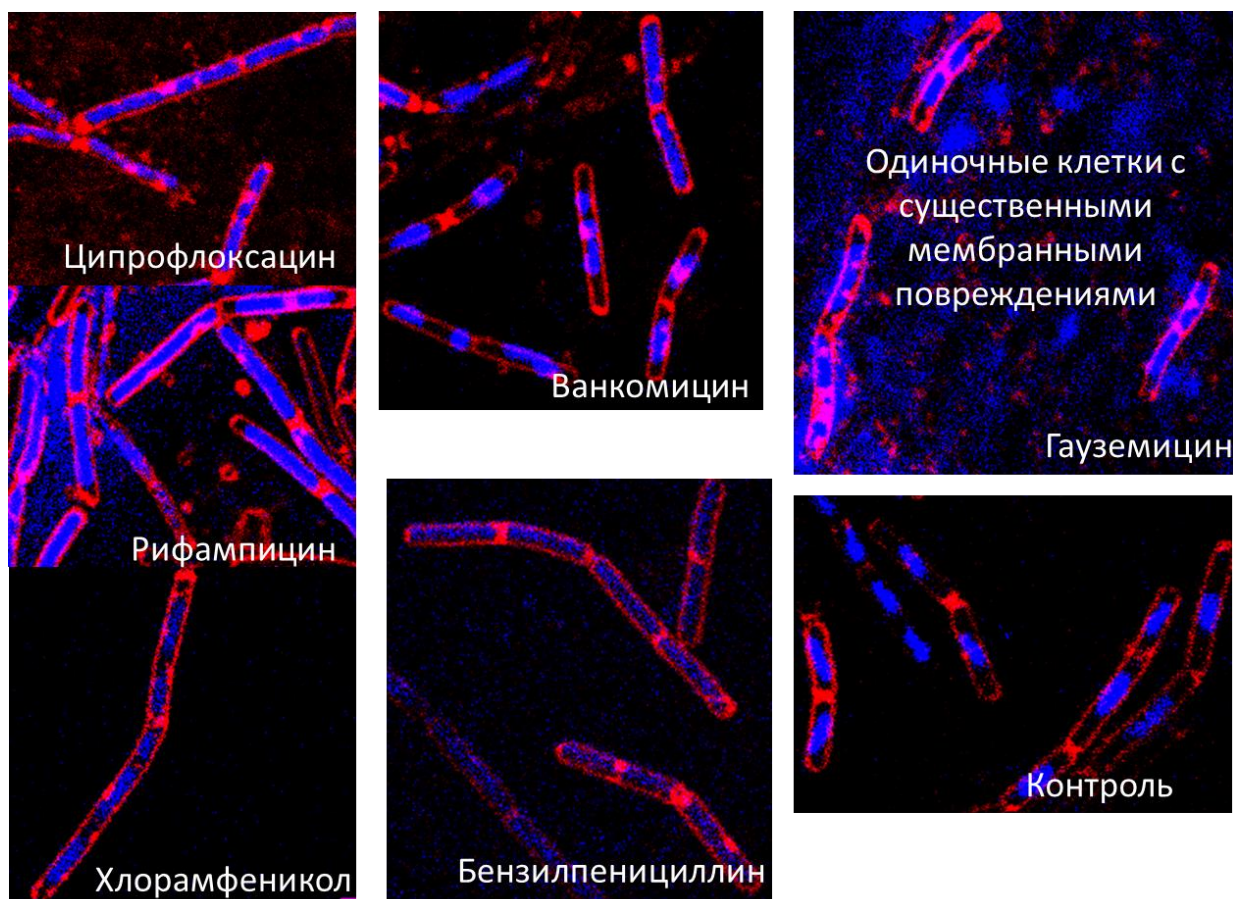
<sup>24</sup> Значения цитотоксичности измерялись к.б.н. Свирщевской Е.В. (ИБХ РАН)

но сравнить активность и механизм действия гауземицинов с известными антибиотиками.

Таблица 18. Анитпролиферативная активность гауземицинов

Клеточная линия	Тип линии	IC <sub>50</sub> (мкг/мл)		
		Гауземицин А	Гауземицин В	Доксорубицин
COLO357	карцинома	10	10	0.1
J774	псевдонормальные	5	10	0.02
EL-4	тимома	5	10	0.1
Colon26	карцинома	5	10	0.5
HT-29	карцинома	10	10	0.5

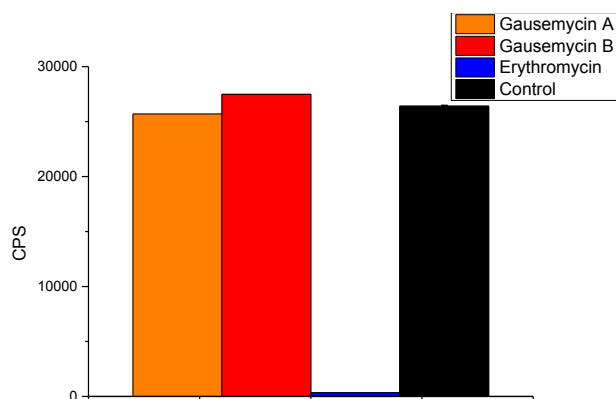
Чтобы получить общее представление о механизме действия гауземицинов, использовался подход ВСП (бактериальное цитологическое профилирование). Этот метод заключается в наблюдении за морфологическими изменениями тест-микроорганизмов при обработке различными антибиотиками, визуализируемыми с помощью флуоресцентного окрашивания. Первоначально этот метод был разработан для штамма *Escherichia coli* в качестве тестового микроорганизма [273]. Поскольку гауземицины неактивны в отношении *E. coli* дикого типа,  $\Delta tolC$  *E. coli* и даже мутантного штамма *lptD* с проницаемым внешним барьером, был использован модифицированный подход с *Bacillus subtilis* в качестве тестового микроорганизма [274,275]. Тестовый штамм обрабатывали 2.5 МИК различных антибиотиков, включая ингибиторы репликации ДНК (рифампицин и ципрофлоксацин), ингибиторы биосинтеза клеточной стенки (ванкомицин, бензилпенициллин), ингибитор синтеза белков (хлорамфеникол), мембраноактивные соединения (граммицидин S, даптомицин, низин) и гауземицином в течение 2 ч. В этом эксперименте обработка гауземицином, а также мембраноактивными антибиотиками (граммицидин S, даптомицин, низин) приводила к почти полному лизису клеток с обнаружением только единичных клеток с видимым разрушением мембраны (Рис. 77).



**Рис. 77.** Культура *Bacillus subtilis* после обработки 2.5 МПК 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.

Чтобы напрямую подтвердить неспособность гауземицина ингибировать синтез белка в бактериях, использовалась система бесклеточной трансляции *in vitro* на основе экстракта *E. coli*.<sup>25</sup> Изучение влияния гауземицина на экспрессию люциферазы светлячков (Fluc) путем мониторинга люминесценции Fluc (Рис. 78) не показало ингибирования синтеза белка.

<sup>25</sup> Ингибирование рибосомы изучалось д.х.н. Остерманом И.А. (Сколтех)

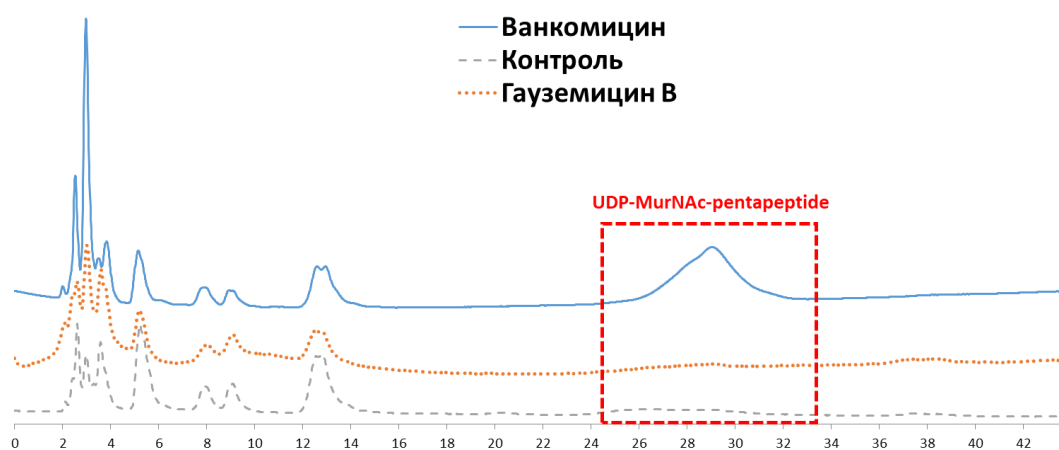


**Рис. 78.** Изучение трансляции под действием гауземицинов *in vitro* в бесклеточной системе

Ингибирование биосинтеза клеточной стенки - один из наиболее распространенных механизмов действия липопептидных антибиотиков (Рис. 79). Процесс биосинтеза клеточной стенки включает в себя несколько важных этапов, на которые нацелены пептидные антибиотики, и поэтому молекулярные мишени различных пептидов в клеточной стенке весьма разнообразны. Например, фриулимицины связывают липид-носитель ундекапренилфосфат (C55-P), а бацитрацин ингибирует синтез пептидогликана, предотвращая дефосфорилирование ундекапренилпирофосфата (Рис. 79А). Многие липопептидные антибиотики нацелены на предшественники биосинтеза клеточной стенки, особенно липид II (Рис. 79В) [276,277]. Даже в этой молекуле антибиотики имеют различные сайты связывания. Гликопептиды, такие как ванкомицин, связываются с фрагментом D-Ala-D-Ala пентапептидного фрагмента, в то время как рамопланин, тейксобактин и низин взаимодействуют с фрагментом дифосфата. Также предполагается, что полусинтетические производные гликопептидов (например, оритаванцин) имеют вторичный сайт связывания на мостиковых сегментах пептидогликана [278].



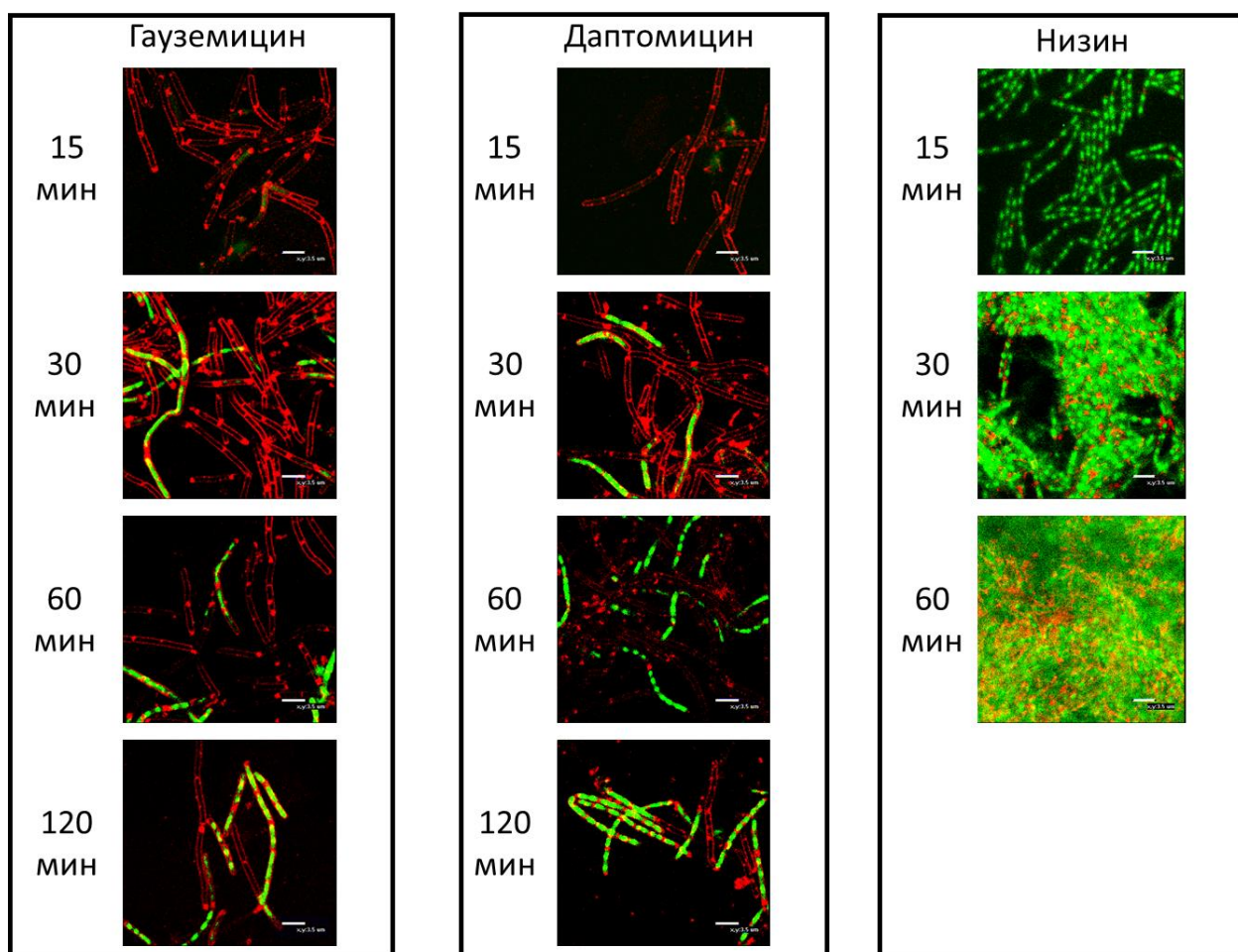
Связывание с прекурсорами биосинтеза клеточной стенки, в том числе и с липидом II, приводит к накоплению последнего растворимого в цитоплазме предшественника – UDP-N-АсMur-PP. Например, накопление UDP-N-АсMur-PP ранее было описано для пептидных антибиотиков, нацеленных на биосинтез клеточной стенки, включая ванкомицин [279], ласпартомицин [73], рамопланин [279], фриулимицин [38], тейксобактин [280], малацидины [42] и казаиды [43]. Родственным соединением, не вызывающим наблюдаемого накопления UDP-N-АсMur-PP в обработанных клетках, является даптомицин [42,73]. Было изучено накопление UDP-N-АсMur-PP под действием гауземицина (Рис. 80). В случае ванкомицина наблюдается отчетливое накопление пика с временем удерживания 29 мин по сравнению с контролем и гауземицином В. Природа детектированного вещества была 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. 80.** Профиль ВЭЖХ экстракта культуры *S. aureus* при обработке ванкомицином и гауземицином В. Колонка Waters Sunfire C18 5 мкм 4.6×250 мм, поток 1 мл/мин, изократическое элюирование 50 мМ фосфатным буфером, рН 5.0, детекция по поглощению при 260 нм.

На основании этих результатов можно заключить, что гауземицины обладают сходным механизмом действия с мембраноактивными соединениями, такими как даптомицин. Тем не менее, использованный ранее подход к цитологическому профилированию не позволил сравнить различные мембраноактивные соединения, как как в условиях эксперимента тест-культура подвергалась полному лизису. Поэтому был использован модифицированный подход ВСП. Клетки *B. subtilis* обрабатывали антибиотиком с более низкой концентрацией (1 МИК) и визуализировали после различных периодов обработки

(Рис. 81). Здесь применялся 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, [281] вызывает более быстрое повреждение мембраны, что приводит к полному лизису клеток через 60 мин после обработки. Таким образом, среди мембранно-активных соединений наиболее сходным с гауземицинами оказался даптомицин.



**Рис. 81.** 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).

Даптомицин, выделенный в 1985 г. и применяемый в клинической практике с 2003 г. [77], является одним из наиболее изученных липопептидных антибиотиков. Тем не менее, в этой области все еще есть возможности для исследований, регулярно публи-



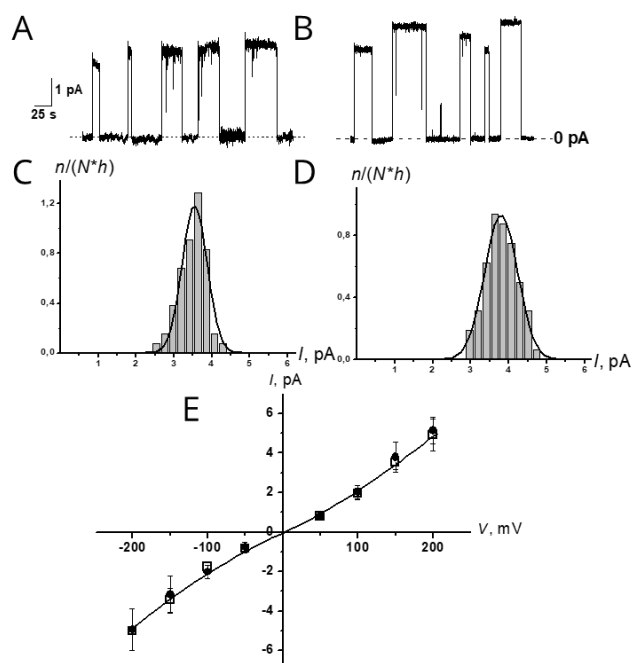
куются новые данные и модели механизма действия даптомицина [282]. До недавних открытий [61] предполагалось, что цитотоксический эффект даптомицина вызывается деполяризацией мембраны из-за его порообразующей активности, но позже выяснилось, что это не основной механизм действия. Несмотря на свою очевидную мембранную активность, даптомицин, по-видимому, нарушает биосинтез клеточной стенки за счет дислокации связанных с мембраной ферментов, участвующих в этом процессе, таких как MurG, TagV и других (Рис. 79) [61]. Согласно последним данным [65], даптомицин (в присутствии ионов  $Ca^{2+}$ ) образует трехкомпонентный комплекс с анионным липидом фосфатидилглицеролом (PG) и связанными с бактопренилом предшественниками клеточной стенки (C55P, C55PP или липид II), и эти комплексы запускают делокализацию биосинтетического аппарата клеточной стенки. Эта модель объясняет узкий спектр активности даптомицина высокими уровнями как PG, так и специфического предшественника клеточной стенки у чувствительных микроорганизмов. Таким образом, даптомицин обладает особым механизмом действия, приводящим к ингибированию биосинтеза клеточной стенки [283]. Принимая во внимание аналогичные бактериальные цитологические профили, можно предположить, что гауземицины по механизму действия в чем-то похожи на даптомицин.

Модельные мембраны ранее зарекомендовали себя как эффективные объекты для исследования мембраноактивных пептидов [284–287], поэтому было решено изучить влияние гауземицина В на ионную проницаемость в плоских липидных бислоях, состоящих из DOPE/DOPG (1:1) и DOPC/DOPG (1:1).<sup>26</sup> Добавление гауземицина на цис-сторону мембраны приводило к ступенчатым колебаниям тока (Рис. 82АВ), соответствующим открытию и закрытию отдельных каналов в обеих липидных системах. Квази-омическая и симметричная вольт-амперные кривые (Рис. 82Е) показали отсутствие зависимость от напряжения разделения пептида на мембране. Скорее всего, гауземицин связывается с липидным бислоем и свободно диффундирует через него, образуя симметричные поры. Липиды фосфатидилэтаноламина (PE) вызывают деформацию отрицательной кривизны в бислое, которая обычно стабилизирует поверхностно-связанное состояние мембрано-активных пептидов и ухудшает их переход в трансмембранное состояние и образование каналов. Сходство одноканальных свойств и пороговых концентраций в мембранах DOPE/DOPG и DOPC/DOPG (Рис. 82СD, Таблица 19) указывает на отсутствие заметного энергетического барьера на переход молекулы гауземицина из по-

---

<sup>26</sup> Эксперименты на модельных мембранах осуществлялись в лаборатории под руководством д.б.н. Остроумовой О.С. (Институт цитологии РАН) и интерпретировались совместно с д.ф.-м.н. Шенкаревым З.О. (ИБХ РАН).

верхностно связанной к трансмембранному (или эквивалентному) состоянию. Это также согласуется со свободной диффузией гауземицина через липидный бислой.



**Рис. 82.** Колебания тока (A, B) и гистограммы переходов тока (C, D) отдельных каналов, индуцированные гауземицином в липидных бислоях, состоящих из DOPE/DOPG (1: 1) (A, C) и DOPC/DOPG (1: 1) (B, D) и погруженных в 0.1 М KCl (pH 7.4). Трансмембранное напряжение составляло 150 мВ. (E) Вольт-амперные характеристики отдельных каналов гауземицина в мембранах DOPE / DOPG (●) и DOPC / DOPG (□).

Один относительно узкий уровень проводимости наблюдался в обеих липидных системах (Рис. 82CD, Таблица 19). Близкое сходство проводимости указывает на четко определенную структуру канала гауземицина. Этот канал, вероятно, представляет собой определенный олигомер из молекул антибиотика (димер, тример, тетрамер и др.) или смешанный агрегат гауземицин/DOPG. Наблюдаемый уровень проводимости ( $\sim 15$  пСм в 0.1 М KCl) соответствует очень узкой поре с диаметром  $\sim 3 \text{ \AA}$ . Сравнение с характеристическими радиусами наиболее распространенных катионов и анионов показывает, что поры гауземицина могут быть проницаемыми для частично дегидратированных одновалентных катионов  $\text{H}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и, возможно, для дегидратированных двухвалентных катионов  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ . Для изучения селективности каналов, образуемых гауземицином, необходимы дополнительные эксперименты. Длина N-концевого жирнокислотного хвоста в гауземицине составляет около 0.8 нм, в то время как общая длина молекулы антибиотика, в зависимости от конформации фрагмента  $\beta\text{-Ala1-Tyr5}$ , находится в диапазоне 2.2–4.0 нм. (Рис. 73F). Таким образом, уже длины двух молекул гауземицина достаточно, чтобы сформировать трансмембранную пору.

Таблица 19. Характерные параметры мембранной активности гауземицина В в липидных бислоях различного состава. С – пороговая концентрация антибиотика, необходимая для наблюдения одиночных пор;  $G_{V \rightarrow 0}$  – средняя проводимость одиночных каналов при  $V \rightarrow 0$ ;  $\tau$  – среднее время жизни пор

Состав мембранных липидов	С, мкг/мл	$G_{V \rightarrow 0}$ , пС	$\tau$ , с
DOPE/DOPG (1:1)	$50 \pm 11$	$15 \pm 5$	$13 \pm 4$
DOPC/DOPG (1:1)	$40 \pm 9$	$16 \pm 4$	$8 \pm 2$

Значительная доля анионного компонента (DOPG) обеспечивает сходство используемых липидных систем с бактериальными мембранами. Сравнение пороговых концентраций в модельных мембранах (Таблица 19) с типичным диапазоном концентраций антибиотической активности показало, что гауземицин В нарушает целостность мембраны и формирует ионные каналы только при  $10 \times$ МИК и более высоких концентрациях. Вероятно, как и даптомицин, 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). Тот факт, что обработка  $2.5$  МИК привела к почти полному лизису клеток *Bacillus subtilis* (Рис. 77), указывает на то, что накопление связанных молекул гауземицина вызывает напряжение в липидном бислое, что в конечном итоге приводит к разрыву мембраны или мицеллообразованию.

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. И даже спектр активности даптомицина считается [61] очень узким спектром активности для разрушающего мембраны соединения, которые обычно неселективны.

Точный механизм и разнообразие генетических перестроек, ассоциированных с резистентностью к даптомицину, остается до конца не изученным; текущие данные говорят, что эти изменения имеют сложную, разнообразную и мультифакторную природу, а также существенно зависят от изучаемого вида бактерий [65,288–290]. Одним из распространенных механизмов резистентности является мутации в гене *mprF*, приводящие к включению в PG положительно заряженного лизина или к снижению общего содержания PG в мембране [291]. Другими детерминантами резистентности к даптомицину являются гены, кодирующие энзимы, участвующие в метаболизме фосфолипидов, например *pgsA*, *cls*, *gdpD* [292,293]. Была показана ключевая роль в развитии резистентности перестройки в гене, кодирующем трансмембранный протеин LiaF, в резистентных изолятах *Enterococcus* sp. и *Bacillus* sp. Этот энзим является частью трехкомпонентной систе-

мы LiaFSR, участвующей в регуляции биосинтеза клеточной стенки и развитии резистентности к антибиотикам, связывающимся с липидом II [288,293].

Для сравнения механизмов действия гауземицинов и наиболее близкого по механизму действия аналога – даптомицина, были получены резистентные изоляты *Bacillus subtilis* и проведено их полногеномное секвенирование<sup>27</sup>. В полученных резистентных изолятах наблюдалось удвоение или утроение гена *ugtP*, кодирующего белок (processive diacylglycerol beta-glucosyltransferase), участвующий в синтезе мембранных гликолипидов, однако не наблюдалось делеций в генах, характерных для резистентных к даптомицину изолятов. Также наблюдалось удвоение гена, кодирующего cold shock protein CspD. Изменения в регуляции генов с похожей функцией ранее наблюдалось в транскриптомном анализе резистентных к даптомицину изолятов *Staphylococcus aureus*, однако их не удалось однозначно связать с механизмом резистентности к антибиотику [294]. Механизм резистентности к гауземицинам требует дальнейшего изучения, однако полученные данные подтверждают его существенное отличие от даптомицинового.

Таким образом, отсутствие накопления UDP-N-АсMur-PP ясно указывает на отсутствие связывания гауземицинами предшественников пептидогликана. Этот факт не обязательно означает, что биосинтез клеточной стенки не нарушается действием гауземицинов: они могут ингибировать белковые мишени и/или косвенно влиять на биосинтез клеточной стенки, например, за счет делокализации ключевых ферментов, ассоциированных с мембраной (как даптомицин). Тем не менее, отсутствие различий в восприимчивости к MRSA и MSSA указывает на то, что механизм связывания PBP с гауземицином должен отличаться от такового для  $\beta$ -лактамов. Другой вероятной мишенью гауземицинов является мембрана, и глубокие различия в спектрах активности гауземицинов и даптомицина указывают на различные молекулярные мишени антибиотиков. В то время как для даптомицина образование комплекса антибиотик-PG-липид II, по-видимому, имеет решающее значение [65], гауземицины неактивны в отношении энтерококков, чувствительных к даптомицину. Эти данные указывают на новый механизм антимикробного действия липопептидов гауземицинового типа, который требует дальнейшего тщательного изучения.

---

<sup>27</sup> Получение резистентных изолятов проводилось в лаборатории под руководством д.х.н. Остермана И.А. (Сколтех), полногеномное секвенирование выполнено д.б.н. Равиным Н.В. и д.б.н. Мардановым А.В. (ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии»)

## Глава 3. Экспериментальная часть

### 3.1 Оборудование и материалы

В работе использовали следующие материалы/сорбенты, растворители и реактивы: Сорбенты: Sephadex G25, Sephadex G10, C18 (POLIGOPREP 100-50C<sub>18</sub>). Растворители: ацетонитрил для ВЭЖХ (CH<sub>3</sub>CN, Biochem Chemopharma), метанол для ВЭЖХ (MeOH, Химмед), бутанол-1 хч (BuOH, Химмед), пропанол-1 для ВЭЖХ (PrOH, PanReac), пропанол-2 для ВЭЖХ (iPrOH, PanReac), DMSO (DMSO, Merck, США), этиловый спирт (EtOH, Химмед), ацетон (чда, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, Химмед), хлористый метилен (хч, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Химмед), бензол (Химмед), диэтиловый эфир (Химмед), н-гексан (Химмед), этилацетат (Химмед). Реактивы: 2,4-динитрофторбензол (C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>F(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, DNFB, Sigma-Aldrich), трифторуксусная кислота (TFA, Sigma-Aldrich), соляная кислота (конц. HCl, чда, Acros Organics), 3-хлоранилин (Sigma-Aldrich), трибромид бора (BBr<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich), хлорацетонитрил (Sigs-Aldrich), диэтил ацетамидомалонат (Sigma-Aldrich), натрий (Реахим), гидроксид натрия (Химмед), BODIPY FL NHS (Lumiprobe), N<sup>α</sup>-(2,4-Dinitro-5-fluorophenyl)-L-alaninamide (FDAA, реагент Мерфи, Sigma-Aldrich); фторфенилаланин (ICN Biomedicals Inc.) Водные растворы готовили с использованием MilliQ H<sub>2</sub>O.

Препаративную и полупрепаративную хроматографию проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе PuriFlash 4250 («Interchim») с детекцией на 190–800 нм и Knauer 2600 («Knauer»)

Аналитическую хроматографию проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Knauer 2600 («Knauer»).

Регистрацию электронных спектров поглощения и измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре UV-1600 («Shimadzu»).

Масс-спектрометрический контроль получаемых образцов проводили с помощью Agilent 6340 Ion Trap детектора с источником ионизации электрораспылением, соединенного с ВЭЖХ-системой Agilent 1100 HPLC system. Разделение образца проводилось на колонке YMC-Triart C18 (YMC) (50×2.1 мм, 1.9 мкм) путем элюирования линейным градиентом (2→98% за 10 мин ацетонитрила в воде с добавкой 0.1% муравьиной кислоты в оба элюента (при проведении анализа в хроматомасс-спектрометрическом режиме).

Высушивание образцов соединений осуществляли упариванием на вакуумном ротационном испарителе Hei-VAP Precision («Heidolph», Германия) при 42°C, на химической вакуумной станции PC 3003 Vario («Vacuubrand», Германия) при 25°C. Для концентрирования фракций в эппендорфах использовали вакуумный концентратор CentriVar

Concentrator (Labconco, США). Для лиофильной сушки образцов использовали лиофильную сушилку FreeZone 1 Liter Benchtop Freezy Dry Systems (Labconco, США).

Тонкослойную хроматографию выполняли на пластинках Merck TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, HPTLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 5 мкм.

Удельное вращение измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 241.

### **3.2 Масс-спектрометрия**

Эксперименты по определению тонкого изотопного распределения проводились на FTICR MS Bruker Apex Ultra с согласованной ячейкой, оснащенной сверхпроводящим магнитом 7 Тл и источником ионов с электрораспылением (ESI). Перед анализом образец разбавляли смесью вода-метанол 1:1 до 10 мг/л и затем вводили в источник ESI с помощью микролитрового насоса со скоростью потока 90 мкл/ч при давлении газа распылителя 138 кПа и давление сушильного газа 103 кПа. Нагреватель источника поддерживался при 200°C для обеспечения быстрой десольватации капель ESI. Широкополосные масс-спектры сначала калибровали внешне с помощью LC MS Tunemix (Agilent), а затем внутренне, добавляя к анализу калибровочный раствор. Выделение и фрагментацию интересующего иона проводили с помощью гексапольного CID с окном масс 10 m/z. Узкополосный режим использовался для анализа изотопного состава интересующего иона.

Спектры HRMS были зарегистрированы на приборе Bruker Daltonics micrOTOF-Q II с использованием ионизации электрораспылением (ESI). Измерения проводились в режиме положительных ионов со следующими параметрами: капиллярное напряжение 4500 В; диапазон масс от m/z 50 до 3000; внешняя калибровка (Electrospray Calibrant Solution, Fluka); давление небулайзера 0.4 бар; расход 3 мкл/мин; в качестве газа-носителя применялся азот (6 л/мин); температура интерфейса была установлена на 180°C.

Текущий контроль чистоты и состава получаемых соединений осуществлялся с помощью ESI LCMS. Использовался детектор Agilent 6340 Ion Trap с источником ионизации электрораспылением, соединенного с ВЭЖХ-системой Agilent 1100 HPLC system. Разделение пробы проводилось на колонке YMC-Triart C18 (YMC) (50×2.1 мм, 1.9 мкм) путем элюирования линейным градиентом (2→98% ацетонитрила в воде с добавкой 0.1% муравьиной кислоты в оба элюента (при проведении анализа в хроматомасс-спектрометрическом режиме).

### **3.3. Полногеномное секвенирование, аннотация и анализ**

Геномную ДНК выделяли из *Streptomyces* sp. INA-Ac-5812, проводили полное секвенирование, как описано в соответствующей публикации [295]. Геном *Streptomyces* sp. INA-Ac-5812 анализировали с помощью antiSMASH [296] для идентификации потенциальных кластеров биосинтетических генов. Кластеры гомологичных генов были иденти-

фицированы с помощью Multi-GeneBlast [297] с использованием базы данных MIBiG [298]. Предполагаемые функции ферментов были предложены в соответствии с предсказанной функцией ближайшего охарактеризованного родственника, идентифицированного с помощью Blast search [299] в NCBI. Последовательность биосинтетического генного кластера гауземицинов (Gau BGC) депонирована в GenBank под номером MZ394730.

### **3.4. Культивирование штамма-продуцента кристалломицинов 1 и 2**

Штамм INA 00887 из коллекции Института Гаузе культивировался, как описано ранее [13].

### **3.5. ВЭЖХ кристалломицинов 1 и 2**

Аналитическую ВЭЖХ проводили в следующих условиях: 20 мкл образца (раствор кристалломицина 2 мг/мл в 50% этаноле), колонка Waters Sunfire C18 5 мкм 4.6×250 мм, детекция при 210 нм, скорость потока 1 мл/мин, элюент А – 0.1% ТФУ в воде, Б – 0.1% ТФУ в ацетонитриле, линейный градиент В, % (время, мин): 30 (0) → 60 (25) → 75 (26) → 75 (30). Полупрепаративное разделение методом ВЭЖХ проводили в следующих условиях: 200 мкл образца (содержит 10.9 мг комплекса кристалломицина в 50% этаноле), колонка – Waters XBridge Prep C18 5 мкм OBD 19×150 мм, детекция по УФ-поглощению при 210 нм, скорость потока 6 мл/мин, элюент – 45% ацетонитрил/вода + 0.1% TFA (изократическое элюирование). После повторных анализов полученных фракций выбранные фракции с содержанием **1** или **2** более 95% были объединены. Органический растворитель упаривали в вакууме (температура бани 30°C), водный остаток лиофилизовали. Соединения **1** (2.0 мг) и **2** (6.8 мг) получали в виде белых аморфных порошков.

### **3.6. ЯМР-исследование кристалломицинов 1 и 2**

Эксперименты по ЯМР проводили на спектрометрах Avance-III-800 и Avance-III-600 (Bruker), оборудованных кризондами с тройным резонансом ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) диаметром 5 мм. Образцы Cryst-2 содержали около 10 мМ соединения в DMSO- $d_6$ , CD<sub>3</sub>OH или в H<sub>2</sub>O + 5% D<sub>2</sub>O. Образец Cryst-1 содержал около 4.5 мМ соединения в CD<sub>3</sub>OH. Спектры измеряли в диапазоне температур от 20 до 45°C. Следующие 2D-спектры ЯМР были измерены для Cryst-2 в DMSO- $d_6$  с использованием стандартных последовательностей импульсов с усилением градиента [201]: DQF-COSY, TOCSY ( $\tau_m$  80 мс), NOESY ( $\tau_m$  100, 200 и 400 мс), ROESY ( $\tau_m$  100 и 200 мс),  $^{15}\text{N}$ -HSQC,  $^{13}\text{C}$ -HSQC,  $^{13}\text{C}$ -HMBC и 3D TOCSY- $^{13}\text{C}$ -HSQC ( $\tau_m$  80 мс). Химические сдвиги  $^1\text{H}$  соотносились с остаточными сигналами CD<sub>2</sub>H из CD<sub>3</sub>OH и DMSO- $d_5$  при 3.33 и 2.50 м.д. соответственно. Химические сдвиги  $^{13}\text{C}$

и  $^{15}\text{N}$  указаны косвенно относительно тетраметилсилана (ТМС) и жидкого  $\text{NH}_3$ . Для оценки скорости обменных процессов интенсивности диагональных и обменных пиков в спектре NOESY были подогнаны к решению уравнений Блоха-МакКоннелла в программе Mathematica (версия 7, Wolfram Research). Шесть скоростей прямых реакций рассматривались как переменные. Обратные скорости рассчитывались из равновесных заселенностей состояний и прямых скоростей в предположении микроскопической обратимости. Скорости релаксации R1 были оценены из эксперимента по восстановлению с помощью одномерной инверсии ( $\sim 0.55 \text{ c}^{-1}$ ) и приняты равными для разных состояний.

### **3.7. Изучение антибактериальной активности кристалломицинов 1 и 2**

МИК определяли методом серийных разведений в соответствии с рекомендациями CLSI [300,301] с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  или без них. Подробная методика приведена в публикации [302].

### **3.8. Культивирование и характеристика штамма-продуцента астолидов А,В (3,4) *S. hygrosopicus* ВКПМ Ас2079**

Штамм-продуцент характеризовали и культивировали, как описано в работах [303,304].

### **3.9. Выделение и анализ астолидов А,В (3,4)**

В рамках работы проводилась оптимизация метода обогащения и разделения смеси астолидов, далее приведён оптимизированный протокол выделения. По ранее описанной методике было получено 0.7 л культуры продуцента. После центрифугирования (4000g, 10 мин) водную фазу декантировали и экстрагировали *n*-бутанолом (2×200 мл). Мицелий (36 г сырой биомассы) суспендировали в метаноле (150 мл) и озвучивали на ультразвуковой бане (40 кГц, 60 Вт, 30 мин при температуре 25°C). Метанольный экстракт декантировали, упаривали в вакууме с помощью роторного испарителя. Экстракт из водной фазы также упаривали досуха в вакууме. Температура бани при упаривании не должна превышать 50°C, в противном случае наблюдается деградация антибиотика. Массы после упаривания: бутанольный экстракт – 0.44 г, спиртовой экстракт – 0.51 г.

Объединенные экстракты растворяли в минимальном количестве метанола и наносили на октадецил-силикагель (использовался сорбент Macherey-Nagel POLYGO-PREP 100-50 C<sub>18</sub>, колонка с внутренним диаметром 4 см, высота слоя сорбента 4 см) «сухим» способом: сорбент (10–15% общего количества) добавляли небольшими порциями к метанольному раствору, при перемешивании, затем полученную взвесь высушивали в вакууме роторного испарителя и наносили остаток ровным слоем на верх хроматографи-



ческой колонки. Элюировали смесью ацетонитрила с водой (по 200 мл, содержащих 30, 45 и 60% ацетонитрила). Активные вещества содержались только во фракции с 60% ацетонитрила. Данную фракцию упаривали в вакууме до удаления ацетонитрила (температура бани не выше 35°C), полученный водный раствор замораживали и лиофильно высушивали в вакууме.

Полученный концентрат массой 28 мг растворяли в 1 мл 50% ацетонитрила и хроматографировали на препаративной колонке Waters XBridge Prep C18 5 мкм OBD 19×150 мм, детекция по поглощению при 250 нм, элюент – 45% ацетонитрил в воде (изократическое элюирование), скорость потока – 6 мл/мин. Фракции, содержащие чистые астолиды А и Б, собирали отдельно, упаривали в вакууме до удаления ацетонитрила (температура бани не выше 35°C), остаток замораживали и лиофильно высушивали. В результате получали 7.1 мг **3** (чистота 98.5%), и 7.0 мг **4** (чистота 99.0%).

Асталид А (**3**): бесцветный аморфный порошок,  $[\alpha]_D^{25}$  -49.7 (с 0.2, MeOH); УФ (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 205 (4.26), 254 (4.11), 337 (2.88) нм; ИК  $\nu_{\max}$  3421, 2931, 1728, 1709, 1666, 1603  $\text{cm}^{-1}$ ; HRESIMS m/z 1601.8584 (расчет для  $\text{C}_{82}\text{H}_{130}\text{O}_{29}$ , M+Na 1601.8590).

Асталид В (**4**): бесцветный аморфный порошок,  $[\alpha]_D^{25}$  -6.7 (с 0.2, MeOH); УФ (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 05 (4.26), 254 (4.11), 337 (2.88) нм; ИК  $\nu_{\max}$  3412, 2931, 1728, 1709, 1666, 1603  $\text{cm}^{-1}$ ; HRESIMS m/z 1617.8533 (расчет для  $\text{C}_{82}\text{H}_{130}\text{O}_{30}$ , M+Na 1617.8539).

### 3.10. ЯМР-исследование астолидов А, В (**3,4**)

Эксперименты ЯМР проводили с использованием 12 мг **3** и 7 мг **4** в 0.5 мл растворителя в обычных ампулах для ЯМР. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  регистрировали на спектрометрах 400 МГц (400.1 и 100.6 МГц соответственно) и 300 МГц (300.1 и 75.5 МГц соответственно) (Bruker AMX-III 400 и Bruker AVANCE III HD 300 соответственно) в  $\text{DMSO-}d_6$ , содержащий 0.05%  $\text{Me}_4\text{Si}$  в качестве внутреннего стандарта. Определение структур и стереохимии, а также отнесение сигналов  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  производилось с помощью 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, TOCSY, NOESY (время смешивания 500 мс), ROESY (время смешивания 250–300 мс),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  edited-HSQC, RESET-HSQC [305–312], HMBC и HMBC с постоянным временем, HSQC-COSY, HSQC-TOCSY, H2BC [313] и HSQC-NOESY. Все спектры ЯМР записаны при +30–32°C. Для проведения упомянутых экспериментов ЯМР использовались разные параметры (особенно время смешивания и настройка констант связи) и разные последовательности импульсов. Некоторые ключевые 2D-спектры регистрировались со временем накопления 6 дней.

### 3.11. Изучение биологических свойств астолидов А,В (**3,4**)

Антимикробную активность оценивали с помощью классического метода серийных разведений [300]. Активность в отношении клинических изолятов микромицетов оценивали дисково-диффузионным методом. Подробные методики приведены в соответствующей публикации [303].

Цитотоксичность астолидов исследовали с помощью МТТ-теста (анализ конверсии формазана). Для экспериментов использовали следующие клеточные линии: НСТ-116 (карцинома толстой кишки человека, АТСС), К-562 (линия клеток лейкемии человека) и ее Pgp-положительная сублиния К-562/4, резистентная к доксорубину, HL60 (промиелоцитарный лейкоз человека), U937 (монобластный лейкоз). Постнатальные фибробласты человека использовали как нормальную клеточную линию, а доксорубин использовали только в качестве положительного контроля. Подробная методика приведена в соответствующей публикации [303].

### **3.12 Культивирование штамма *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980 и выделение макролидов 5,6,7**

Микроорганизм-продуцент *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980, питательные среды и условия культивирования штамма-продуцента описаны ранее [314].

Культуральную жидкость (7.0 л) центрифугировали при 4000 g и декантировали водную фазу. Мицелий суспендировали в 700 мл 96% этанола. Этанольный экстракт (14.32 г) упаривали в вакууме. Полученный вязкий остаток промывали этилацетатом (3×100 мл). Этилацетатные вытяжки объединяли и упаривали в вакууме. Маслянистый остаток (3.48 г) хроматографировали на колонке Sephadex LH-20 (примерно 150 г воздушно-сухого сорбента), элюируя метилхлоридом. Анализ ВЭЖХ и биоавтография (хлористый метилен–этилацетат–метанол 10:5:1, тест-штамм *A. niger* АТСС 16404) активных фракций показали наличие 3 активных соединений. Объединенные активные фракции (237 мг) растворяли в минимальном количестве смеси 75% ацетонитрил-вода и хроматографировали с использованием системы MPLC (колонка: 24×250 мм; неподвижная фаза: силанизированный силикагель 60 (С2, 70–230 меш, Merck); поток: 4.5 мл/мин; элюент: 45% ацетонитрил в воде, изократическое элюирование; УФ-детекция на длине волны 206 нм). Отбирали фракции с содержанием **5**, **6** или **7** более 95% и объединяли. Органический растворитель удаляли в вакууме (температура бани 30°C, водный остаток лиофилизировали. Соединения **5** (71.2 мг), **6** (40.3 мг) и **7** (6.4 мг) были получены в виде белых аморфных порошков.

Ирумамицин, **5**. HRESIMS m/z 786.4391 (расчет для C<sub>41</sub>H<sub>65</sub>NO<sub>12</sub>, [M+Na]<sup>+</sup> 786.4399).

Физико-химические свойства были идентичны описанным [15].

X-14952B, **6**. HRESIMS  $m/z$  786.4395 (расчет для  $C_{41}H_{65}NO_{12}$ ,  $[M+Na]^+$  786.4399). Физико-химические свойства идентичны описанным в [16].

Изоирумамицин, **7**. HRESIMS  $m/z$  802.4712 (расчет для  $C_{42}H_{69}NO_{12}$ ,  $[M+Na]^+$  802.4712). Белый аморфный порошок, медленно разлагается при температуре  $>60^\circ\text{C}$ .  $[\alpha]_{\text{D}_2\text{O}} = +38.6$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $c = 0.21$ ). Характерное поглощение в УФ-области (200–400 нм) отсутствует. ИК  $\nu_{\text{max}}$  3380, 2917, 1709, 1539, 1080  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.13. ЯМР исследование макролидов **5, 6, 7**

ЯМР-эксперименты проводили с использованием 21 мг **5** и 18 мг **6** в 0.5 мл растворителя в обычных пробирках для ЯМР и 2.0 мг **7** в 0.2 мл растворителя в пробирке для ЯМР Shigemi. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  регистрировали на спектрометре 400 МГц (400.1 и 100.6 МГц, соответственно) (Bruker AMX-III 400) и на спектрометре 300 МГц (300.1 и 75.5 МГц, соответственно) (Bruker AVANCE-III-HD 400) в  $\text{CDCl}_3$ , содержащем 0.05%  $\text{Me}_4\text{Si}$  в качестве внутреннего стандарта. Определение структур и стереохимии, а также отнесение сигналов  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  были выполнены с помощью спектров 2D  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  COSY, TOCSY, NOESY (время смешивания 500 мс), ROESY (время смешивания 250 мс) и 2D  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HSQC, HMBC, HMBC с постоянным временем, HSQC-TOCSY (со временем смешивания 8–90 мс). Все спектры ЯМР записаны при  $+30$ – $32^\circ\text{C}$ . Стандартные современные последовательности градиентных импульсов из библиотеки Bruker были использованы для проведения упомянутых экспериментов ЯМР. Некоторые ключевые 2D-спектры были записаны за 4 накопления. Кроме того, относительная конфигурация ряда стереоцентров была определена путем измерения константы спин-спинового взаимодействия дальнедействующих гетероядерных  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  вместе с данными ROE. Точное определение дальнедействующих констант спин-спинового взаимодействия  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  было выполнено с использованием экспериментов  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQMBC и IPAP-HSQMBC 2D ЯМР, проведенных с использованием соответствующих последовательностей градиентных импульсов из библиотеки Bruker [315,316].

### 3.14. Изучение биологических свойств макролидов **5,6,7**

МИК определяли методом серийных разведений. Использованные тест-микроорганизмы перечислены в обсуждении результатов (Таблица 11). Для определения цитотоксичности использовали следующие клеточные линии: НСТ-116 (рак толстой кишки человека, АТСС), К-562 (линия клеток лейкемии человека), МСF-7 (рак груди человека). Постнатальные фибробласты человека (HPF) использовали в качестве нормальной клеточной линии, а доксорубин – в качестве положительного контроля. Подробные описания экспериментов приведены в соответствующей публикации [216].

### 3.15. Метод выделения F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-АТФ-азы *Saccharomyces cerevisiae*

Обычные пекарские дрожжи (Saf-Levure) выращивали при комнатной температуре в бульоне YPD с интенсивной аэрацией и добавлением 2% этанола на поздней логарифмической стадии роста (OD<sub>600</sub> около 1). Клетки осаждали центрифугированием и хранили при 70°C. Субмитохондриальные частицы получали как описано ранее [317] с модификацией процедуры гомогенизации: использовались шарики из диоксида циркония 0.5 мм (Tissue-Tek) и вортекс ИКА. Активность F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-АТФазы в этих субмитохондриальных частицах измеряли как уменьшение поглощения НАДФ при 340 нм в сочетании с гидролизом АТФ пируваткиназой и лактатдегидрогеназой (подробности опубликованы в [318]). Ирумамицин и олигомицин растворяли в DMSO и их разведения предварительно инкубировали с субмитохондриальными частицами в течение 30 мин при 25°C перед измерением АТФазы. Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения Prizm (GraphPad).

### 3.16 Синтез 4-хлоркинуренина 12

Спектры ЯМР регистрировали на приборе Bruker AMX-III 400 или Bruker AVANCE III HD 300 в CD<sub>3</sub>OD и DMSO-*d*<sub>6</sub>, содержащем 0.05% Me<sub>4</sub>Si в качестве внутреннего стандарта. Химические сдвиги (δ, м.д.) скорректированы по пикам остаточного растворителя CD<sub>3</sub>OD (<sup>1</sup>H: δ = 3.31 м.д., <sup>13</sup>C: δ = 49.2 м.д.), DMSO-*d*<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H: δ = 2.49 м.д., <sup>13</sup>C: δ = 39.5 м.д.). Константы спин-спинового взаимодействия (*J*) указаны в Гц.

#### 1-(2-Амино-4-хлорфенил)-2-хлорэтан-1-он [319,320]

Раствор 2.5 мл 3-хлоранилина (3.6 г, 28 ммоль) в 28 мл сухого бензола добавляли по каплям к перемешиваемому раствору 2.5 мл BBr<sub>3</sub> (6.63 г, 26 ммоль) в сухом бензоле (28 мл) при 0°C. К полученной смеси, содержащей комплекс 3-хлоранилин-бортрихлорид, последовательно добавляли хлорацетонитрил (1.8 мл, 2.15 г, 29 ммоль) и трихлорид алюминия (3.5 г, 26 ммоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 15 мин, затем кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч в инертной атмосфере. После охлаждения добавляли ледяную 2М соляную кислоту (объем, равный объему реакционной смеси), смесь кипятили с обратным холодильником до растворения осадка (примерно 30 мин). Охлажденную смесь экстрагировали дихлорметаном (три раза), и органический слой промывали водой, сушили (MgSO<sub>4</sub>) и концентрировали с получением целевого соединения (3.5 г, 69%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 46.30 (с, 2H); 7.57 (д, 1H, *J* = 8.72); 6.71 (д, 1H, *J* = 2.02); 6.64 (дд, 1H, *J* = 8.72, *J* = 2.02); 6.84 (ушир. с.). <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>) 46.3, 116.6, 116.8, 132.1, 132.8, 132.9, 152.0, 192.4.

#### Диэтил 2-ацетамидо-2-(2-(2-амино-4-хлорфенил)-2-оксоэтил) малонат [249]

Натрий (0.18 г, 7.8 ммоль) растворяли в абсолютном этаноле (14 мл) и добавляли диэтилацетамидмалонат (1.697 г, 7.8 ммоль) в абсолютном этаноле (4 мл). Раствор нагревали при 45°C в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры по каплям добавляли раствор 1.6 г (7.8 ммоль) 1-(2-амино-4-хлорфенил)-2-хлорэтан-1-она. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч при комнатной температуре и затем нагревали при 40°C в течение 4 ч. Полученную смесь упаривали досуха, остаток обрабатывали водой (52 мл) и 1М NaOH (3.5 мл) и экстрагировали диэтиловым эфиром (3×14 мл). Объединенные органические экстракты промывали водой, сушили и упаривали досуха с получением сырого продукта, который очищали флэш-хроматографией (элюирование смесью *n*-гексан-этилацетат от 9:1 до 11:9) с контролем ТСХ (*n*-гексан-этилацетат 3:2) с получением 0.942 г (35%) продукта в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.57 (д, 1H, J = 8.72); 6.70 (д, 1H, J = 2.02); 6.60 (дд, 1H, J = 8.72, J = 2.02); 6.84 (ушир. с., 2H); 4.51 (с, 2H); 4.24 (кв, 2H, J = 7.10); 1.21 (т, 3H, J = 7.10); 1.95 (с, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>) 13.9; 23.6; 43.2; 62.9; 64.0; 116.6; 116.8; 132.1; 132.7; 140.8; 152.0; 167.5; 169.6; 197.7.

#### 4-Cl-кинуренин, 3-(4-хлоантранилоил)-DL-аланин (10) [249]

Раствор диэтил-2-ацетамидо-2-(2-(2-амино-4-хлорфенил)-2-оксоэтил) малоната (0.942 г, 2.4 ммоль) в 37% HCl (10 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 6 ч при интенсивном нагревании и перемешивании. Реакционную смесь упаривали в вакууме, остаток обрабатывали водой и промывали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Водный слой концентрировали, остаток растворяли в воде и рН полученного раствора доводили до 6.5 с помощью 2М NaOH, получая сырой продукт в виде твердого вещества желтого цвета. Полученное твердое вещество промывали небольшим количеством DMSO с получением 0.345 мг (61%) продукта в виде бледно-желтого твердого вещества. T<sub>пл</sub> = 225°C (с разложением); литературные данные - 227°C (с разложением) [249]. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D) δ 3.77 (м, 2H); 4.44 (ушир.с, 1H); 6.61 (д, 1H, J = 7.90); 6.81 (с, 1H); 7.71 (д, 1H, J = 7.90). <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D) 38.3; 50.8; 114.8; 115.7; 116.3; 132.8; 140.9; 152.1; 173.1; 198.4.

### **3.17 Гидролиз природного пептида для изучения флуоресцентной аминокислоты и ее абсолютной конфигурации**

Чтобы выяснить структуру флуоресцентной аминокислоты в комплексе природных пептидов и антибиотиков, использовали стандартный подход для гидролиза пептидов [240]. Образец 50 мг концентрата гауземицина обрабатывали 6М HCl (5 мл) в герметичном флаконе при 110°C в течение 120 ч. Полученный гидролизат упаривали, остаток растворяли в небольшом количестве EtOH и разделяют препаративной ТСХ (бутанол–вода–уксусная кислота 16:13:7); флуоресцентные фракции объединяли и разделяли далее с

помощью ВЭЖХ (время удерживания 14.5 мин, линейный градиент 30 мин 10→50% MeCN в 0.1% TFA) с получением образца чистого соединения. HRMS C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (m/z): вычислено для [M+Na]<sup>+</sup> 265.0350, обнаружено 265.0351.

Водный раствор аминокислоты (50 мМ, 25 мкл, 1.25 мкмоль) в пластиковой пробирке на 1.5 мл обрабатывали 1% ацетоновым раствором L-FDAA (0.5 мг в 50 мкл, 1.8 мкмоль) с использованием молярного отношения L-FDAA/аминокислота 1.4:1, затем NaHCO<sub>3</sub> (1М, 10 мкл, 10 мкМ). Растворы встряхивали при 30–40°C в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры к реакционной смеси добавляли HCl (1М, 10 мкл, 10 мкмоль). После перемешивания содержимое сушили в вакуумном концентраторе. Затем остаток растворяли в DMSO (250 мкл), дополнительно разбавляли DMSO в семь раз, и полученные растворы использовали в качестве 20 мкл образцов для ВЭЖХ анализа. Образец элюировали 1 мл/мин, 90 мин, линейный градиент 10%→50% MeCN в 0.1 М буфере NH<sub>4</sub>OAc/TFA при pH 3.0. Дериватизацию выделенного 4-Cl-L-Куп и синтетического 4-Cl-DL-Куп проводили аналогичным образом. Рацемический синтетический 4-Cl-DL-Куп дал два дериватизированных соединения со временем удерживания 71.5 мин и 78.9 мин, что соответствует изомерам аминокислот L- и D-конфигурации соответственно. Производное природной аминокислоты имело время удерживания 71.5 мин.

### 3.18 Синтез флуоресцентных производных 13, 14

Спектры ЯМР регистрировали на приборе Bruker AMX-III 400 или Bruker AVANCE III HD 300 в CD<sub>3</sub>OD и DMSO-*d*<sub>6</sub>, содержащем 0.05% Me<sub>4</sub>Si в качестве внутреннего стандарта. Химические сдвиги (δ м.д.) скорректированы по пикам остаточного растворителя CD<sub>3</sub>OD (<sup>1</sup>H: δ = 3.31 м.д., <sup>13</sup>C: δ = 49.2 м.д.), DMSO-*d*<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H: δ = 2.49 м.д., <sup>13</sup>C: δ = 39.5 м.д.). Константы спин-спинового взаимодействия (*J*) указаны в Гц.

Na-[3-(4,4-дифтор-5,7-диметил-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен-3-ил)пропаноил]-3-(4-хлоантранилоил)-DL-аланин (13)

К перемешиваемому раствору 4-Cl-DL-кинурина **12** (10 мг, 4.0 мкмоль) в DMSO (250 мкл) добавляли одной порцией раствор активированного эфира BODIPY FL NHS (17.7 мг, 4.5 мкмоль) в DMSO (250 мкл) и DIPEA (37 мкл, 20 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока контроль ТСХ (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH 5:1) не показал исчезновения исходного соединения. Затем смесь разделяли флэш-хроматографией на немодифицированном силикагеле, примеси удаляли с помощью системы элюирования CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH 10:1, а фракцию, содержащую соединение **13**, элюировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH 1:1. Полученное неочищенное соединение очищали препаративной ТСХ (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH 5:1) и анализировали аналитической ВЭЖХ (rt = 10.1 мин, линейный градиент 30 мин, 50→70% MeCN в 0.1М буфере AcONH<sub>4</sub>/TFA, pH 3,0). Удаление растворителя дает 13.3 мг (62%)

соединения **13** в виде аморфного твердого вещества красного цвета.  $R_f$  0.55 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH, 5: 1). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CD<sub>3</sub>OD) δ 2.24 (с, 3H), 2.48 (с, 3H), 2.56–2.76 (м, 2H), 3.15–3.23 (м, 2H), 3.40–3.63 (м, 2H), 4.64 (дд,  $J = 5.92, 4.20$ , 1H), 6.15 (с, 1H), 6.29 (д,  $J = 4.01$ , 1H), 6.49 (дд,  $J = 8.70, 2.04$ , 1H), 6.71 (д,  $J = 2.04$ , 1H), 6.84 (д,  $J = 4.01$ , 1H) 7.19 (с, 1H) 7.67 (д,  $J = 8.70$ , 1H). <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, CD<sub>3</sub>OD) 11.4, 15.0, 25.8, 36.43, 43.0, 52.4, 116.2, 117.2, 117.5, 118.0, 121.3, 125.7, 129.8, 134.2, 135.0, 136.5, 141.0, 145.7, 153.7, 158.5, 161.2, 173.7, 178.3, 200.7. HRMS C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>BClF<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (m/z): вычислено для [M–HF+H]<sup>+</sup> 497.1562, обнаружено 497.1564; вычислено для [M+H]<sup>+</sup> 517.1624, обнаружено 517.1628.

#### N<sup>α</sup>-[4-(периллен-3-илэтинил)бензоил]-3-(4-хлоантранилоил)-DL-аланин (**14**)

Перемешиваемый раствор 4-Cl-DL-кинуренина **12** (10 мг, 4.0 мкмоль) в DMSO (250 мкл) обрабатывали сложным эфиром PEPe Pfr (25.5 мг, 4.5 мкмоль) в DMSO (450 мкл) и DIPEA (37 мкл, 20 мкл). мкмоль). Смесь перемешивали до тех пор, пока контроль ТСХ (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH–AcOH, 5:0.2:0.1) не показал, что реакция завершена. Затем смесь разделяли флэш-хроматографией на немодифицированном силикагеле, примеси элюировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH 10:1. Фракцию, содержащую соединение **14**, элюировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH–AcOH 1:1:0.5. Неочищенное соединение очищали препаративной ВЭЖХ, колонка XBridge Prep C18 5 μm 19×150 мм. Удаление ацетонитрила с последующей лиофилизацией дало 20.2 мг (79%) соединения **14** в виде аморфного твердого вещества оранжевого цвета (rt = 18.6 мин, линейный градиент 20 мин, 75→95% MeCN в 0.1% TFA).  $R_f$  0.58 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH–AcOH, 5:0.2:0.1). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.49–3.56 (м, 2H), 4.93–5.01 (м, 1H), 6.58 (дд,  $J = 8.66, 2.03$ , 1H), 6.85 (д,  $J = 2.03$ , 1H), 7.59 (м,  $J = 7.83$ , 2H), 7.73 (м,  $J = 7.95$ , 1H), 7.78–7.90 (м, 5H), 7.95 (д,  $J = 8.34$ , 2H), 8.28 (д,  $J = 8.34$ , 1H), 8.41 (д,  $J = 8.19$ , 1H), 8.43 (д,  $J = 7.63$ , 2H), 8.49 (д,  $J = 7.63$ , 1H) 8.76 (д,  $J = 7.39$  Гц, 1H), 12.68 (ушир. с., 1H) <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 40.4, 48.8, 89.7, 94.8, 114.3, 115.2, 115.5, 118.8, 120.3, 121.4, 121.4, 121.8, 125.2, 125.5, 126.9, 127.0, 127.6, 127.7, 128.1, 128.4, 128.8, 129.7, 130.0, 131.0, 131.3, 131.5, 131.8, 133.2, 133.7, 133.8, 134.1, 138.7, 152.1, 165.3, 173.0, 197.4. HRMS C<sub>39</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (m/z): вычислено для [M–H]<sup>–</sup> 619.1419, обнаружено 619.1523.

### **3.19 Изучение спектральных характеристик соединений **12** **13**, **14****

Спектры поглощения в УФ/видимой области регистрировали с использованием спектрофотометра Varian Cary 100 UV-Vis. Флуоресцентные исследования проводили на люминесцентном спектрометре Perkin–Elmer LS 55. Квантовые выходы флуоресценции измеряли относительным методом с использованием сульфата хинина (Ф<sub>F</sub> 0.54) в 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [321] в качестве первого стандарта и 9,10-дифенилантрацена в циклогексане (Ф<sub>F</sub> 0.90) в качестве второго стандарта [322]. Предел погрешности измерения квантового вы-

хода составляет  $\pm 10\%$ . Когда для сравнения использовали BODIPY FL и активированный сложный эфир фенилэтинилперилена, их гасили 1 экв. этаноламина в MeOH.

### **3.20 Культивирование штамма *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980 и выделение гауземицинов 10, 11**

Микроорганизм-продуцент *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980, питательные среды и условия культивирования штамма-продуцента описаны ранее [314].

Культуральную жидкость (271 мл) центрифугировали 20 мин при 5000g. Водную фазу декантировали, подкисляли HCl до pH 4 и экстрагировали *n*-бутанолом (2×50 мл). Органические вытяжки объединяли и упаривали досуха. Сухой остаток обезжиривали: заливали 20 мл этилацетата и озвучивали на ультразвуковой бане (40 кГц, 60 Вт, 10 мин при температуре 25°C), затем раствор фильтровали. Раствор, содержащий макролидные антибиотики семейства вентурицидина, обрабатывали как описано в разделе 3.12, а с экстрактом (1.3 г), оставшимся на фильтре, проводили дальнейшую работу.

Мицелий суспендировали в 50 мл этанола, озвучивали в ультразвуковой бане (40 кГц, 60 Вт, 20 мин при температуре 25°C) и фильтровали. Фильтрат упаривали в вакууме. Сухой остаток обезжиривали описанным выше способом. Масса экстракта мицелия составляла в среднем 0.8 г. Экстракт мицелия наравне с экстрактом водной фазы может быть использован для получения гауземицинов.

Экстракт (1.3 г) очищали от низкомолекулярных примесей методом гель-хроматографии на колонке (22×70 мм) с сорбентом Sephadex G15 с использованием изократического элюирования (20% метанола в воде, скорость потока 7 мл/мин, детекция по поглощению при 210, 260, 360, 410 нм). Собирают фракцию 1 (0.44 г) с временем удерживания 0–10 мин.

Фракцию 1 растворяли в 4 мл 50%-ного ацетонитрила и хроматографировали на колонке (25×130 мм) с обращеннофазовым сорбентом (октадецилсиликагель), с использованием ступенчатого элюирования (скорость потока 14 мл/мин, ступени по 5 мин: 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80% ацетонитрил в воде; детекция по поглощению при 210, 260, 360, 410 нм). Емкость колонки – 0.2–0.3 г смеси. Фракция с временем удерживания 16.0–17.0 мин по данным хроматомасс-спектрометрии содержала в основном гауземицины А и В, и примеси. В результате разделения 0.440 г смеси получали 0.062 г данной фракции.

Образец полученной смеси гауземицинов (0.12 г) растворяли в 2.4 мл водного аммиачного раствора с pH 10. Полученный раствор подкисляют водным раствором соляной кислоты до pH 5 и наблюдали образование темно-коричневого осадка. Раствор фильтро-



вали, полученный осадок растворяли в 1.1 мл водного аммиачного раствора с pH 10 и подкисляли водным раствором соляной кислоты до pH 5, вновь наблюдали образование темно-коричневого осадка. В результате получали объединенный раствор после двух осаждений и осадок массой 0.053 г. Раствор после двух осаждений (3 мл) экстрагировали бутанолом (3×3 мл). Органические вытяжки объединяли, промывали подкисленной водой с pH 5 и упаривали досуха. В результате получали порошок (0.036 г) с желтоватым оттенком. Данный концентрат антибиотика содержит в основном гауземицины А и В, его использовали для выделения индивидуальных соединений.

Концентрат антибиотика (2 мг в 500 мкл 50%-ного ацетонитрила) хроматографировали на колонке VDSpher PUR 100 SIL (250×10 мм, 5 мкм) с использованием в качестве элюента смеси растворителей 0.1% трифторуксусной кислоты, 4% воды, 24% пропанола-1 и 71.9% ацетонитрила по объему. Скорость потока 6 мл/мин, детекция по поглощению в УФ при 205 нм. Фракция с временем удерживания 8.0–10.0 мин содержит гауземицин А, фракция с временем удерживания 10.0–13.0 мин содержит гауземицин В. Органические растворители удаляли из полученных фракций при пониженном давлении, получающийся водный раствор замораживали и лиофилизовали. Содержание основных компонентов во фракциях контролировали хроматографически и масс-спектрометрически, стадию хроматографии гидрофильных взаимодействий повторяли до полного удаления примесей. Масс-спектрометрический контроль получаемых образцов проводили с помощью детектора Agilent 6340 Ion Trap с источником ионизации электро-распылением, соединенного с ВЭЖХ-системой Agilent 1100 HPLC system. Разделение пробы проводилось на колонке YMC-Triart C18 (YMC) (50×2.1 мм, 1.9 мкм) путем элюирования линейным градиентом (2→98% ацетонитрила в воде с добавкой 0.1% муравьиной кислоты в оба элюента (при проведении анализа в хроматомасс-спектрометрическом режиме). Получали соединения **10** и **11** в виде белых аморфных порошков.

Гауземицин А (**10**): бесцветный аморфный порошок;  $[\alpha]^{22}_D = -6.9$  (с 0.3, MeOH); УФ (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 203 (4.7), 229 (4.5), 262 (4.4), 363 (3.7) нм; ИК  $\nu_{max}$  3330, 3070, 2960, 2930, 1660, 1540, 1450, 1200, 1180, 1070  $cm^{-1}$ ; HRESIMS m/z 1845.788 (вычислено для  $C_{84}H_{116}ClN_{17}O_{28}$ ,  $M^+$  1845.786).

Гауземицин В (**11**): бесцветный аморфный порошок;  $[\alpha]^{25}_D = -9.7$  (с 0.4, MeOH); УФ (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 204 (4.7), 229 (4.5), 262 (4.4), 363 (3.7) нм; ИК  $\nu_{max}$  3330, 3070, 2960, 2930, 1660, 1540, 1450, 1230, 1200, 1180, 1070  $cm^{-1}$ ; HRESIMS m/z 959.41873 ( $z = 2$ ) (вычислено для  $C_{87}H_{121}ClN_{18}O_{29}$ ,  $[M+2H]^{2+}$  959.41905).

### 3.21 ЯМР исследование гауземицинов **10**, **11**

Образцы ЯМР гауземицинов А и В содержали около 8 мМ соединений в DMSO-*d*<sub>6</sub>. Спектры измеряли при 30 и 45°C. 2D-спектры ЯМР регистрировали с использованием стандартных импульсных последовательностей: DQF-COSY, TOCSY ( $\tau_m = 80$  мс), NOESY ( $\tau_m = 50, 100, 200, 300$  и  $400$  мс), <sup>15</sup>N-HSQC, <sup>13</sup>C-HSQC, <sup>13</sup>C-HMBC. Химические сдвиги <sup>1</sup>H соотносились с остаточными сигналами CD<sub>2</sub>H DMSO-*d*<sub>5</sub> при 2.50 м.д. Химические сдвиги <sup>13</sup>C и <sup>15</sup>N указаны относительно тетраметилсилана (TMS) и жидкого NH<sub>3</sub>. Структуры непротеиногенных аминокислотных остатков с различной конфигурацией хиральных центров и N-концевой жирнокислотной группы были созданы в программе Avogadro (версия 1.2.0). Геометрия этих остатков была оптимизирована путем минимизации энергии в Avogadro и перенесена в библиотеку программы CYANA [258]. Расчеты пространственной структуры выполнялись в CYANA (версия 3.98.5). Константы спин-спинового взаимодействия <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H были измерены в спектре DQF-COSY с помощью программы ACME [323]. Программа MOLMOL [324] использовалась для визуального анализа структур и рисунков. Данные полученных спектров и их отнесение представлены в приложении (Приложение 13).

### 3.22 Дегликозилирование гауземицинов 10, 11

Образец гауземицина А (2.05 мг) растворяли в 50% метаноле в воде (1 мл) с 2 М трифторуксусной кислотой. Реакцию проводили в закрытом флаконе при 50°C, 6 ч. Остаток, полученный после упаривания реакционной массы в вакууме, растворяли в воде (1 мл) и переносили в верхнюю часть колонки (0.5×2.5 см) с С18-силикагелем и элюировали водой. Полученные фракции контролировали методом ТСХ (этилацетат–изопропанол–вода, 5:3:1). Фракции, содержащие арабинозу (*R*<sub>f</sub> 0.42), собирали и лиофилизовали. Высушенный материал (0.11 мг) растворяли в воде (2 мл) и измеряли оптическое вращение через 1 ч, а также для стандартных образцов D- и L-арабинозы. Изолированная арабиноза ( $[\alpha]_D = +0.0131^\circ$ ) показала аналогичный результат с L-арабинозой ( $[\alpha]_D = +0.0142^\circ$ ).

### 3.23 Хиральная дериватизация гидролизата гауземицинов

Хиральную дериватизацию гидролизата гауземицина проводили по стандартной методике анализа пептидных гидролизатов [250,325]. 0.6 мг образцов гауземицина (гауземицин В, концентрат гауземицина) гидролизали в 1 мл 6 М HCl при 115°C в течение 6 дней. После сушки в вакууме полученный гидролизат суспендировали в H<sub>2</sub>O. Этот раствор был разделен на две аликвоты. К каждой аликвоте гидролизата гауземицинов и к аликвоте (25 мкл) 50 мМ раствора (1.25 мкМ) каждого стандарта аминокислот (смесь D, L или DL) добавляли 10 мкл 1М раствора NaHCO<sub>3</sub> (10 мкМ). Добавляли 1% (мас./об.) ацетонового раствора (50 мкл) L-FDAA (0.5 мг, 1.8 мкМ), молярное отношение FDAA к

аминокислоте 1.4:1. Реакционные смеси перемешивали и нагревали 60 мин при 40°C. После охлаждения до комнатной температуры реакции гасили добавлением 1М HCl (10 мкл) и сушили в вакууме. Затем каждый остаток растворяли в DMSO (0.25 мл). Их разводили 1:7, и 20 мкл каждого образца анализировали с помощью ВЭЖХ и LCMS. ВЭЖХ-анализ выполняли на колонке Sunfire (C18; 5 мкм, 4.6×250 мм) с линейным градиентом 10→50% ацетонитрила в 0.1 М буфере NH<sub>4</sub>OAc/TFA при pH 3.0 в течение 90 мин, скорость потока 1 мл/мин. Непрореагировавший реагент Мерфи и продукт его гидролиза использовали в качестве внутренних стандартов для корректировки времени удерживания. Полученное в результате сравнение времени удерживания для стандартных аминокислот и продуктов гидролиза представлено в обсуждении результатов (Таблица 15). Отнесение пиков при ВЭЖХ гидролизата подтверждена экспериментами LCMS (Приложение 12).

### **3.24 Изучение биологических свойств гауземицинов А,В**

Антимикробная активность 5812 *in vitro* определялась методом серийных разведений в соответствии с рекомендациями CLSI [301]. Цитотоксичность препаратов оценивали с помощью стандартного МТТ-теста [326], в отношении клеточных линий COLO357, J774, EL-4, Colon26, HT-29. Подробная методика приведена в соответствующей публикации [216].

### **3.25 Химическая саплементация штамма-продуцента гауземицинов (кормление)**

Штамм *Streptomyces* sp. INA-Ac-5812 выращивали в инкубаторе-шейкере в течение 7 дней при 28°C (в автоклавированных колбах Эрленмейера на 250 мл, содержащих 50 мл среды) с использованием питательной среды следующего состава, %: соевая мука – 3.0; глюкоза – 3.0; NaCl – 0.3; CaCO<sub>3</sub> – 0.3. После 18 и 40 ч культивирования к штамму-продуценту добавляли фторированные аналоги фенилаланина (*o*-фтор-DL-фенилаланин и *n*-фтор-DL-фенилаланин) в виде водной суспензии до конечной концентрации 2 мМ. Культуры дополнительно инкубировали в течение 4 дней перед экстракцией и дальнейшим анализом с помощью экспериментов LCMS и MSn. Все эксперименты были повторены независимо в трех повторах для каждого соединения. Параллельно культуру *Streptomyces* sp. INA-Ac-5812 выращивали на среде без добавок в качестве контроля.

### **3.26 Анализ накопления UDP-NAcMur-пентапептида в *S.aureus***

Накопление UDP-MurNAc-PP измеряли в *S. aureus* по описанной методике [74] с небольшими изменениями. Культура *S. aureus* ATCC 29213 в средней логарифмической фазе роста (OD<sub>600</sub> = 0.5), предварительно обработанная хлорамфениколом (130 мкг/мл),

была разделена на 10 мл аликвоты и подвергнута воздействию тест-антибиотика  $10 \times \text{MIC}$  (гауземицина В, ванкомицина). После 1 ч инкубации при  $37^\circ\text{C}$ , 240 об/мин клетки осаждали и экстрагировали кипящей водой. Растворимые экстракты лиофилизировали, ресуспендировали в воде (150 мкл) и аликвоту 20 мкл анализировали на колонке Waters Sunfire C18 5 мкм  $4.6 \times 250$  мм с изократической элюцией (1.0 мл/мин, 50 мМ фосфат натрия, pH 5.0) при  $25^\circ\text{C}$  и детекцией по поглощению при 260 нм). Проводили два независимых эксперимента. Идентичность и чистоту образца UDP-MurNAc-PP подтверждали масс-спектрометрически. Пик с временем удерживания 29 мин собирали и анализировали с помощью ESI-HRMS.

### **3.27 Бактериальное цитологическое профилирование**

Клетки *B. subtilis* выращивали в среде LB при  $37^\circ\text{C}$  до тех пор, пока оптическая плотность при 600 нм ( $\text{OD}_{600}$ ) не составила  $\sim 0.20$ . Затем клетки обрабатывали тестируемыми веществами, как описано ранее [273,275]. После фиксированного времени воздействия клетки окрашивали FM 4-64 (1 мкг/мл) для визуализации клеточных мембран; DAPI (1 мкг/мл) для визуализации ДНК и SYTOX Green (1 мкг/мл), который обычно исключается из клеток с неповрежденной мембраной, но ярко окрашивает лизированные клетки [273].

### **3.28 Эксперименты на модельных мембранах**

Практически не содержащие растворителей плоские липидные бислои получали в соответствии с описанным методом [327]. Подробная методика проведения эксперимента на модельных мембранах представлена в соответствующей публикации [295].

## Заключение

Подводя итог, можно сказать, что в работе изучены химические, физико-химические, спектральные и биологические свойства ряда природных соединений. Установлена структура ранее выделенного циклопептидного антибиотика кристалломицина и показано, что он состоит из двух компонентов, идентичных ранее описанным аспартоцинам В,С. Изучены биологическая активность и конформационные превращения этого антибиотика в растворе, подтверждена зависимость от кальция для антибиотического действия этих соединений.

Из культуры штамма-продуцента *S. hygroscopicus* ВКПМ Ас2079 выделены новые антибиотики макролидной природы – астолиды А,В, установлена их структура, включая абсолютные конфигурации атомов, и спектр биологической активности. Показано, что астолиды А,В содержат два агликона: 36-членный полиолильный макролид и производное 1,4-нафтохинона.

Установлены структуры трех биологически активных соединений, выделенных из липофильной фракции экстракта культуральной жидкости оригинального штамма *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980, что позволило отнести их к известным антибиотикам ирумацину и Х14952В, а также новому антибиотику этой группы изоирумацину, представляющему собой изомер ирумацина с уменьшенным размером макролактонного цикла (18-членный цикл вместо 20-членного). Впервые установлена конфигурация стереоцентров С3,С8,С23,С24 ирумацина. Показана критическая важность сайта замыкания макролида для реализации антифунгальных свойств. Проанализирован предполагаемый путь биосинтеза ирумацина, выявлены особенности доменной архитектуры ключевого фермента биосинтеза – поликетидсинтазы I типа.

Установлены структуры двух индивидуальных компонентов (названных гауземицинами А,В) липогликопептидного антибиотического комплекса, содержащегося в гидрофильной фракции экстракта культуральной жидкости штамма *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980. Обнаружено, что гауземицины проявляют высокую активность против узкого спектра грамположительных бактерий. Предложен путь биосинтеза новых антибиотиков, в том числе изучен механизм биосинтеза 2-амино-4-гидрокси-4-фенилбутановой кислоты, впервые найденной в природном пептиде. Структурная новизна и отличающийся от известных аналогов механизм антибактериального действия позволяет отнести гауземицины к новому подклассу пептидных антибиотиков.

## 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. hygrosopicus* ВКПМ Ас2079 представляют собой близкие к известным макролиды, содержащие два агликона: 36-членный полиолиновый макролид и производное 1,4-нафтохинона, названные астолидами А,В.
3. Наряду с известными 20-членными антифунгальными макролидами (ирумамицином и Х14952В), из антифунгальной фракции продуцента *Streptomyces* sp. ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980 был выделен минорный компонент, названный изоирумамицином, 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 А,В, содержащих ряд структурных особенностей: редкие непротеиногенные аминокислоты (2-амино-4-гидрокси-4-фенилбутановая кислота, 4-С1-кинуруенин), 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 ирумамицина и нового пептидного антибиотика гауземицина.

## Благодарности

В первую очередь автор выражает благодарность Коршуну В.А. за руководство диссертационной работой, а также Тюрину А.П. и Барановой А.А. за помощь и поддержку.

Автор благодарен сотрудникам Института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе Лапчинской О.А., Тренину А.С., Бычковой О.П., Маланичевой И.А. за предоставление культуральных жидкостей с биологической активностью, Тренину А.С., Бычковой О.П., Маланичевой И.А., Грамматиковой Н.Э., Деженковой Л.Г. за определение активности индивидуальных соединений и сырцов антибиотиков. Кроме того, автор благодарит коллег из других организаций за плодотворное научное сотрудничество: Шенкарева З.О., Парамонова А.С. (ИБХ РАН) и Новикова Р.А. (ИМБ РАН) за проведение ЯМР-исследований; Свирщевскую Е.В. (ИБХ РАН) за измерение цитотоксичности и предоставление возможностей для проведения биоимиджинга; Остермана И.А. (Сколтех) и Терехова С.С. (ИБХ РАН) за ценные консультации и экспериментальные данные; Чистова А.А., Иванова И.А. (ИБХ РАН), Слюндину М.С. (ИНХС РАН), Бирюкова М.В. (МГУ им. М.В. Ломоносова), Сольева П.Н. (ИМБ РАН) за масс-спектрометрические данные; Равина Н.В. и Марданова А.В. (ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии») за полногеномное секвенирование штамма-продуцента.

## Список литературы

- (1) Demain A.L. Antibiotics: natural products essential to human health. *Med. Res. Rev.* **2009**, 29, 6, 821–842.
- (2) Högberg L.D., Heddini A., Cars O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, 31, 11, 509–515.
- (3) Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D.L., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J., Carmeli Y., Ouellette M., Outtersson K., Patel J., Cavalieri M., Cox E.M., Houchens C.R., Grayson M.L., Hansen P., Singh N. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, 18, 3, 318–327.
- (4) Liu Y.-Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.-X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu L.-F., Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu J.-H. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, 16, 2, 161–168.
- (5) Ng V., Chan W.C. New found hope for antibiotic discovery: lipid II inhibitors. *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 36, 12606–12616.
- (6) Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. *J. Antibiot.* **2017**, 70, 1, 3–24.
- (7) Sanglard D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Front. Med.* **2016**, 3, 11.
- (8) Avanzi C., del-Pozo J., Benjak A., Stevenson K., Simpson V.R., Busso P., McLuckie J., Loiseau C., Lawton C., Schoening J., Shaw D.J., Piton J., Vera-Cabrera L., Velarde-Felix J.S., McDermott F., Gordon S.V., Cole S.T., Meredith A.L. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science* **2016**, 354, 6313, 744–747.
- (9) Chanteau S. Plague, a reemerging disease in Madagascar. *Emerg. Infect. Dis.* **1998**, 4, 1, 101–104.
- (10) Stratton C.F., Newman D.J., Tan D.S. Cheminformatic comparison of approved drugs from natural product versus synthetic origins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 21, 4802–4807.
- (11) Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 3, 629–661.
- (12) Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, 83, 3, 770–803.
- (13) Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Коваленкова В.К., Ильичева Н.П., Бражникова М.Г., Ломакина Н.Н., Ковшарова И.Н., Шорин В.А., Кунрат И.А., Шаповалова С.П. Кристалломицин, новый антибактериальный антибиотик. *Антибиотики* **1957**, 2, 6, 9–14.
- (14) Heinemann B., Kaplan M.A., Muir R.D., Hooper I.R. Amphomycin, a new antibiotic. *Antibiot. Chemother. (Northfield)* **1953**, 3, 12, 1239–1242.
- (15) Omura S., Nakagawa A., Tanaka Y. Structure of a new antifungal antibiotic, irumamycin. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 27, 5413–5415.
- (16) Omura S., Nakagawa A., Imamura N., Kushida K., Liu C.-M., Sello L.H., Westley J.W. Structure of a new macrolide antibiotic, X-14952B. *J. Antibiot.* **1985**, 38, 5, 674–676.
- (17) Singh M., Chang J., Coffman L., Kim S.J. Solid-state NMR characterization of amphomycin effects on peptidoglycan and wall teichoic acid biosyntheses in *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 31757.
- (18) Butler M.S., Hansford K.A., Blaskovich M.A.T., Halai R., Cooper M.A. Glycopeptide antibiotics: back to the future. *J. Antibiot.* **2014**, 67, 9, 631–644.



- (19) Singh P., Cameotra S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 3, 142–146.
- (20) Jacques P. Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. In *Biosurfactants: From Genes to Applications*; Soberón-Chávez, G., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011; pp 57–91.
- (21) Hancock R.E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.* **2001**, *1*, 3, 156–164.
- (22) Storm D.R., Rosenthal K.S., Swanson P.E. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 1, 723–763.
- (23) Cochrane S.A., Vederas J.C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Med. Res. Rev.* **2016**, *36*, 1, 4–31.
- (24) Baltz R.H., Miao V., Wrigley S.K. Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 6, 717–741.
- (25) Strieker M., Marahiel M.A. The structural diversity of acidic lipopeptide antibiotics. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 4, 607–616.
- (26) Hinuma Y. Zaomycin, a new antibiotic from a *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **1954**, *7*, 4, 134–136.
- (27) Shay A.J., Adam J., Martin J.H., Hausmann W.K., Shu P., Bohonos N. Aspartocin. I. Production, isolation, and characteristics. *Antibiot Annu* **1960**, *7*, 194–198.
- (28) Shibata M., Kanzaki T., Nakazawa K., Inoue M., Hitomi H., Mizuno K., Fujino M., Akira M. On glumamycin, a new antibiotic. *J. Antibiot.* **1962**, *15*, 1–6.
- (29) Naganawa H., Hamada M., Maeda K., Okami Y., Takeuchi T., Umezawa H. Laspartomycin, a new anti-*Staphylococcal* peptide. *J. Antibiot.* **1968**, *21*, 1, 55–62.
- (30) Shoji J.-I., Kozuki S., Okamoto S., Sakazaki R., Otsuka H. Studies on tsushimycin. I. *J. Antibiot.* **1968**, *21*, 7, 439–443.
- (31) Shoji J., Otsuka H. Studies on tsushimycin. II. *J. Antibiot.* **1969**, *22*, 10, 473–479.
- (32) Lakey J.H., Lea E.J., Rudd B.A., Wright H.M., Hopwood D.A. A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity. *J. Gen. Microbiol.* **1983**, *129*, 12, 3565–3573.
- (33) Penn J., Li X., Whiting A., Latif M., Gibson T., Silva C.J., Brian P., Davies J., Miao V., Wrigley S.K., Baltz R.H. Heterologous production of daptomycin in *Streptomyces lividans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 2, 121–128.
- (34) Debono M., Barnhart M., Carrell C.B., Hoffmann J.A., Occolowitz J.L., Abbott B.J., Fukuda D.S., Hamill R.L., Biemann K., Herlihy W.C. A21978C, a complex of new acidic peptide antibiotics. Isolation, chemistry, and mass spectral structure elucidation. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 6, 761–777.
- (35) Boeck L.D., Papiska H.R., Wetzel R.W., Mynderse J.S., Fukuda D.S., Mertz F.P., Berry D.M. A54145, a new lipopeptide antibiotic complex. Discovery, taxonomy, fermentation and HPLC. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 6, 587–593.
- (36) Farnet C.M., Staffa A., Zazopoulos E. Genes and proteins involved in the biosynthesis of lipopeptides. WO03060127 (A2), July 24, 2003.
- (37) Vértesy L., Ehlers E., Kogler H., Kurz M., Meiwes J., Seibert G., Vogel M., Hammann P. Friulimicins. Novel Lipopeptide Antibiotics with Peptidoglycan Synthesis Inhibiting Activity from *Actinoplanes friuliensis* sp. nov. II. Isolation and Structural Characterization. *The Journal of Antibiotics* **2000**, *53*, 8, 816–827.
- (38) Vértesy L., Ehlers E., Kogler H., Kurz M., Meiwes J., Seibert G., Vogel M., Hammann P. Friulimicins: novel lipopeptide antibiotics with peptidoglycan synthesis inhibiting activity from *Actinoplanes friuliensis* sp. nov. II. Isolation and structural characterization. *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 8, 816–827.
- (39) Kong F., Carter G.T. Structure determination of glycinocins A to D, further evidence for the cyclic structure of the amphomycin antibiotics. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 6, 557–564.

- (40) Borg M., Neary J.M., Wrigley S.K., Jim J.M., Smith C.P. Cyclic lipopeptides. Pat. WO2007072082A1, 2007.
- (41) Yamanaka K., Reynolds K.A., Kersten R.D., Ryan K.S., Gonzalez D.J., Nizet V., Dorrestein P.C., Moore B.S. Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 5, 1957–1962.
- (42) Hover B.M., Kim S.-H., Katz M., Charlop-Powers Z., Owen J.G., Ternei M.A., Maniko J., Estrela A.B., Molina H., Park S., Perlin D.S., Brady S.F. Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multi-drug-resistant Gram-positive pathogens. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 4, 415–422.
- (43) Wu C., Shang Z., Lemetre C., Ternei M.A., Brady S.F. Cadasides, calcium-dependent acidic lipopeptides from the soil metagenome that are active against multidrug-resistant bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 9, 3910–3919.
- (44) Bodanszky Miklos., Sigler G.F., Bodanszky Agnes. Structure of the peptide antibiotic amphomycin. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 7, 2352–2357.
- (45) Debono M., Abbott B.J., Molloy R.M., Fukuda D.S., Hunt A.H., Daupert V.M., Counter F.T., Ott J.L., Carrell C.B., Howard L.C., Boeck L.V.D., Hamill R.L. Enzymatic and chemical modifications of lipopeptide antibiotic A21978C: The synthesis and evaluation of daptomycin (LY146032). *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 8, 1093–1105.
- (46) Miao V., Coëffet-LeGal M.-F., Brian P., Brost R., Penn J., Whiting A., Martin S., Ford R., Parr I., Bouchard M., Silva C.J., Wrigley S.K., Baltz R.H. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology* **2005**, *151*, 5, 1507–1523.
- (47) Counter F.T., Allen N.E., Fukuda D.S., Hobbs J.N., Ott J., Ensminger P.W., Mynderse J.S., Preston D.A., Wu C.Y.E. A54145 a new lipopeptide antibiotic complex. Microbiological evaluation. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 6, 616–622.
- (48) Fukuda D.S., Bus R.H.D., Baker P.J., Berry D.M., Mynderse J.S. A54145, a new lipopeptide antibiotic complex. Isolation and characterization. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 6, 594–600.
- (49) Miao V., Brost R., Chapple J., She K., Gal M.-F.C.-L., Baltz R.H. The lipopeptide antibiotic A54145 biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fradiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 2, 129–140.
- (50) Kempter C., Kaiser D., Haag S., Nicholson G., Gnau V., Walk T., Gierling K.H., Decker H., Zähner H., Jung G., Metzger J.W. CDA: calcium-dependent peptide antibiotics from *Streptomyces coelicolor* A3(2) containing unusual residues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 5, 498–501.
- (51) Reynolds K.A., Luhavaya H., Li J., Dahesh S., Nizet V., Yamanaka K., Moore B.S. Isolation and structure elucidation of lipopeptide antibiotic taromycin B from the activated taromycin biosynthetic gene cluster. *J. Antibiot.* **2018**, *71*, 2, 333–338.
- (52) Inoue M., Hitomi H., Mizuno K., Fujino M., Miyake A., Nakazawa K., Shibata M., Kanzaki T. Glumamycin, a new peptide-type antibiotic. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1960**, *33*, 7, 1014–1015.
- (53) Toth S.E., Horvath I., Alfoldi L., Berdy J., Gyimesi J., Ott I., Szell V., Laszlo N.T.E., Koczka I., Scholtz V. Process for producing parvulines. US3798129A, March 19, 1974.
- (54) Gauze G.F., Preobrazhenskaia T.P., Spiridomova I.A., Maksimova T.S., Ol'khovatova O.L. New producer of amphomycin-group antibiotics. *Antibiotiki* **1980**, *25*, 12, 883–887.
- (55) Bunkóczi G., Vértesy L., Sheldrick G.M. Structure of the lipopeptide antibiotic tsushimycin. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2005**, *61*, 8, 1160–1164.
- (56) Yang H.-J., Huang X.-Z., Zhang Z.-L., Wang C.-X., Zhou J., Huang K., Zhou J.-M., Zheng W. Two novel amphomycin analogues from *Streptomyces canus* strain FIM-0916. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 12, 861–867.

- (57) Borders D.B., Leese R.A., Jarolmen H., Francis N.D., Fantini A.A., Falla T., Fiddes J.C., Aumelas A. Laspartomycin, an acidic lipopeptide antibiotic with a unique peptide core. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 3, 443–446.
- (58) Jung D., Rozek A., Okon M., Hancock R.E.W. Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 7, 949–957.
- (59) Ball L.-J., Goult C.M., Donarski J.A., Micklefield J., Ramesh V. NMR structure determination and calcium binding effects of lipopeptide antibiotic daptomycin. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 13, 1872–1878.
- (60) Ho S.W., Jung D., Calhoun J.R., Lear J.D., Okon M., Scott W.R.P., Hancock R.E.W., Straus S.K. Effect of divalent cations on the structure of the antibiotic daptomycin. *Eur. Biophys. J.* **2008**, *37*, 4, 421–433.
- (61) Müller A., Wenzel M., Strahl H., Grein F., Saaki T.N.V., Kohl B., Siersma T., Bandow J.E., Sahl H.-G., Schneider T., Hamoen L.W. Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 45, E7077–E7086.
- (62) Lakey J.H., Ptak M. Fluorescence indicates a calcium-dependent interaction between the lipopeptide antibiotic LY 146032 and phospholipid membranes. *Biochemistry* **1988**, *27*, 13, 4639–4645.
- (63) Zhang T., Taylor S.D., Palmer M., Duhamel J. Membrane binding and oligomerization of the lipopeptide A54145 studied by pyrene fluorescence. *Biophys. J.* **2016**, *111*, 6, 1267–1277.
- (64) Taylor S.D., Palmer M. The action mechanism of daptomycin. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 24, 6253–6268.
- (65) Grein F., Müller A., Scherer K.M., Liu X., Ludwig K.C., Klöckner A., Strach M., Sahl H.-G., Kubitscheck U., Schneider T. Ca<sup>2+</sup>-Daptomycin targets cell wall biosynthesis by forming a tripartite complex with undecaprenyl-coupled intermediates and membrane lipids. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1455.
- (66) Hachmann A.-B., Angert E.R., Helmann J.D. Genetic analysis of factors affecting susceptibility of *Bacillus subtilis* to daptomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 4, 1598–1609.
- (67) Wecke T., Zühlke D., Mäder U., Jordan S., Voigt B., Pelzer S., Labischinski H., Homuth G., Hecker M., Mascher T. Daptomycin versus friulimicin B: in-depth profiling of *Bacillus subtilis* cell envelope stress responses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 4, 1619–1623.
- (68) Silver L.L. Fosfomycin: mechanism and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2017**, *7*, 2, a025262.
- (69) Batson S., de Chiara C., Majce V., Lloyd A.J., Gobec S., Rea D., Fülöp V., Thoroughgood C.W., Simmons K.J., Dowson C.G., Fishwick C.W.G., de Carvalho L.P.S., Roper D.I. Inhibition of D-Ala:D-Ala ligase through a phosphorylated form of the antibiotic D-cycloserine. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1939.
- (70) Bush K., Bradford P.A.  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, 8, a025247.
- (71) Zeng D., Debabov D., Hartsell T.L., Cano R.J., Adams S., Schuyler J.A., McMillan R., Pace J.L. Approved glycopeptide antibacterial drugs: mechanism of action and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, 12, a026989.
- (72) Stone K.J., Strominger J.L. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C55-isoprenyl pyrophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 12, 3223–3227.
- (73) Kleijn L.H.J., Oppedijk S.F., 't Hart P., van Harten R.M., Martin-Visscher L.A., Kemmink J., Breukink E., Martin N.I. Total synthesis of laspartomycin C and characterization of its antibacterial mechanism of action. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 7, 3569–3574.

- (74) Schneider T., Gries K., Josten M., Wiedemann I., Pelzer S., Labischinski H., Sahl H.-G. The lipopeptide antibiotic friulimicin B inhibits cell wall biosynthesis through complex formation with bactoprenol phosphate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 4, 1610–1618.
- (75) Schneider T., Müller A., Miess H., Gross H. Cyclic lipopeptides as antibacterial agents – potent antibiotic activity mediated by intriguing mode of actions. *Int. J. Med. Microbiol.* **2014**, *304*, 1, 37–43.
- (76) Arbeit R.D., Maki D., Tally F.P., Campanaro E., Eisenstein B.I., Daptomycin 98-01 and 99-01 Investigators. The safety and efficacy of daptomycin for the treatment of complicated skin and skin-structure infections. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *38*, 12, 1673–1681.
- (77) Eisenstein B.I., Oleson F.B. Jr, Baltz R.H. Daptomycin: from the mountain to the clinic, with essential help from Francis Tally, MD. *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50*, Suppl. 1, S10–S15.
- (78) Oleson F.B., Berman C.L., Kirkpatrick J.B., Regan K.S., Lai J.-J., Tally F.P. Once-daily dosing in dogs optimizes daptomycin safety. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 11, 2948–2953.
- (79) Craig W.A., Andes D.R., Stamstad T. *In Vivo* pharmacodynamics of new lipopeptide MX-2401. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 12, 5092–5098.
- (80) Dugourd D., Yang H., Elliott M., Siu R., Clement J.J., Straus S.K., Hancock R.E.W., Rubinchik E. Antimicrobial Properties of MX-2401, an Expanded-Spectrum Lipopeptide Active in the presence of lung surfactant. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 8, 3720.
- (81) Mascio C.T.M., Mortin L.I., Howland K.T., Van Praagh A.D.G., Zhang S., Arya A., Chuong C.L., Kang C., Li T., Silverman J.A. *In vitro* and *in vivo* characterization of CB-183,315, a novel Lipopeptide Antibiotic for Treatment of *Clostridium difficile*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 10, 5023–5030.
- (82) Yin N., Li J., He Y., Herradura P., Pearson A., Mesleh M.F., Mascio C.T., Howland K., Steenbergen J., Thorne G.M., Citron D., Van Praagh A.D.G., Mortin L.I., Keith D., Silverman J., Metcalf C. Structure–Activity Relationship Studies of a Series of Semisynthetic Lipopeptides Leading to the discovery of surotomycin, a novel cyclic lipopeptide being developed for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 12, 5137–5142.
- (83) Schwarzer D., Finking R., Marahiel M.A. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 3, 275–287.
- (84) Hojati Z., Milne C., Harvey B., Gordon L., Borg M., Flett F., Wilkinson B., Sidebottom P.J., Rudd B.A.M., Hayes M.A., Smith C.P., Micklefield J. Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 11, 1175–1187.
- (85) Müller C., Nolden S., Gebhardt P., Heinzelmann E., Lange C., Puk O., Welzel K., Wohlleben W., Schwartz D. Sequencing and analysis of the biosynthetic gene cluster of the lipopeptide antibiotic friulimicin in *Actinoplanes friuliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3, 1028–1037.
- (86) Wang Y., Chen Y., Shen Q., Yin X. Molecular cloning and identification of the laspartomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes*. *Gene* **2011**, *483*, 1, 11–21.
- (87) Ryding N.J., Anderson T.B., Champness W.C. Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by absA, encoding a cluster-linked two-component system. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 3, 794–805.
- (88) McKenzie N.L., Nodwell J.R. Phosphorylated absA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 14, 5284–5292.

- (89) Thirlway J., Lewis R., Nunns L., Al Nakeeb M., Styles M., Struck A.-W., Smith C.P., Micklefield J. Introduction of a non-natural amino acid into a nonribosomal peptide antibiotic by modification of adenylation domain specificity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 29, 7181–7184.
- (90) Powell A., Borg M., Amir-Heidari B., Neary J.M., Thirlway J., Wilkinson B., Smith C.P., Micklefield J. Engineered biosynthesis of nonribosomal lipopeptides with modified fatty acid side chains. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 49, 15182–15191.
- (91) Uguru G.C., Milne C., Borg M., Flett F., Smith C.P., Micklefield J. Active-site modifications of adenylation domains lead to hydrolysis of upstream nonribosomal peptidyl thioester intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16, 5032–5033.
- (92) Kopp F., Linne U., Oberthür M., Marahiel M.A. Harnessing the chemical activation inherent to carrier protein-bound thioesters for the characterization of lipopeptide fatty acid tailoring enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8, 2656–2666.
- (93) Lewis R.A., Nunns L., Thirlway J., Carroll K., Smith C.P., Micklefield J. Active site modification of the  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase FabF3 of *Streptomyces coelicolor* affects the fatty acid chain length of the CDA lipopeptides. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6, 1860–1862.
- (94) Kraas F.I., Giessen T.W., Marahiel M.A. Exploring the mechanism of lipid transfer during biosynthesis of the acidic lipopeptide antibiotic CDA. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 3, 283–288.
- (95) Milne C., Powell A., Jim J., Al Nakeeb M., Smith C.P., Micklefield J. Biosynthesis of the (2S,3R)-3-methyl glutamate residue of nonribosomal lipopeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 34, 11250–11259.
- (96) Mahlert C., Kopp F., Thirlway J., Micklefield J., Marahiel M.A. Stereospecific enzymatic transformation of  $\alpha$ -ketoglutarate to (2S,3R)-3-methyl glutamate during acidic lipopeptide biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 39, 12011–12018.
- (97) Strieker M., Kopp F., Mahlert C., Essen L.-O., Marahiel M.A. Mechanistic and structural basis of stereospecific C $\beta$ -hydroxylation in calcium-dependent antibiotic, a daptomycin-type lipopeptide. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 3, 187–196.
- (98) Neary J.M., Powell A., Gordon L., Milne C., Flett F., Wilkinson B., Smith C.P., Micklefield J. An asparagine oxygenase (AsnO) and a 3-hydroxyasparaginyl phosphotransferase (HasP) are involved in the biosynthesis of calcium-dependent lipopeptide antibiotics. *Microbiology* **2007**, *153*, 3, 768–776.
- (99) Scull E.M., Bandari C., Johnson B.P., Gardner E.D., Tonelli M., You J., Cichewicz R.H., Singh S. Chemoenzymatic synthesis of daptomycin analogs active against daptomycin-resistant strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 18, 7853–7865.
- (100) Sampaio de Oliveira K.B., Leite M.L., Rodrigues G.R., Duque H.M., da Costa R.A., Cunha V.A., de Loiola Costa L.S., da Cunha N.B., Franco O.L., Dias S.C. Strategies for recombinant production of antimicrobial peptides with pharmacological potential. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2020**, *13*, 4, 367–390.
- (101) Deng Q., Zhou L., Luo M., Deng Z., Zhao C. Heterologous expression of avermectins biosynthetic gene cluster by construction of a Bacterial Artificial Chromosome library of the producers. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2017**, *2*, 1, 59–64.
- (102) Luo S., Chen X.-A., Mao X.-M., Li Y.-Q. Regulatory and biosynthetic effects of the bkd gene clusters on the production of daptomycin and its analogs A21978C1–3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *45*, 4, 271–279.
- (103) Luhavaya H., Sigrist R., Chekan J.R., McKinnie S.M.K., Moore B.S. Biosynthesis of L-4-chlorokynurenine, an antidepressant prodrug and a non-proteinogenic amino acid found in lipopeptide antibiotics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 25, 8394–8399.
- (104) Rhodes A., Fantes K.H., Boothroyd B., McGonagle M.P., Crosse R. Venturicidin: a new antifungal antibiotic of potential use in agriculture. *Nature* **1961**, *192*, 4806, 952–954.

- (105) Brufani M., Keller-Schierlein W., Löffler W., Mansperger I., Zähler H. Stoffwechselprodukte von mikroorganismen. 69. mitteilung [1]. Über das Venturicin B, das Botrycin und die Zuckerbausteine der Venturicine A und B. *Helv. Chim. Acta* **1968**, *51*, 6, 1293–1304.
- (106) Aizawa S., Nakamura Y., Shirato S., Taguchi R., Yamaguchi I., Misato T. Aabomycin A, a new antibiotic. I. *J. Antibiot.* **1969**, *22*, 10, 457–462.
- (107) Yamaguchi I., Taguchi R., Huang K.T., Misato T. Aabomycin A, a new antibiotic. II. *J. Antibiot.* **1969**, *22*, 10, 463–466.
- (108) Akita H., Yamada H., Oishi T., Yamaguchi I. Identity of aabomycin A with venturicin B. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 9, 2465–2466.
- (109) Sato T., Suzuki K., Miyazaki S., Nagai K., Abe K., Takahashi I., Tsunoda N., Iwanami M. Yp-022591-a and c substance and production thereof. JPS62275687 (A), November 30, 1987.
- (110) Shaaban K.A., Singh S., Elshahawi S.I., Wang X., Ponomareva L.V., Sunkara M., Copley G.C., Hower J.C., Morris A.J., Kharel M.K., Thorson J.S. Venturicin C, a new 20-membered macrolide produced by *Streptomyces* sp. TS-2-2. *J. Antibiot.* **2014**, *67*, 223–230.
- (111) Omura S., Tanaka Y., Nakagawa A., Iwai Y., Inoue M., Tanaka H. Irumamycin, a new antibiotic active against phytopathogenic fungi. *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 2, 256–257.
- (112) Omura S., Tanaka Y., Takahashi Y., Chia I., Inoue M., Iwai Y. Irumamycin, an antifungal 20-membered macrolide produced by a *Streptomyces*. Taxonomy, fermentation and biological properties. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 12, 1572–1578.
- (113) Kimura S., Nakagawa A., Tanaka Y. Antibiotic substance AM-3603A-3 manufacture by *Streptomyces* species and its use as plant fungicide. JP 62067095, 1987.
- (114) Brufani M., Cerrini S., Fedeli W., Musu C., Cellai L., Keller-Schierlein W. Structures of the venturicin A and B. *Experientia* **1971**, *27*, 5, 604–606.
- (115) Akita H., Yamada H., Matsukura H., Nakata T., Oishi T. Determination of absolute structure of C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub> part of irumamycin. Chiral synthesis of degradation product. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 49, 6449–6452.
- (116) Hirose T., Sunazuka T., Yamamoto D., Mouri M., Hagiwara Y., Matsumaru T., Kaji E., Ōmura S. Studies toward the total synthesis of irumamycin: stereoselective preparation of the C(15)–C(27) segment via two-directional chain synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3, 413–416.
- (117) Fourati-Ben Fguira L., Fotso S., Ben Ameer-Mehdi R., Mellouli L., Laatsch H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Res. Microbiol.* **2005**, *156*, 3, 341–347.
- (118) Sadakane N., Tanaka Y., Omura S. New 20-membered lactones, irumanolides I and II, produced by a mutant of *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 7, 931–933.
- (119) Griffiths D.E., Houghton R.L., Lancashire W.E., Meadows P.A. Studies on energy-linked reactions: isolation and properties of mitochondrial venturicin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *51*, 2, 393–402.
- (120) Capaldi R.A., Aggeler R. Mechanism of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 3, 154–160.
- (121) Hong S., Pedersen P.L. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 4, 590–641.
- (122) Salomon A.R., Voehringer D.W., Herzenberg L.A., Khosla C. Understanding and exploiting the mechanistic basis for selectivity of polyketide inhibitors of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 26, 14766–14771.
- (123) Gledhill J.R., Walker J.E. Inhibitors of the catalytic domain of mitochondrial ATP synthase. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 5, 989–992.

- (124) Walter P., Lardy H.A., Johnson D. Antibiotics as tools for metabolic studies: X. Inhibition of phosphoryl transfer reactions in mitochondria by peliomycin, ossamycin and venturicidin. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 21, 5014–5018.
- (125) Lardy H.A. Antibiotic inhibitors of mitochondrial energy transfer. *Pharmacol. Ther.* **1980**, *11*, 3, 649–660.
- (126) Fillingame R.H., Oldenburg M., Fraga D. Mutation of alanine 24 to serine in subunit c of the Escherichia coli F1F0-ATP synthase reduces reactivity of aspartyl 61 with dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 31, 20934–20939.
- (127) Lancashire W.E., Griffiths D.E. Studies on energy-linked reactions: genetic analysis of venturicidin-resistant mutants. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *51*, 2, 403–413.
- (128) Nagley P., Hall R.M., Ooi B.G. Amino acid substitutions in mitochondrial ATPase subunit 9 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to oligomycin or venturicidin resistance. *FEBS Lett.* **1986**, *195*, 1–2, 159–163.
- (129) Galanis M., Mattoon J.R., Nagley P. Amino acid substitutions in mitochondrial ATP synthase subunit 9 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to venturicidin or ossamycin resistance. *FEBS Lett.* **1989**, *249*, 2, 333–336.
- (130) Symersky J., Osowski D., Walters D.E., Mueller D.M. Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 35, 13961–13965.
- (131) Naumann R., Baumgart T., Gräber P., Jonczyk A., Offenhäusser A., Knoll W. Proton transport through a peptide-tethered bilayer lipid membrane by the H<sup>+</sup>-ATP synthase from chloroplasts measured by impedance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 1, 25–34.
- (132) Valerio M., Haraux F. Catalytic and activating protons follow different pathways in the H<sup>+</sup>-ATPase of potato tuber mitochondria. *FEBS Lett.* **1993**, *336*, 1, 83–86.
- (133) Zharova T.V., Vinogradov A.D. Energy-dependent transformation of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase in *Paracoccus denitrificans* plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13, 12319–12324.
- (134) Capozza G., Dmitriev O.Yu., Krasnoselskaya I.A., Papa S., Skulachev V.P. The effect of F<sub>0</sub> inhibitors on the *Vibrio alginolyticus* membrane ATPase. *FEBS Lett.* **1991**, *280*, 2, 274–276.
- (135) Zharova T.V., Vinogradov A.D. Functional heterogeneity of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>H<sup>+</sup>-ATPase/synthase in coupled *Paracoccus denitrificans* plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1858*, 11, 939–944.
- (136) Laatsch H., Kellner M., Lee Y.-S., Wolf G. Isolierung von Venturicidin X, dem Aglycon der Venturicidine A und B aus *Streptomyces* / Isolation of venturicidin X, the aglycon of venturicidines A and B from *Streptomyces* sp. *Z. Naturforsch. B* **2014**, *49*, 7, 977–980.
- (137) Omura S., Nakagawa A., Tanaka Y. New macrocyclic antibiotics irumamycin and hitachimycin (stubomycin). In *Trends in antibiotic research. Genetics, biosynthesis, actions and new substances.*; Umezawa, H., Demain, A. L., Hata, T., Hutchinson, R. C., Eds.; Japan Antibiotic Research Association: Tokyo.1982; pp 135–145.
- (138) Li H., Zhang M., Li H., Yu H., Chen S., Wu W., Sun P. Discovery of venturicidin congeners and identification of the biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. NRRL S-4. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 1, 110–119.
- (139) Arcamone F., Barbieri W., Franceschi G., Penco S., Vigevani A. Axenomycins. I. Structure of chromophore and sugar moieties. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 6, 2008–2009.
- (140) Arcamone F., Franceschi G., Gioia B., Penco S., Vigevani A. Axenomycins. II. Structure of axenolide. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 6, 2009–2011.
- (141) Takahashi I., Nishiie Y., Uosaki Y., Ochiai K. New substance Gt35 and its production. Pat. JPH09100290 (A), 1997.

- (142) Serizawa N., Suga S., Nakajima M., Nishizaki T., Kizuka M. Macrolide compounds and method for evaluating immunosuppressants. Pat. WO0032604 (A1), 2000.
- (143) Helaly S.E., Kulik A., Zinecker H., Ramachandaran K., Tan G.Y.A., Imhoff J.F., Süßmuth R.D., Fiedler H.-P., Sabaratnam V. Langkolide, a 32-membered macrolactone antibiotic produced by *Streptomyces* sp. Acta 3062. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 6, 1018–1024.
- (144) Pérez M., Schleissner C., Fernández R., Rodríguez P., Reyes F., Zuñiga P., de la Calle F., Cuevas C. PM100117 and PM100118, new antitumor macrolides produced by a marine *Streptomyces caniferus* GUA-06-05-006A. *J. Antibiot.* **2015**, *69*, 388–394.
- (145) Takeuchi T., Hatano M., Umekita M., Hayashi C., Wada S., Nagayoshi M., Sawa R., Kubota Y., Kawada M., Igarashi M., Shibasaki M. ATP depletion assay led to the isolation of new 36-membered polyol macrolides deplelides A and B from *Streptomyces* sp. MM581-NF15. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 16, 4207–4210.
- (146) Pérez-Victoria I., Oves-Costales D., Lacret R., Martín J., Sánchez-Hidalgo M., Diaz C., Cautain B., Vicente F., Genilloud O., Reyes F. Structure elucidation and biosynthetic gene cluster analysis of caniferolides A–D, new bioactive glycosylated 36-membered polyol macrolides from the marine-derived *Streptomyces caniferus* CA-271066. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 2954–2971.
- (147) Chevrette M.G., Carlson C.M., Ortega H.E., Thomas C., Ananiev G.E., Barns K.J., Book A.J., Cagnazzo J., Carlos C., Flanigan W., Grubbs K.J., Horn H.A., Hoffmann F.M., Klassen J.L., Knack J.J., Lewin G.R., McDonald B.R., Muller L., Melo W.G.P. et al. The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1, 516.
- (148) Ortega H.E., Lourenzon V.B., Chevrette M.G., Ferreira L.L.G., Alvarenga R.F.R., Melo W.G.P., Venâncio T., Currie C.R., Andricopulo A.D., Bugni T.S., Pupo M.T. Antileishmanial macrolides from ant-associated *Streptomyces* sp. ISID311. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *32*, 116016.
- (149) Zhang Z., Zhou T., Harunari E., Oku N., Igarashi Y. Iseolides A–C, antifungal macrolides from a coral-derived actinomycete of the genus *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **2020**, *73*, 8, 534–541.
- (150) Thomson R.H. Naphthaquinones. In *Naturally Occurring Quinones (Second Edition)*; Elsevier: London and New York. 1971; pp 198–366.
- (151) Thomson R.H. Naphthaquinones. In *Naturally Occurring Quinones IV*; Springer Netherlands: Dordrecht. 1996; pp 112–308.
- (152) Kumagai Y., Shinkai Y., Miura T., Cho A.K. The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *52*, 221–247.
- (153) Oppolzer W., Prelog V. Über die Konstitution und die Konfiguration der Rifamycine B, O, S und SV. *Helv. Chim. Acta* **1973**, *56*, 7, 2287–2314.
- (154) Wang N.-J., Fu Y., Yan G.-H., Bao G.-H., Xu C.-F., He C.-H. Isolation and structure of a new ansamycin antibiotic kanglemycin A from a *Nocardia*. *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 2, 264–267.
- (155) Mosaei H., Molodtsov V., Kepplinger B., Harbottle J., Moon C.W., Jeeves R.E., Ceccaroni L., Shin Y., Morton-Laing S., Marrs E.C.L., Wills C., Clegg W., Yuzenkova Y., Perry J.D., Bacon J., Errington J., Allenby N.E.E., Hall M.J., Murakami K.S. et al. Mode of action of kanglemycin A, an ansamycin natural product that is active against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell* **2018**, *72*, 2, 263–274.
- (156) Cai P., Kong F., Ruppen M.E., Glasier G., Carter G.T. Hygrocins A and B, naphthoquinone macrolides from *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 12, 1736–1742.
- (157) Rateb M.E., Houssen W.E., Arnold M., Abdelrahman M.H., Deng H., Harrison W.T.A., Okoro C.K., Asenjo J.A., Andrews B.A., Ferguson G., Bull A.T., Goodfellow M., Ebel



- R., Jaspars M. Chaxamycins A–D, bioactive ansamycins from a hyper-arid desert *Streptomyces* sp. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 6, 1491–1499.
- (158) Klotz L.-O., Hou X., Jacob C. 1,4-naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling. *Molecules* **2014**, *19*, 9, 14902–14918.
- (159) Futuro D.O., Ferreira P.G., Nicoletti C.D., Borba-Santos L.P., Silva F.C.D., Rozental S., Ferreira V.F. The antifungal activity of naphthoquinones: an integrative review. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2018**, *90*, 1 suppl 2, 1187–1214.
- (160) Wellington K.W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 26, 20309–20338.
- (161) Elhabiri M., Sidorov P., Cesar-Rodo E., Marcou G., Lanfranchi D.A., Davioud-Charvet E., Horvath D., Varnek A. Electrochemical properties of substituted 2-methyl-1,4-naphthoquinones: redox behavior predictions. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 8, 3415–3424.
- (162) Rodo E.C., Feng L., Jida M., Ehrhardt K., Bielitz M., Boilevin J., Lanzer M., Williams D.L., Lanfranchi D.A., Davioud-Charvet E. A platform of regioselective methodologies to access polysubstituted 2-methyl-1,4-naphthoquinone derivatives: scope and limitations. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016*, 11, 1982–1993.
- (163) Ōmura S., Shiomi K. Discovery of New Macrolides. In *Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice*; Ōmura, S., Ed.; Academic Press: Amsterdam and Boston. 2002; pp 1–56.
- (164) Омельчук О.А., Тевяшова А.Н., Щекотихин А.Е. Успехи в разработке противогрибковых препаратов на основе полиеновых макролидных антибиотиков. *Усп. Химии* **2018**, *87*, 12, 1206–1225.
- (165) Блинов Н.О., Оноприенко В.В., Родина Т.М., Агаина С.И., Хлебарова Е.И. Химические характеристики нифимицинов А1 и А2. *Антибиотики* **1974**, *19*, 7, 579–581.
- (166) Блинов Н.О., Головкина Н.М., Хохлова Ю.М., Хлебарова Е.И., Клейнер Е.М., Георгиева И.Х., Шейкова Г.Н., Коренько А.И. Изучение антибиотиков группы эндомицина. *Антибиотики* **1967**, *12*, 10, 867–874.
- (167) Georgieva I., Sheikova G., Khlebarova E., Balouzov V., Issov P., Againa S. The antibiotic nuphimycin. Pat. GB1254721 (A), 1971.
- (168) Murata H., Suzuki K., Tabayashi T., Hattori C., Takada Y., Harada K.-I., Suzuki M., Ikemoto T., Smbuya T., Haneishi T., Torikata A., Ihezono Y., Nakayama N. Structural elucidation of aculeximycin. III. Planar structure of aculeximycin, belonging to a new class of macrolide antibiotics. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 8, 838–849.
- (169) Kato T., Sato T., Kashiwagi Y., Hosokawa S. Synthetic studies on aculeximycin: synthesis of C24–C40 segment by Kobayashi aldolization and epoxide rearrangements. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 9, 2274–2277.
- (170) Hideyuki S., Yasushi T., Katsukiyo Y., Yuzuru M., Jun'ichi K. Brasilinolide A, new immunosuppressive macrolide from actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 27, 9031–9034.
- (171) Komatsu K., Tsuda M., Tanaka Y., Mikami Y., Kobayashi J. Absolute stereochemistry of immunosuppressive macrolide brasilinolide A and its new congener brasilinolide C. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5, 1535–1541.
- (172) Sasaki T., Furihata K., Shimazu A., Seto H., Iwata M., Watanabe T., Otake N. A novel macrolide antibiotic, notonesomycin A. *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 4, 502–509.
- (173) Sasaki T., Furihata K., Nakayama H., Seto H., Otake N. The structure of a novel macrolide antibiotic, notonesomycin A. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 14, 1603–1606.
- (174) Wan Z., Fang W., Shi L., Wang K., Zhang Y., Zhang Z., Wu Z., Yang Z., Gu Y. Novonestmycins A and B, two new 32-membered bioactive macrolides from *Streptomyces phytohabitans* HBERC-20821. *J. Antibiot.* **2014**, *68*, 185–190.
- (175) Kong F., Liu D.Q., Nietsche J., Tischler M., Carter G.T. Colubricidin A, a novel macrolide antibiotic from a *Streptomyces* sp. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 52, 9219–9223.

- (176) Kawahara T., Hwang J.-H., Izumikawa M., Hashimoto J., Takagi M., Shin-ya K. JBIR-129 and -139, cytotoxic 34-membered polyol macrolides of microbial origin. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 10, 1814–1818.
- (177) Kawahara T., Ohira S., Izumikawa M., Tanaka H., Shin-ya K. Establishment of the absolute configuration of the 34-membered polyol macrolide compound JBIR-129. *J. Antibiot.* **2014**, *67*, 419–420.
- (178) Kihara T., Koshino H., Shin Y.-C., Yamaguchi I., Isono K. Liposidolide A, a new antifungal macrolide antibiotic. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 11, 1385–1387.
- (179) Sawa R., Kubota Y., Umekita M., Hatano M., Hayashi C., Igarashi M. Quadoctomycin, a 48-membered macrolide antibiotic from *Streptomyces* sp. MM168-141F8. *J. Antibiot.* **2017**, *71*, 91–96.
- (180) Fukai T., Kuroda J., Nomura T., Uno J., Akao M. Skeletal structure of neocopiamycin B from *Streptomyces hygroscopicus* var. *crystallogenes*. *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 3, 340–344.
- (181) Hong H., Fill T., Leadlay P.F. A common origin for guanidinobutanoate starter units in antifungal natural products. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 49, 13096–13099.
- (182) Yuan G., Hong K., Lin H., She Z., Li J. New azalomycin F analogs from mangrove *Streptomyces* sp. 211726 with activity against microbes and cancer cells. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 12, 817–829.
- (183) Hong H., Sun Y., Zhou Y., Stephens E., Samborskyy M., Leadlay P.F. Evidence for an iterative module in chain elongation on the azalomycin polyketide synthase. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 2164–2172.
- (184) Hong H., Samborskyy M., Lindner F., Leadlay P.F. An amidinohydrolase provides the missing link in the biosynthesis of amino marginolactone antibiotics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3, 1118–1123.
- (185) Hu Y., Wang M., Wu C., Tan Y., Li J., Hao X., Duan Y., Guan Y., Shang X., Wang Y., Xiao C., Gan M. Identification and proposed relative and absolute configurations of niphimycins C–E from the marine-derived *Streptomyces* sp. IMB7-145 by genomic analysis. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 1, 178–187.
- (186) Koshino H., Kobinata K., Uzawa J., Uramoto M., Isono K., Osada H. Structure of malolactomycins A and B, novel 40-membered macrolide antibiotics. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 39, 8827–8836.
- (187) Xu W., Zhai G., Liu Y., Li Y., Shi Y., Hong K., Hong H., Leadlay P.F., Deng Z., Sun Y. An iterative module in the azalomycin F polyketide synthase contains a switchable enoylreductase domain. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 20, 5503–5506.
- (188) Xu L., Xu X., Yuan G., Wang Y., Qu Y., Liu E. Mechanism of azalomycin F<sub>5a</sub> against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 6942452.
- (189) Usuki Y., Matsumoto K., Inoue T., Yoshioka K., Iio H., Tanaka T. Structure–activity relationship studies on niphimycin, a guanidylpolyol macrolide antibiotic. Part 1: The role of the N-methyl-N''-alkylguanidinium moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 6, 1553–1556.
- (190) Bruna C.D., Ricciardi M.L., Sanfilippo A. Axenomycins, new cestocidal antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1973**, *3*, 6, 708–710.
- (191) Bianchi M., Cotta E., Ferni G., Grein A., Julita P., Mazzoleni R., Spalla C. Axenomycins, new anthelmintic, antiprotozoal and antifungal antibiotics, produced by *Streptomyces lisandri* nov. sp. *Arch. Microbiol.* **1974**, *98*, 1, 289–299.
- (192) Sora S., Ciferri O., Di Pasquale G., Magni G.E. Genetics and biochemistry of resistance to axenomycin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **1980**, *2*, 1, 61–67.
- (193) Salcedo R.G., Olano C., Gómez C., Fernández R., Braña A.F., Méndez C., de la Calle F., Salas J.A. Characterization and engineering of the biosynthesis gene cluster for anti-tumor macrolides PM100117 and PM100118 from a marine actinobacteria: generation of a novel improved derivative. *Microb. Cell Factories* **2016**, *15*, 1, 44.

- (194) Salcedo R.G., Olano C., Fernández R., Braña A.F., Méndez C., de la Calle F., Salas J.A. Elucidation of the glycosylation steps during biosynthesis of antitumor macrolides PM100117 and PM100118 and engineering for novel derivatives. *Microb. Cell Factories* **2016**, *15*, 1, 187.
- (195) Alvariño R., Alonso E., Lacret R., Oves-Costales D., Genilloud O., Reyes F., Alfonso A., Botana L.M. Caniferolide A, a macrolide from *Streptomyces caniferus*, attenuates neuroinflammation, oxidative stress, amyloid-beta, and tau pathology *in vitro*. *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 4, 1456–1466.
- (196) Ломакина Н.Н., Бражникова М.Г. О химическом составе кристалломицина. *Биохимия* **1959**, *24*, 3, 425–431.
- (197) Шорин В.А., Шаповалова С.П. Сравнительное изучение антибактериальных и лечебных свойств антибиотиков кристалломицина и амфамицилина. *Антибиотики* **1959**, *4*, 1, 77–81.
- (198) Pasetka C.J., Erfle D.J., Cameron D.R., Clement J.J., Rubinchik E. Novel antimicrobial lipopeptides with long *in vivo* half-lives. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 2, 182–185.
- (199) Rubinchik E., Schneider T., Elliott M., Scott W.R.P., Pan J., Anklin C., Yang H., Dugourd D., Müller A., Gries K., Straus S.K., Sahl H.G., Hancock R.E.W. Mechanism of action and limited cross-resistance of new lipopeptide MX-2401. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 6, 2743–2754.
- (200) Kong F., Janota K., Ashcroft J.S., Carter G.T. Structures of the aspartocin antibiotics - a consideration of requirements for cyclopeptide structures. *Rec. Nat. Prod.* **2010**, *4*, 2, 131–140.
- (201) Rule G.S., Hitchens T.K. *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*; Springer Science & Business Media, 2006.
- (202) Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley, 1986.
- (203) Schubert M., Labudde D., Oschkinat H., Schmieder P. A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on <sup>13</sup>C chemical shift statistics. *J. Biomol. NMR* **2002**, *24*, 2, 149–154.
- (204) Zhou C.C., Stewart K.D., Dhaon M.K. An intramolecular ionic hydrogen bond stabilizes a cis amide bond rotamer of a ring-opened rapamycin-degradation product. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 1, 41–46.
- (205) Callahan B., Thattai M., Shraiman B.I. Emergent gene order in a model of modular polyketide synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 46, 19410–19415.
- (206) Bisang C., Long P.F., Corte's J., Westcott J., Crosby J., Matharu A.-L., Cox R.J., Simpson T.J., Staunton J., Leadlay P.F. A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature* **1999**, *401*, 6752, 502–505.
- (207) Liew C.W., Nilsson M., Chen M.W., Sun H., Cornvik T., Liang Z.-X., Lescar J. Crystal structure of the acyltransferase domain of the iterative polyketide synthase in enediyne biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27, 23203–23215.
- (208) Yadav G., Gokhale R.S., Mohanty D. Computational approach for prediction of domain organization and substrate specificity of modular polyketide synthases. *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 2, 335–363.
- (209) Gay D.C., Gay G., Axelrod A.J., Jenner M., Kohlhaas C., Kampa A., Oldham N.J., Piel J., Keatinge-Clay A.T. A close look at a ketosynthase from a trans-acyltransferase modular polyketide synthase. *Structure* **2014**, *22*, 3, 444–451.
- (210) Barajas J.F., Blake-Hedges J.M., Bailey C.B., Curran S., Keasling Jay.D. Engineered polyketides: synergy between protein and host level engineering. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2017**, *2*, 3, 147–166.
- (211) Gaitatzis N., Silakowski B., Kunze B., Nordsiek G., Blöcker H., Höfle G., Müller R. The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin

- is directed by a novel type of modular polyketide synthase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15, 13082–13090.
- (212) Wilkinson B., Foster G., Rudd B.A., Taylor N.L., Blackaby A.P., Sidebottom P.J., Cooper D.J., Dawson M.J., Buss A.D., Gaisser S., Böhm I.U., Rowe C.J., Cortés J., Leadlay P.F., Staunton J. Novel octaketide macrolides related to 6-deoxyerythronolide B provide evidence for iterative operation of the erythromycin polyketide synthase. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 2, 111–117.
- (213) Tang L., Ward S., Chung L., Carney J.R., Li Y., Reid R., Katz L. Elucidating the mechanism of *cis* double bond formation in epothilone biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1, 46–47.
- (214) Caffrey P. Conserved amino acid residues correlating with ketoreductase stereospecificity in modular polyketide synthases. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 7, 654–657.
- (215) Keatinge-Clay A.T. Tylosin ketoreductase reveals how chirality is determined in polyketides. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 8, 898–908.
- (216) 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 Lett.* **2019**, *60*, 21, 1448–1451.
- (217) Alhamadsheh M.M., Palaniappan N., DasChoudhuri S., Reynolds K.A. Modular polyketide synthases and *cis* double bond formation: establishment of activated *cis*-3-cyclohexylpropenoic acid as the diketide intermediate in phoslactomycin biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7, 1910–1911.
- (218) Keatinge-Clay A.T. Stereocontrol within polyketide assembly lines. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 2, 141–149.
- (219) Gay D.C., Spear P.J., Keatinge-Clay A.T. A double-hotdog with a new trick: structure and mechanism of the *trans*-acyltransferase polyketide synthase enoyl-isomerase. *Chem. Biol.* **2014**, *9*, 10, 2374–2381.
- (220) Moldenhauer J., Götz D.C.G., Albert C.R., Bischof S.K., Schneider K., Süssmuth R.D., Engeser M., Gross H., Bringmann G., Piel J. The final steps of bacillaene biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: direct evidence for  $\beta,\gamma$  dehydration by a *trans*-acyltransferase polyketide synthase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8, 1465–1467.
- (221) Kusebauch B., Busch B., Scherlach K., Roth M., Hertweck C. Functionally distinct modules operate two consecutive  $\alpha,\beta \rightarrow \beta,\gamma$  double-bond shifts in the rhizoxin polyketide assembly line. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8, 1460–1464.
- (222) Lohr F., Jenniches I., Frizler M., Meehan M.J., Sylvester M., Schmitz A., Gütschow M., Dorrestein P.C., König G.M., Schäberle T.F.  $\alpha,\beta \rightarrow \beta,\gamma$  double bond migration in coralopyronin A biosynthesis. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 11, 4175–4180.
- (223) Keatinge-Clay A.T. The uncommon enzymology of *cis*-acyltransferase assembly lines. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8, 5334–5366.
- (224) Taft F., Brünjes M., Knobloch T., Floss H.G., Kirschning A. Timing of the  $\Delta_{10,12}$ - $\Delta_{11,13}$  double bond migration during ansamitocin biosynthesis in *Actinosynnema pretiosum*. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11, 3812–3813.
- (225) Berkhan G., Merten C., Holec C., Hahn F. The interplay between a multifunctional dehydratase domain and a C-methyltransferase effects olefin shift in ambruticin biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 43, 13589–13592.
- (226) Dodge G.J., Ronnow D., Taylor R.E., Smith J.L. Molecular basis for olefin rearrangement in the gephyronic acid polyketide synthase. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 9, 2699–2707.
- (227) Surup F., Viehrig K., Mohr K.I., Herrmann J., Jansen R., Müller R. Disciformycins A and B: 12-membered macrolide glycoside antibiotics from the myxobacterium *Pyx-*

- idicoccus fallax* active against multiresistant staphylococci. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 49, 13588–13591.
- (228) Castro J.F., Razmilic V., Gomez-Escribano J.P., Andrews B., Asenjo J.A., Bibb M.J. Identification and heterologous expression of the chaxamycin biosynthesis gene cluster from *Streptomyces leeuwenhoekii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 17, 5820–5831.
- (229) Rachid S., Scharfe M., Blöcker H., Weissman K.J., Müller R. Unusual chemistry in the biosynthesis of the antibiotic chondrochlorens. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1, 70–81.
- (230) Müller S., Rachid S., Hoffmann T., Surup F., Volz C., Zaburannyi N., Müller R. Biosynthesis of crocacin involves an unusual hydrolytic release domain showing similarity to condensation domains. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 7, 855–865.
- (231) Jones A.C., Monroe E.A., Eisman E.B., Gerwick L., Sherman D.H., Gerwick W.H. The unique mechanistic transformations involved in the biosynthesis of modular natural products from marine cyanobacteria. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 7, 1048–1065.
- (232) Li S.-R., Zhao G.-S., Sun M.-W., He H.-G., Wang H.-X., Li Y.-Y., Lu C.-H., Shen Y.-M. Identification and characterization of the biosynthetic gene cluster of divergolides from *Streptomyces* sp. W112. *Gene* **2014**, *544*, 1, 93–99.
- (233) Li S., Wang H., Li Y., Deng J., Lu C., Shen Y., Shen Y. Biosynthesis of hygrocins, antitumor naphthoquinone ansamycins produced by *Streptomyces* sp. LZ35. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1, 94–102.
- (234) Wu Y., Kang Q., Shen Y., Su W., Bai L. Cloning and functional analysis of the naphthomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. CS. *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 8, 2459–2469.
- (235) August P.R., Tang L., Yoon Y.J., Ning S., Müller R., Yu T.-W., Taylor M., Hoffmann D., Kim C.-G., Zhang X., Hutchinson C.R., Floss H.G. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 2, 69–79.
- (236) Haydock S.F., Appleyard A.N., Mironenko T., Lester J., Scott N., Leadlay P.F. Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide concanamycin A in *Streptomyces neyagawaensis* ATCC 27449. *Microbiology* **2005**, *151*, 10, 3161–3169.
- (237) Chen H., Thomas M.G., Hubbard B.K., Losey H.C., Walsh C.T., Burkart M.D. Deoxysugars in glycopeptide antibiotics: Enzymatic synthesis of TDP-L-epivancosamine in chloroeremomycin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 22, 11942–11947.
- (238) Topolyan A.P., Belyaeva M.A., Slyundina M.S., Ilyushenkova V.V., Formanovsky A.A., Korshun V.A., Borisov R.S. A novel trityl/acridine derivatization agent for analysis of thiols by (matrix-assisted)(nanowire-assisted)laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Meth.* **2017**, *9*, 45, 6335–6340.
- (239) Denekamp C., Lacour J., Laleu B., Rabkin E. Tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)methyl carbenium ion for charge derivatization of amines and amino acids. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 5, 623–627.
- (240) Fountoulakis M., Lahm H.-W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *J. Chromatogr. A* **1998**, *826*, 2, 109–134.
- (241) Vécsei L., Szalárdy L., Fülöp F., Toldi J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *12*, 64.
- (242) Cervenka I., Agudelo L.Z., Ruas J.L. Kynurenines: tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science* **2017**, *357*, 6349, eaaf9794.
- (243) Robbel L., Marahiel M.A. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 36, 27501–27508.
- (244) Walsh C.T., O'Brien R.V. Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 28, 7098–7124.

- (245) Klitgaard A., Nielsen J.B., Frandsen R.J.N., Andersen M.R., Nielsen K.F. Combining stable isotope labeling and molecular networking for biosynthetic pathway characterization. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 13, 6520–6526.
- (246) Ramarathinam S.H., Gras S., Alcantara S., Yeung A.W.S., Mifsud N.A., Sonza Secondo, Illing Patricia T., Glaros Elias N., Center Robert J., Thomas Shane R., Kent Stephen J., Ternette Nicola, Purcell Damian F. J., Rossjohn Jamie, Purcell Anthony W. Identification of native and posttranslationally modified HLA- B\*57:01- restricted HIV envelope derived epitopes using immunoproteomics. *Proteomics* **2018**, 18, 12, e1700253.
- (247) Ryu G., Matsunaga S., Fusetani N. Discodermin E, a cytotoxic and antimicrobial tetradecapeptide, from the marine sponge *Discodermia kiiensis*. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 44, 8251–8254.
- (248) Kawashima K., Itoh H., Yoneda N., Hagio K., Moriya T., Chibata I. An intensely sweet analog of kynurenine: 3-(4-chloroanthraniloyl)-DL-alanine. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, 28, 6, 1338–1340.
- (249) Varasi M., Della Torre A., Heidempergher F., Pevarello P., Speciale C., Guidetti P., Wells D., Schwarcz R. Derivatives of kynurenine as inhibitors of rat brain kynurenine aminotransferase. *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, 31, 1, 11–21.
- (250) Bhushan R., Brückner H. Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: A review. *Amino Acids* **2004**, 27, 3, 231–247.
- (251) Vijayasarathy S., Prasad P., Fremlin L.J., Ratnayake R., Salim A.A., Khalil Z., Capon R.J. C3 and 2D C3 Marfey's methods for amino acid analysis in natural products. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 2, 421–427.
- (252) Sherin P.S., Grilj J., Tsentalovich Y.P., Vauthey E. Ultrafast excited-state dynamics of kynurenine, a UV filter of the human eye. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 14, 4953–4962.
- (253) Ulrich G., Ziessel R., Harriman A. The chemistry of fluorescent BODIPY dyes: versatility unsurpassed. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 7, 1184–1201.
- (254) Hestand N.J., Spano F.C. Expanded Theory of H- and J-Molecular Aggregates: The Effects of Vibronic Coupling and Intermolecular Charge Transfer. *Chem. Rev.* **2018**, 118, 15, 7069–7163.
- (255) Muraih J.K., Pearson A., Silverman J., Palmer M. Oligomerization of daptomycin on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1808, 4, 1154–1160.
- (256) Muraih J.K., Palmer M. Estimation of the subunit stoichiometry of the membrane-associated daptomycin oligomer by FRET. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1818, 7, 1642–1647.
- (257) Schrupf G., Becher G., Lüttke W. The <sup>1</sup>H NMR spectrum of [1-<sup>13</sup>C]butadiene-1,3. *J. Magn. Reson.* **1973**, 10, 1, 90–94.
- (258) Güntert P., Buchner L. Combined automated NOE assignment and structure calculation with CYANA. *J. Biomol. NMR* **2015**, 62, 4, 453–471.
- (259) Lafite P., Daniellou R. Rare and unusual glycosylation of peptides and proteins. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 7, 729–738.
- (260) Dutta D., Mandal C., Mandal C. Unusual glycosylation of proteins: beyond the universal sequon and other amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, 1861, 12, 3096–3108.
- (261) Shoji J., Sakazaki R. A new peptide antibiotic complex S-520. III Isolation of L-threo-β-hydroxyglutamic acid from the hydrolysate. *J. Antibiot.* **1970**, 23, 8, 418–419.
- (262) von Nussbaum F., Anlauf S., Freiberg C., Benet-Buchholz J., Schamberger J., Henkel T., Schiffer G., Häbich D. Total synthesis and initial structure–activity relationships of longicatenamycin A. *ChemMedChem* **2008**, 3, 4, 619–626.
- (263) Broberg A., Menkis A., Vasiliauskas R. Kutznerides 1–4, depsipeptides from the *Actinomyces* *Kutzneria* sp. 744 inhabiting mycorrhizal roots of *Picea abies* seedlings. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 1, 97–102.

- (264) Strieker M., Nolan E.M., Walsh C.T., Marahiel M.A. Stereospecific synthesis of *threo*- and *erythro*- $\beta$ -hydroxyglutamic acid during kutzneride biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 37, 13523–13530.
- (265) Schleifer K.H., Plapp R., Kandler O. Identification of *threo*-3-hydroxyglutamic acid in the cell wall of *Microbacterium lacticum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *28*, 4, 566–570.
- (266) Rausch C., Hoof I., Weber T., Wohlleben W., Huson D.H. Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. *BMC Evol. Biol.* **2007**, *7*, 78.
- (267) Sosio M., Stinchi S., Beltrametti F., Lazzarini A., Donadio S. The gene cluster for the biosynthesis of the glycopeptide antibiotic A40926 by *Nonomuraea* species. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 6, 541–549.
- (268) Koketsu K., Mitsunashi S., Tabata K. Identification of homophenylalanine biosynthetic genes from the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* PCC73102 and application to its microbial production by *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 7, 2201–2208.
- (269) Fu C., Keller L., Bauer A., Brönstrup M., Froidbise A., Hammann P., Herrmann J., Mondesert G., Kurz M., Schiell M., Schummer D., Toti L., Wink J., Müller R. Biosynthetic studies of telomycin reveal new lipopeptides with enhanced activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 24, 7692–7705.
- (270) Vestola J., Shishido T.K., Jokela J., Fewer D.P., Aitio O., Permi P., Wahlsten M., Wang H., Rouhiainen L., Sivonen K. Hassallidins, antifungal glycolipopeptides, are widespread among cyanobacteria and are the end-product of a nonribosomal pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 18, E1909–E1917.
- (271) Vasilchenko A.S., Julian W.T., Lapchinskaya O.A., Katrukha G.S., Sadykova V.S., Rogozhin E.A. A novel peptide antibiotic produced by *Streptomyces roseoflavus* strain INA-Ac-5812 with directed activity against Gram-positive bacteria. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 556063.
- (272) Melander R.J., Zurawski D.V., Melander C. Narrow-spectrum antibacterial agents. *MedChemComm* **2018**, *9*, 1, 12–21.
- (273) Nonejuie P., Burkart M., Pogliano K., Pogliano J. Bacterial cytological profiling rapidly identifies the cellular pathways targeted by antibacterial molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 40, 16169–16174.
- (274) Lamsa A., Liu W.-T., Dorrestein P.C., Pogliano K. The *Bacillus subtilis* cannibalism toxin SDP collapses the proton motive force and induces autolysis. *Mol. Microbiol.* **2012**, *84*, 3, 486–500.
- (275) Mohammad H., Younis W., Ezzat H.G., Peters C.E., AbdelKhalek A., Cooper B., Pogliano K., Pogliano J., Mayhoub A.S., Seleem M.N. Bacteriological profiling of diphenylureas as a novel class of antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **2017**, *12*, 8, e0182821.
- (276) Grein F., Schneider T., Sahl H.-G. Docking on lipid II – a widespread mechanism for potent bactericidal activities of antibiotic peptides. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 18, 3520–3530.
- (277) Breukink E., de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 4, 321–332.
- (278) Zhanel G.G., Schweizer F., Karlowsky J.A. Oritavancin: mechanism of action. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54*, Suppl. 3, S214–S219.
- (279) Billot-Klein D., Shlaes D., Bryant D., Bell D., Legrand R., Gutmann L., van Heijenoort J. Presence of UDP-N-acetylmuramyl-hexapeptides and -heptapeptides in enterococci and staphylococci after treatment with ramoplanin, tunicamycin, or vancomycin. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 15, 4684–4688.

- (280) Ling L.L., Schneider T., Peoples A.J., Spoering A.L., Engels I., Conlon B.P., Mueller A., Schaberle T.F., Hughes D.E., Epstein S., Jones M., Lazarides L., Steadman V.A., Cohen D.R., Felix C.R., Fetterman K.A., Millett W.P., Nitti A.G., Zullo A.M. et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **2015**, *517*, 7535, 455–459.
- (281) Lubelski J., Rink R., Khusainov R., Moll G.N., Kuipers O.P. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 3, 455–476.
- (282) Gray D.A., Wenzel M. More than a pore: a current perspective on the *in vivo* mode of action of the lipopeptide antibiotic daptomycin. *Antibiotics* **2020**, *9*, 1, 17.
- (283) Wood T.M., Martin N.I. The calcium-dependent lipopeptide antibiotics: structure, mechanism, & medicinal chemistry. *MedChemComm* **2019**, *10*, 5, 634–646.
- (284) Chugunov A., Pyrkova D., Nolde D., Polyansky A., Pentkovsky V., Efremov R. Lipid II forms potential “landing terrain” for lantibiotics in simulated bacterial membrane. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1, 1678.
- (285) Balleza D., Mescola A., Alessandrini A. Model lipid systems and their use to evaluate the phase state of biomembranes, their mechanical properties and the effect of non-conventional antibiotics: the case of daptomycin. *Eur. Biophys. J.* **2020**, *49*, 5, 401–408.
- (286) Seydlová G., Sokol A., Lišková P., Konopásek I., Fišer R. Daptomycin pore formation and stoichiometry depend on membrane potential of target membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, 1, e01589-18.
- (287) Hollmann A., Martinez M., Maturana P., Semorile L.C., Maffia P.C. Antimicrobial peptides: interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 204.
- (288) Tran T.T., Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance: Daptomycin resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2015**, *1354*, 1, 32–53.
- (289) Pokorny A., Almeida P.F. The antibiotic peptide daptomycin functions by reorganizing the membrane. *J. Membr. Biol.* **2021**, *254*, 1, 97–108.
- (290) Goldner N.K., Bulow C., Cho K., Wallace M., Hsu F.-F., Patti G.J., Burnham C.-A., Schlesinger P., Dantas G. Mechanism of high-level daptomycin resistance in *Corynebacterium striatum*. *mSphere* **2018**, *3*, 4.
- (291) Ernst C.M., Peschel A. MprF-mediated daptomycin resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* **2019**, *309*, 5, 359–363.
- (292) Heidary M., Khosravi A.D., Khoshnood S., Nasiri M.J., Soleimani S., Goudarzi M. Daptomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1, 1–11.
- (293) Arias C.A., Panesso D., McGrath D.M., Qin X., Mojica M.F., Miller C., Diaz L., Tran T.T., Rincon S., Barbu E.M., Reyes J., Roh J.H., Lobos E., Sodergren E., Pasqualini R., Arap W., Quinn J.P., Shamoo Y., Murray B.E. et al. Genetic basis for *in vivo* daptomycin resistance in enterococci. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 10, 892–900.
- (294) Cafiso V., Stracquadanio S., Lo Verde F., De Guidi I., Zega A., Pigola G., Stefani S. Genomic and long-term transcriptomic imprints related to the daptomycin mechanism of action occurring in daptomycin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* under daptomycin exposure. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1893.
- (295) Anton Tyurin, Vera Alferova, Alexander Paramonov, Maxim Shuvalov, Gulnara Kudryakova, Eugene Rogozhin, Alexander Zhrebker, Vladimir Brylev, Alexey Chistov, Anna Baranova, Mikhail Biryukov, Igor Ivanov, Igor Prokhorenko, Natalia Grammatikova, Tatyana Kravchenko, Elena Isakova, Elena Mirchink, Elena Gladkikh, Elena Svirshchevskaya et al. Gausemycins A,B – Cyclic Lipoglycopeptides from *Streptomyces* Sp. September 30, 2020.
- (296) Blin K., Shaw S., Steinke K., Villebro R., Ziemert N., Lee S.Y., Medema M.H., Weber T. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W1, W81–W87.

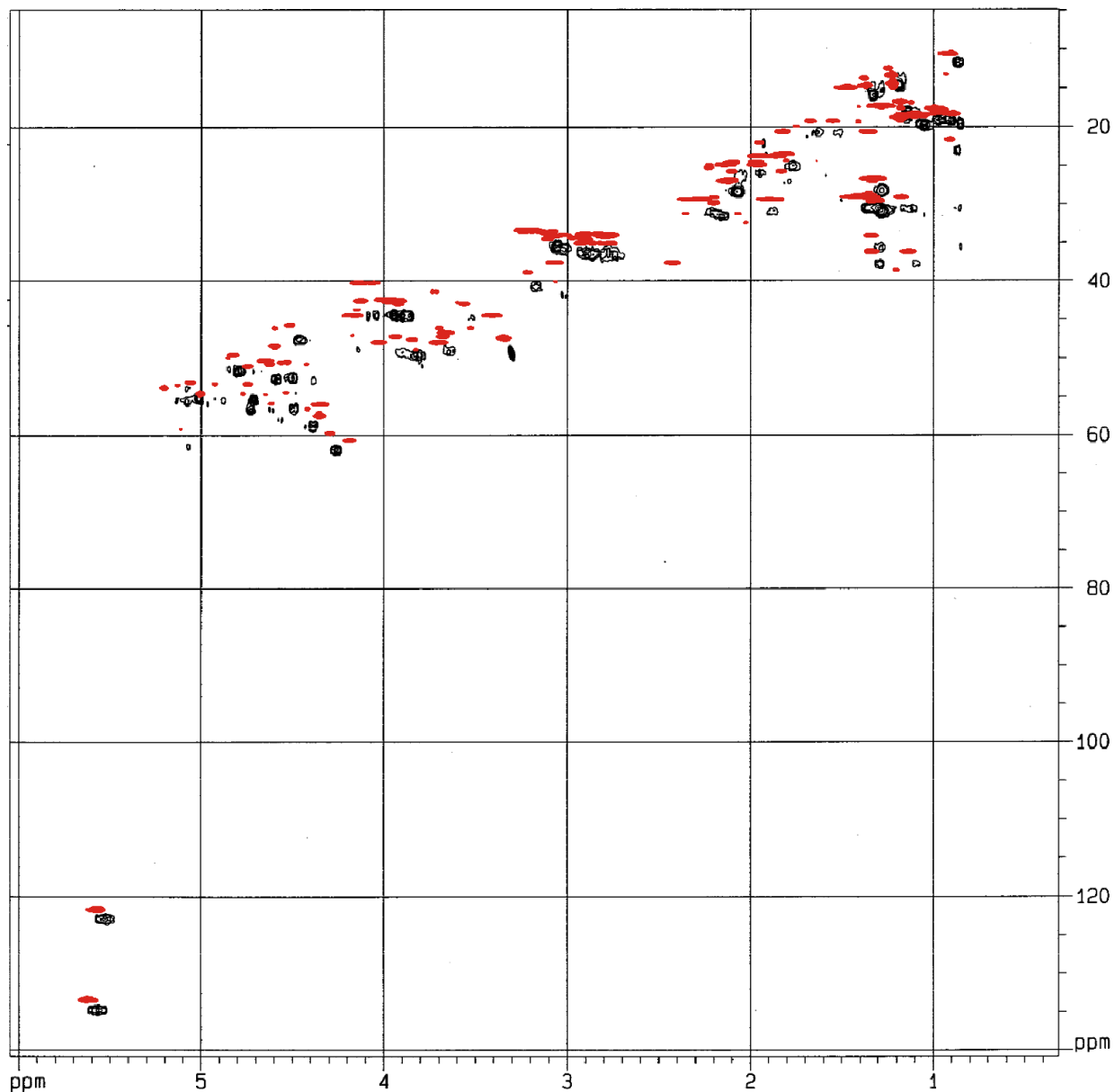


- (297) Medema M.H., Takano E., Breitling R. Detecting sequence homology at the gene cluster level with MultiGeneBlast. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 5, 1218–1223.
- (298) Kautsar S.A., Blin K., Shaw S., Navarro-Muñoz J.C., Terlouw B.R., van der Hoof J.J.J., van Santen J.A., Tracanna V., Suarez Duran H.G., Pascal Andreu V., Selem-Mojica N., Alanjary M., Robinson S.L., Lund G., Epstein S.C., Sisto A.C., Charkoudian L.K., Collemare J., Linington R.G. et al. MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D1, D454–D458.
- (299) Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 3, 403–410.
- (300) CLSI Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard, 10th Ed. CLSI document M07-A10, Wayne, PA, 2015.
- (301) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: CLSI; 2015.
- (302) 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.
- (303) 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. et al. Astolides A and B, antifungal and cytotoxic naphthoquinone-derived polyol macrolactones from *Streptomyces hygroscopicus*. *Tetrahedron* **2018**, *74*, 52, 7442–7449.
- (304) 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. RU 2681828, 2019.
- (305) Paudel L., Adams R.W., Király P., Aguilar J.A., Foroozandeh M., Cliff M.J., Nilsson M., Sándor P., Waltho J.P., Morris G.A. Simultaneously enhancing spectral resolution and sensitivity in heteronuclear correlation NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 44, 11616–11619.
- (306) Sakhaii P., Haase B., Bermel W. Experimental access to HSQC spectra decoupled in all frequency dimensions. *J. Magn. Reson.* **2009**, *199*, 2, 192–198.
- (307) Palmer A.G., Cavanagh J., Wright P.E., Rance M. Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 1, 151–170.
- (308) Kay L., Keifer P., Saarinen T. Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 26, 10663–10665.
- (309) Schleucher J., Schwendinger M., Sattler M., Schmidt P., Schedletzky O., Glaser S.J., Sørensen O.W., Griesinger C. A general enhancement scheme in heteronuclear multi-dimensional NMR employing pulsed field gradients. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 2, 301–306.
- (310) Willker W., Leibfritz D., Kerssebaum R., Bermel W. Gradient selection in inverse heteronuclear correlation spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31*, 3, 287–292.
- (311) Zwahlen C., Legault P., Vincent S.J.F., Greenblatt J., Konrat R., Kay L.E. Methods for measurement of intermolecular NOEs by multinuclear NMR Spectroscopy: application to a bacteriophage  $\lambda$  N-Peptide/boxB RNA Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 29, 6711–6721.

- (312) Boyer R.D., Johnson R., Krishnamurthy K. Compensation of refocusing inefficiency with synchronized inversion sweep (CRISIS) in multiplicity-edited HSQC. *J. Magn. Reson.* **2003**, *165*, 2, 253–259.
- (313) Nyberg N.T., Duus J.Ø., Sørensen O.W. Heteronuclear two-bond correlation: suppressing heteronuclear three-bond or higher NMR correlations while enhancing two-bond correlations even for vanishing  $^2J_{\text{CH}}$ . *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17, 6154–6155.
- (314) Лапчинская О.А., Катруха Г.С., Терехова Л.П., Куляева В.В., Гладких Е.Г., Погожева В.В., Федорова Г.Б., Мирчинк Е.П., Макарова М.О., Трещалин И.Д., Исакова Е.Б., Пономаренко В.И., Переверзева Э.Р., Абрамова Е.А., Токарева Н.Л. Антибиотик ИНА 5812, штамм-продуцент *Streptomyces roseoflavus* ИНА-Ас-5812 и способ получения антибиотика. РФ 2572341, 2016.
- (315) Marquez B.L., Gerwick W.H., Thomas Williamson R. Survey of NMR experiments for the determination of  $^nJ_{\text{CH}}$  heteronuclear coupling constants in small molecules. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 9, 499–530.
- (316) Williamson R.T., Márquez B.L., Gerwick W.H., Kövér K.E. One- and two-dimensional gradient-selected HSQMBC NMR experiments for the efficient analysis of long-range heteronuclear coupling constants. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 4, 265–273.
- (317) Schatz G., Racker E. Stable phosphorylating submitochondrial particles from baker's yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, *22*, 5, 579–584.
- (318) Jenkins W.T. The pyruvate kinase-coupled assay for ATPases: a critical analysis. *Anal. Biochem.* **1991**, *194*, 1, 136–139.
- (319) Sugasawa T., Adachi M., Sasakura K., Kitagawa A. Aminohaloborane in organic synthesis. 2. Simple synthesis of indoles and 1-acyl-3-indolinones using specific ortho alpha-chloroacetylation of anilines. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4, 578–586.
- (320) Cinelli M.A., Morrell A.E., Dexheimer T.S., Agama K., Agrawal S., Pommier Y., Cushman M. The structure-activity relationships of A-ring-substituted aromathecine topoisomerase I inhibitors strongly support a camptothecin-like binding mode. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 15, 5535–5552.
- (321) Melhuish W.H. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65*, 2, 229–235.
- (322) Hamai S., Hirayama F. Actinometric determination of absolute fluorescence quantum yields. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 1, 83–89.
- (323) Delaglio F., Wu Z., Bax A. Measurement of homonuclear proton couplings from regular 2D COSY spectra. *J. Magn. Reson.* **2001**, *149*, 2, 276–281.
- (324) Koradi R., Billeter M., Wüthrich K. MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 1, 51–55.
- (325) 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.
- (326) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **1983**, *65*, 1/2, 55–63.
- (327) Montal M., Mueller P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1972**, *69*, 12, 3561–3566.

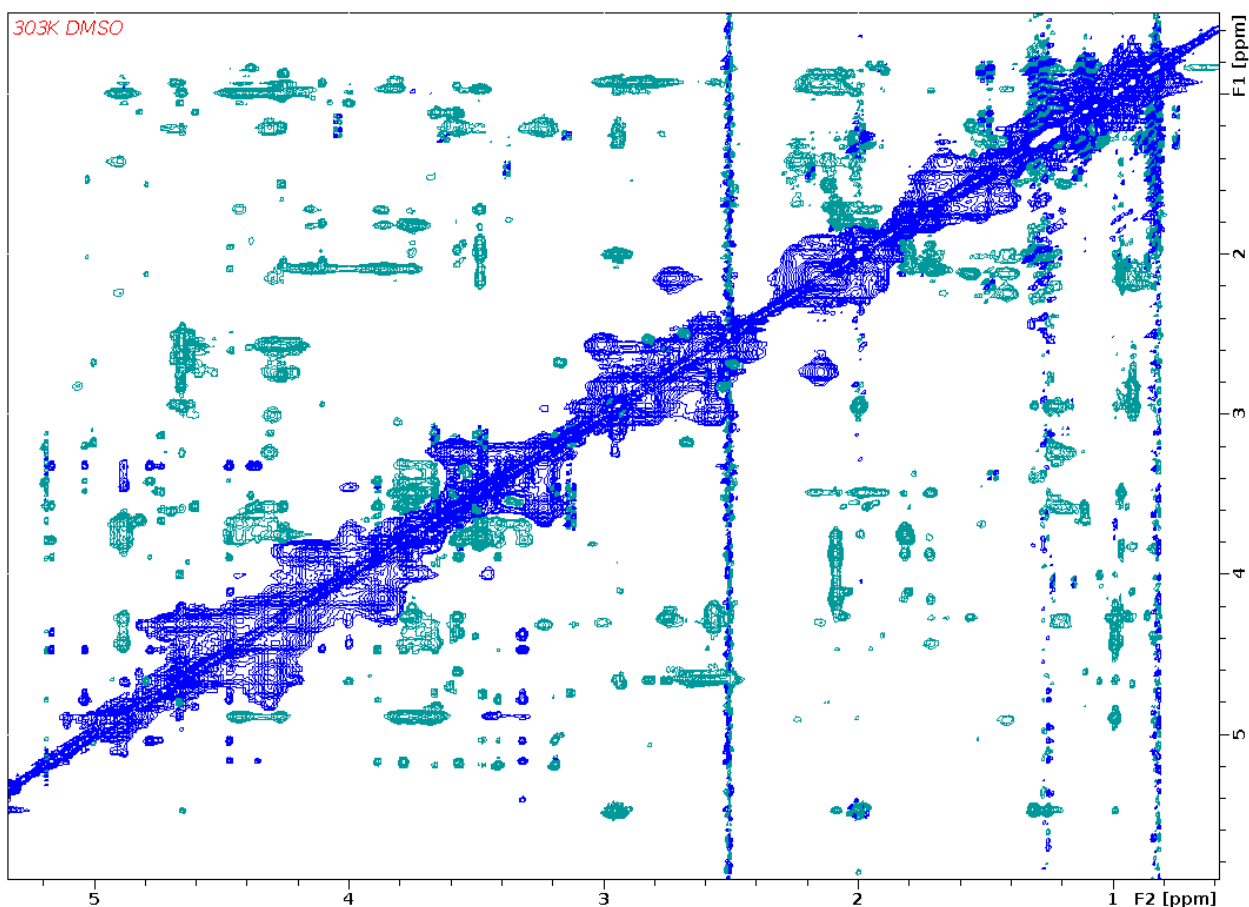
## Приложения

### Приложение 1 Сравнение $^{13}\text{C}$ -HSQC спектров аспартоцина В (черные сигналы, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $27^\circ\text{C}$ , 400 МГц) и компонента кристалломицина Cryst-2 (красные сигналы, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $30^\circ\text{C}$ , 800 МГц)



Спектр аспартоцина В был взят из дополнительных материалов (F. Kong, K. Janota, J.S. Ashcroft и G.T. Carter, *Rec. Nat. Prod.*, 2010, 4, 131). Сдвиг сигналов, вероятно, обусловлен различиями в условиях эксперимента (температура, ионная сила, pH, частота спектрометра ЯМР) и различиями в используемом эталонном методе.

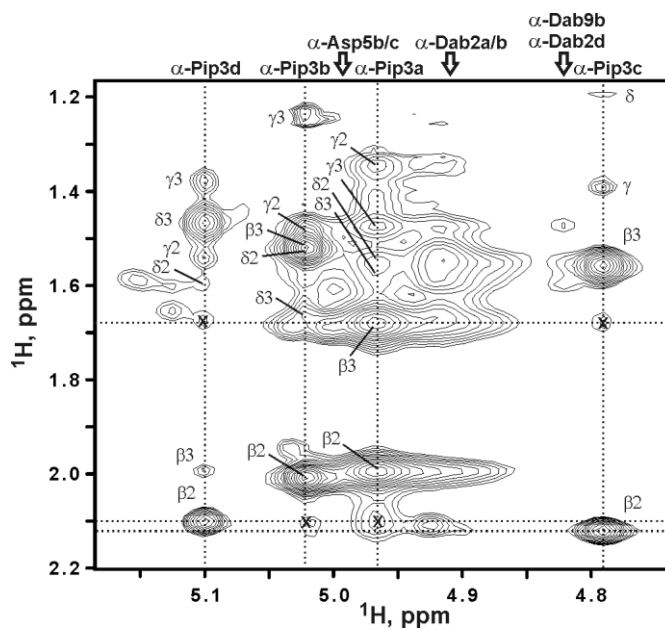
**Приложение 2. Алифатический фрагмент 2D  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -ROESY спектра Cryst-2 ( $t_m = 200$  мс,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $800$  МГц)**



Синие контуры (положительная интенсивность) соответствуют диагональным кросс-пикам и пикам, возникающим в результате процессов конформационного обмена. Зеленые контуры (отрицательная интенсивность) соответствуют перекрестным пикам NOE. Спектральные области вблизи диагонали полностью покрыты обменными кросс-пиками между четырьмя структурными состояниями Cryst-2. Из-за сильной перегруженности этой области пики сливаются с диагональю.

Цепочка обменных перекрестных пиков на частоте воды (3.3 м.д.), вероятно, соответствует ОН-группам из углеводной примеси в образце. Эти резонансы не связаны со спин-системами Cryst-2 в спектрах NOESY, ROESY и TOCSY. Само соединение Cryst-2 не содержит ОН-групп.

Приложение 3. Фрагмент 2D  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY спектра ( $\tau_m = 200 \text{ ms}$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $800 \text{ МГц}$ ), который демонстрирует обменные процессы между конформациями (a,b,c,d) Cryst-2 в растворе



Отнесение внутренних NOE для остатка Pip3 в четырех конформерах Cryst-2. Кросс-пики, возникающие при обмене (между конформерами), отмечены крестиками. Соответствующие обменные кросс-пики имеют отрицательную интенсивность в спектре ROESY (Приложение 2) и, следовательно, не могут быть отличены от кросс-пигов NOE.

# Приложение 4. HRESI-MS спектр Cryst-1 (1)

## Analysis Info

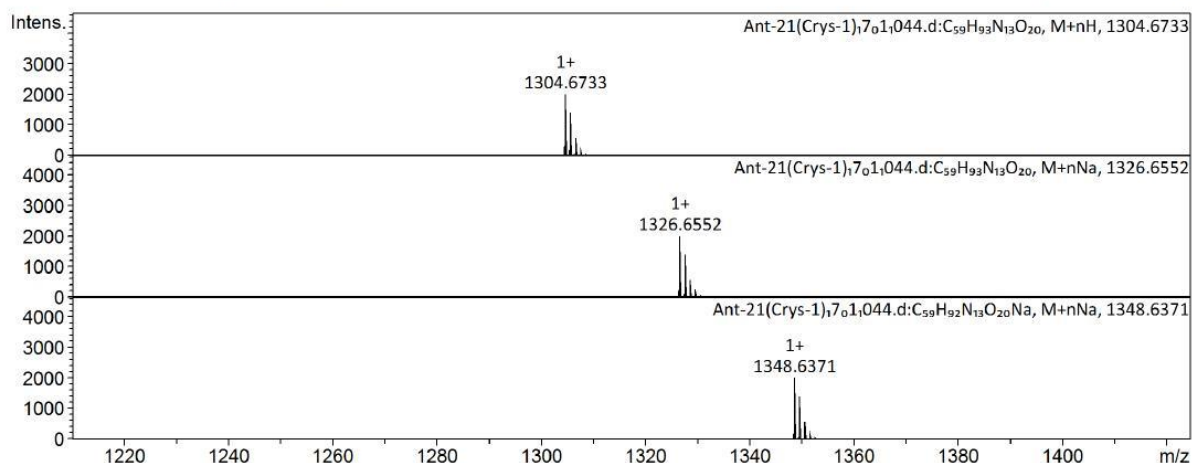
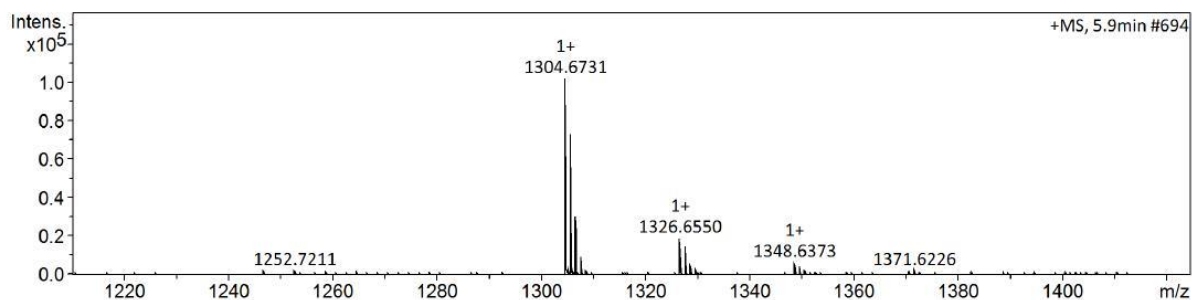
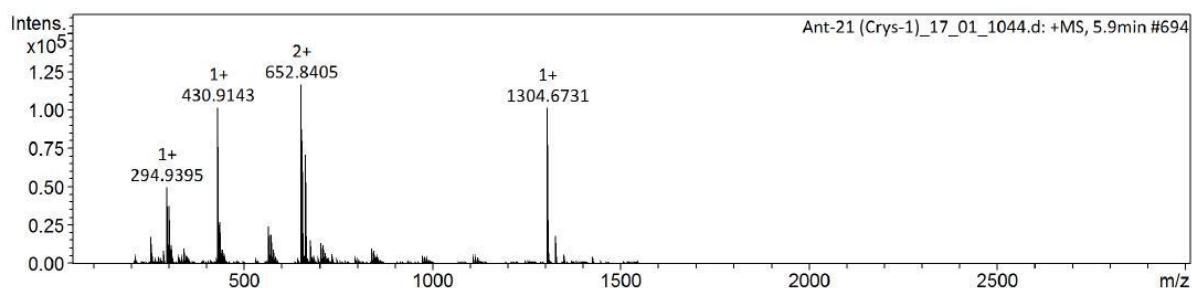
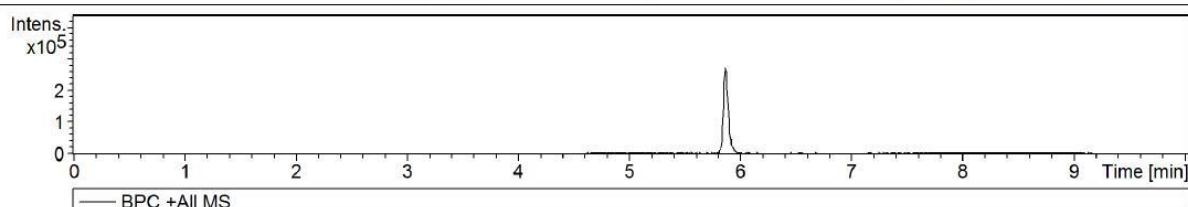
Analysis Name D:\Data\Ant-21 (Crys-1)\_17\_01\_1044.d  
Method la\_2.2.m  
Sample Name Ant-21 (Crys-1)  
Comment

Acquisition Date 5/24/2017 6:38:52 PM

Operator BDAL@DE  
Instrument compact 8255754.20088

## Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	6.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



## Приложение 5. HRESI-MS спектр Cryst-2 (2)

### Analysis Info

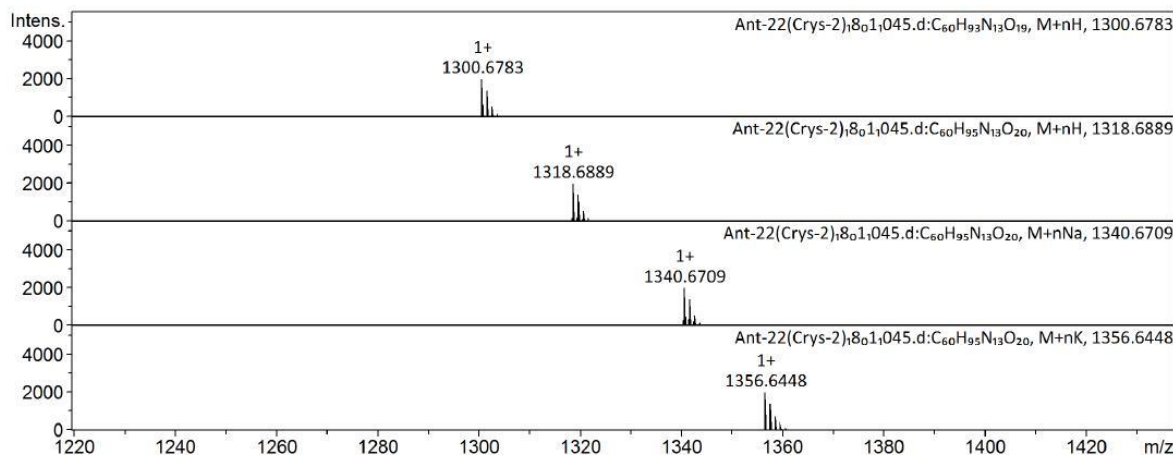
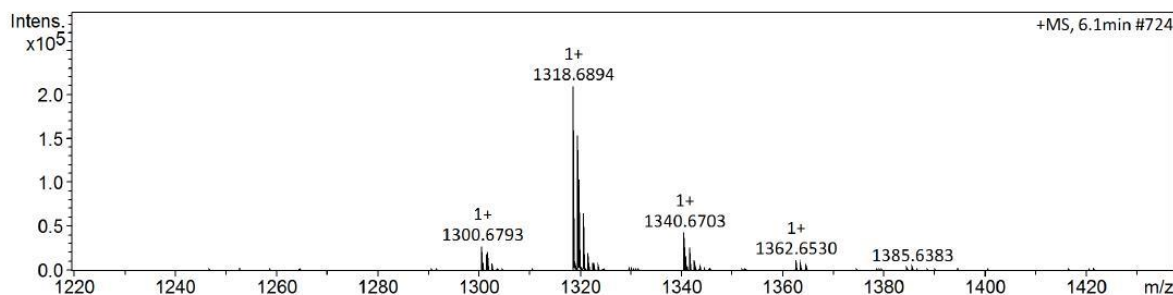
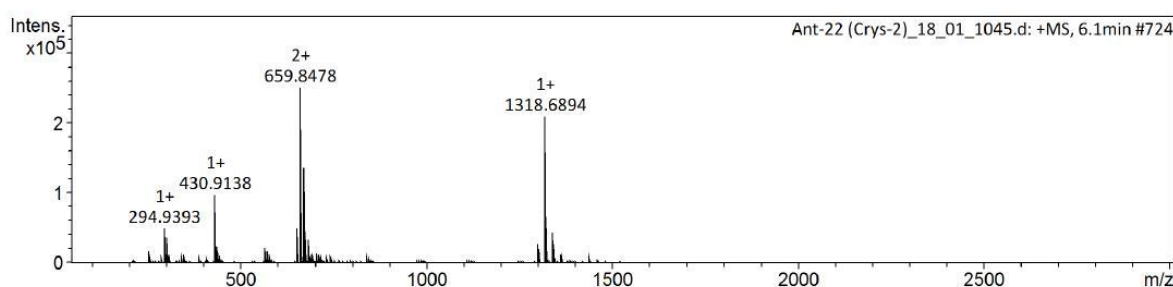
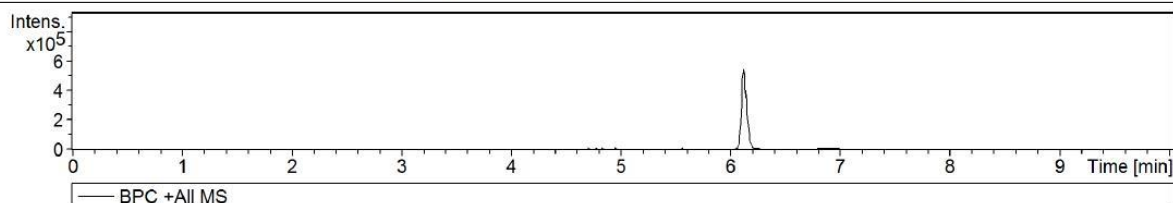
Analysis Name D:\Data\Ant-22 (Crys-2)\_18\_01\_1045.d  
 Method la\_2.2.m  
 Sample Name Ant-22 (Crys-2)  
 Comment

Acquisition Date 5/24/2017 6:50:24 PM

Operator BDAL@DE  
 Instrument compact 8255754.20088

### Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	6.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



**Приложение 6. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР ирумамицина и сравнение с описанными данными**

#	Ирумамицин (1), эта работа		Ирумамицин (1), Omura и др.	
	$\delta$ C	$\delta$ H	$\delta$ C	$\delta$ H
1	173.3	-	173.8	-
2	43.4	2.58, 2.69	43.6	2.63
3	94.0	-	94.4	-
3-OH	-	5.62	-	n.d.
4	35.1	2.14	35.4	2.10-2.15
5	116.8	5.50	117.2	5.50
6	133.0	-	133.3	-
6-Me	19.2	1.50	19.2	1.49
7	80.1	4.47	80.3	4.46
8	134.9	-	135.2	-
8-Me	10.8	1.41	10.8	1.39
9	129.3	5.45	129.7	5.44
10	27.0	1.89, 2.13	27.2	1.79, 2.10
11	26.0	1.24, 1.47	26.1	1.3-1.6
12	35.3	1.45, 1.60	35.6	1.49, 1.68
13	82.4	3.94	82.6	3.94
14	134.3	5.58	134.6	5.57
15	134.1	5.24	134.6	5.22
16	42.1	2.16	42.3	n.d.
16-Me	17.1	0.94	17.3	n.d.
17	77.6	3.31	77.8	n.d.
18	34.6	1.99	34.9	n.d.
18-Me	5.4	0.91	5.6	n.d.
19	81.5	4.86	81.9	4.85
20	32.0	1.79	32.1	n.d.
20-Me	15.9	0.87	16.0	n.d.
21	36.0	0.99, 1.18	36.1	n.d.
22	30.6	1.49	30.7	n.d.
22-Me	17.0	1.10	17.1	n.d.
23	66.2	2.72	66.4	2.71
24	64.4	-	64.6	-
24-Me	12.9	1.46	13.0	n.d.
25	210.8	-	211.5	-
26	28.7	2.41	28.9	n.d.
27	7.3	1.03	7.4	n.d.
1'	98.3	4.57	98.7	4.54
2'	36.8	1.70, 2.27	n.d.	n.d.
3'	75.4	4.67	n.d.	n.d.
3'-				
OC(O)NH <sub>2</sub>	157.3	-	158.1	-
4'	75.1	3.24	n.d.	n.d.
5'	72.0	3.26	n.d.	n.d.
6'	17.8	1.33	17.9	n.d.

Литературные данные цитированы по Omura, S.; Nakagawa, A.; Tanaka, Y. Structure of a New Antifungal Antibiotic, Irumamycin. *J. Org. Chem.* **1982**, 47 (27), 5413–5415.

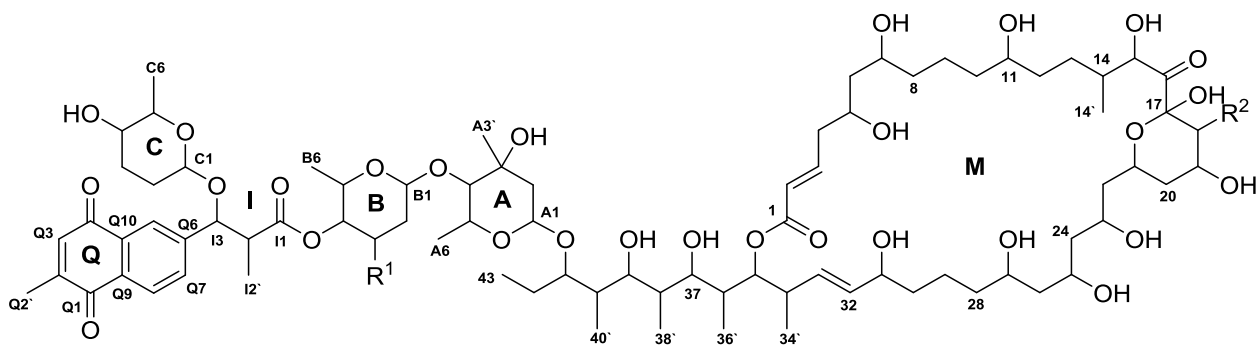


**Приложение 7. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР X-14952B и сравнение с описанными данными**

#	X-14952B (2),	Эта работа	X-14952B (2),	Omura et al
	$\delta C$	$\delta H$	$\delta C$	$\delta H$
1	173.5	-	173.7	-
2	43.4	2.64	43.6	2.57, 2.67
3	94.0	-	94.3	-
3-OH	-	?	-	n.d.
4	35.1	2.11	35.3	2.1-2.2
5	116.8	5.47	117.0	5.50
6	133.0	-	133.7	-
6-Me	19.2	1.47	19.1	1.49
7	80.0	4.44	80.3	4.46
8	134.9	-	135.4	-
8-Me	10.8	1.38	11.0	1.39
9	129.3	5.43	129.7	5.44
10	27.1	1.86, 2.10	27.3	1.80, 2.10
11	26.0	1.23, 1.43	26.2	1.2-1.3
12	35.1	1.42, 1.58	35.5	1.49, 1.68
13	82.3	3.92	82.6	3.93
14	134.0	5.53	134.8	5.56
15	134.4	5.22	134.6	5.24
16	42.0	2.14	42.3	2.13
16-Me	17.1	0.91	17.4	0.88
17	77.8	3.29	78.2	3.26
18	34.6	1.97	34.9	1.97
18-Me	5.5	0.88	5.7	0.85
19	81.9	4.85	82.2	4.85
20	32.6	1.77	33.5	1.75
20-Me	15.8	0.84	16.0	0.80
21	37.0	0.98, 1.21	37.2	0.95, 1.20
22	33.5	1.57	32.8	1.53
22-Me	12.8	0.83	12.9	0.83
23	76.7	3.52	77.0	3.55
24	55.1	2.65	55.4	2.67
24-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	22.7	1.59	22.9	1.58
24-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	11.7	0.88	12.0	0.84
25	217.2	-	217.5	-
26	38.0	2.49	37.4	2.50
27	7.2	1.03	7.6	1.00
1'	98.2	4.55	98.4	4.57
2'	36.8	1.67, 2.23	37.0	1.68, 2.28
3'	75.4	4.64	75.2	4.65
3'-	157.7	-	157.7	-
OC(O)NH <sub>2</sub>				
4'	75.2	3.21	74.7	3.25
5'	72.0	3.25	72.2	3.30
6'	17.8	1.30	17.7	1.32

Литературные данные цитированы по Omura, S.; Nakagawa, A.; Imamura, N.; Kushida, K.; Liu, C.-M.; Sello, L. H.; Westley, J. W. Structure of a New Macrolide Antibiotic, X-14952B. *The Journal of Antibiotics* **1985**, 38 (5), 674–676.

**Приложение 8. Сравнение химических сдвигов в спектрах ЯМР астолидов А,В (3,4) с описанными данными для РМ100117, РМ100118**



**PM100117:** R<sup>1</sup> = OH R<sup>2</sup> = H

**PM100118:** R<sup>1</sup> = H R<sup>2</sup> = H

**Астолид А (1):** R<sup>1</sup> = H R<sup>2</sup> = OH

**Астолид В (2):** R<sup>1</sup> = OH R<sup>2</sup> = OH

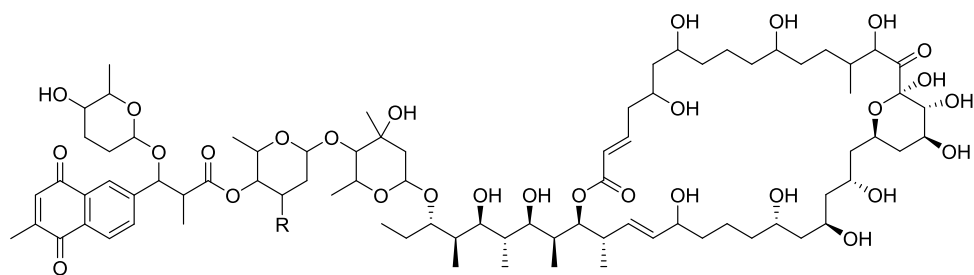
#	<sup>1</sup> H NMR, δ, ppm				<sup>13</sup> C NMR, δ, ppm			
	астолид А	PM100118	астолид В	PM100117	астолид А	PM100118	астолид В	PM100117
<b>M1</b>	–	–	–	–	168.7	168.50	168.7	168.50
<b>M2</b>	5.92	5.91	5.92	5.91	124.7	124.50	124.7	124.50
<b>M3</b>	7.04	7.03	7.03	7.02	148.1	147.90	148.1	147.90
<b>M4</b>	2.37; 2.46	2.35; 2.45	2.36; 2.46	2.35; 2.45	41.3	41.20	41.4	41.40
<b>M5</b>	3.94	3.93	3.95	3.92	70.3	70.10	70.3	70.20
<b>M6</b>	1.60	1.61	1.64	1.61	45.2	44.90	45.0	44.90
<b>M7</b>	3.79	3.78	3.79	3.76	71.2	71.20	71.3	71.10
<b>M8</b>	1.50	1.38; 1.51	1.50	1.38; 1.51	38.7	38.70	38.9	38.70
<b>M9</b>	1.51	1.40; 1.62	1.52	1.40; 1.62	22.8	23.00	22.9	23.00
<b>M10</b>	1.51	1.38; 1.51	1.51	1.38; 1.51	38.8	38.60	38.8	38.60
<b>M11</b>	3.54	3.52	3.55	3.51	72.8	72.90	72.8	72.90
<b>M12</b>	1.44; 1.60	1.38; 1.51	1.44; 1.60	1.38; 1.51	36.4	36.20	36.4	36.20
<b>M13</b>	1.28; 1.65	1.31; 1.67	1.29; 1.64	1.30; 1.66	31.6	31.90	31.6	31.90
<b>M14</b>	2.22	2.24	2.22	2.24	36.8	36.30	36.8	36.30
<b>M14'</b>	0.84	0.79	0.85	0.78	14.0	13.60	14.0	13.60
<b>M15</b>	4.62	4.69	4.63	4.68	75.7	75.80	75.7	75.80
<b>M16</b>	–	–	–	–	208.9	210.60	208.9	210.60
<b>M17</b>	–	–	–	–	99.9	99.40	99.9	99.50
<b>M18</b>	3.52	1.34; 2.08	3.53	1.34; 2.07	75.5	41.20	75.6	41.20
<b>M19</b>	3.89	4.05	3.90	4.07	69.8	64.90	69.8	65.00

<b>M20</b>	1.43; 2.0	1.22; 1.95	1.44; 2.00	1.22; 1.94	41.1	42.10	41.1	42.10
<b>M21</b>	4.24	4.19	4.26	4.20	67.7	67.80	67.8	67.80
<b>M22</b>	1.63	1.63	1.63	1.63	45.0	46.40	45.2	46.40
<b>M23</b>	4.02	4.05	4.03	4.07	65.9	65.50	65.9	65.50
<b>M24</b>	1.59	1.57	1.60	1.57	45.9	46.00	46.0	46.00
<b>M25</b>	4.05	4.05	4.05	4.04	68.7	68.30	68.6	68.30
<b>M26</b>	1.54	1.53	1.55	1.53	46.4	45.60	46.5	45.60
<b>M27</b>	3.76	3.78	3.77	3.76	71.6	71.50	71.7	71.50
<b>M28</b>	1.49	1.44; 1.57	1.50	1.44; 1.57	38.8	38.60	38.8	38.60
<b>M29</b>	1.48	1.51; 1.51	1.51	1.51; 1.51	22.7	23.00	22.9	22.70
<b>M30</b>	1.42	1.38; 1.51	1.42	1.38; 1.51	38.7	38.60	38.7	38.60
<b>M31</b>	3.96	3.95	3.97	3.94	72.6	72.40	72.7	72.40
<b>M32</b>	5.53	5.53	5.53	5.53	135.4	135.20	135.4	135.20
<b>M33</b>	5.52	5.49	5.53	5.49	133.3	133.00	133.4	133.00
<b>M34</b>	2.54	2.53	2.56	2.52	40.6	40.50	40.6	40.50
<b>M34'</b>	1.04	1.03	1.04	1.02	17.5	17.30	17.5	17.30
<b>M35</b>	5.14	5.14	5.15	5.13	77.6	77.40	77.6	77.40
<b>M36</b>	1.97	1.97	1.97	1.97	38.9	38.80	39.1	38.80
<b>M36'</b>	0.91	0.90	0.91	0.89	9.9	9.70	9.9	9.70
<b>M37</b>	3.40	3.38	3.40	3.37	78.7	78.60	78.7	78.50
<b>M38</b>	1.83	1.81	1.84	1.81	36.2	36.10	36.3	36.10
<b>M38'</b>	0.91	0.90	0.92	0.89	5.1	4.90	5.1	5.00
<b>M39</b>	3.53	3.52	3.54	3.51	79.6	79.50	79.6	79.40
<b>M40</b>	2.02	2.01	2.02	2.00	38.8	38.80	38.9	38.80
<b>M40'</b>	0.80	0.79	0.81	0.79	10.8	10.60	10.8	10.70
<b>M41</b>	3.90	3.88	3.89	3.87	80.8	80.60	81.0	80.70
<b>M42</b>	1.41; 1.64	1.40; 1.62	1.43; 1.65	1.39; 1.62	23.1	23.00	23.2	22.80
<b>M43</b>	1.00	0.99	1.01	0.98	11.6	11.50	11.6	11.50
<b>A1</b>	5.03	5.03	5.04	5.01	96.6	96.40	96.7	96.50
<b>A2</b>	1.63; 1.99	1.61; 1.98	1.62; 1.99	1.61; 1.98	38.3	38.10	38.2	38.10
<b>A3</b>	–	–	–	–	71.4	71.20	71.2	71.00
<b>A3'</b>	1.30	1.29	1.29	1.27	27.5	27.40	27.5	27.40
<b>A4</b>	3.29	3.28	3.28	3.26	83.9	83.80	83.7	83.40
<b>A5</b>	4.50	4.49	4.50	4.48	65.3	65.20	65.2	64.90
<b>A6</b>	1.22	1.20	1.23	1.21	17.8	17.70	17.7	17.70
<b>B1</b>	4.97	4.96	5.01	4.98	101.1	101.00	100.9	101.30

<b>B2</b>	1.76; 1.94	1.75; 1.93	1.96; 2.14	2.12; 2.12	25.3	25.20	33.7	33.60
<b>B3</b>	1.77; 2.17	1.75; 2.15	3.87	3.84	24.1	23.90	66.8	66.60
<b>B4</b>	4.93	4.93	4.82	4.80	71.4	71.10	75.5	75.40
<b>B5</b>	4.27	4.22	4.49	4.46	67.8	67.50	64.6	64.40
<b>B6</b>	1.13	1.12	1.17	1.14	17.6	17.50	16.5	16.40
<b>I1</b>	–	–	–	–	175.8	175.70	175.8	175.60
<b>I2</b>	3.01	2.99	3.01	2.98	48.5	48.20	48.5	48.30
<b>I2'</b>	0.93	0.92	0.93	0.90	14.6	14.50	14.7	14.60
<b>I3</b>	4.82	4.80	4.81	4.78	84.2	84.00	84.2	84.00
<b>Q1</b>	–	–	–	–	186.4	186.30	186.4	186.30
<b>Q2</b>	–	–	–	–	150.1	150.00	150.1	150.00
<b>Q2'</b>	2.19	2.18	2.20	2.17	16.4	16.40	16.5	16.30
<b>Q3</b>	6.91	6.90	6.92	6.89	136.7	136.50	136.7	136.50
<b>Q4</b>	–	–	–	–	186.3	186.20	186.3	186.20
<b>Q5</b>	8.06	8.04	8.06	8.03	126.1	126.00	126.1	126.00
<b>Q6</b>	–	–	–	–	148.8	148.60	148.8	148.60
<b>Q7</b>	7.86	7.85	7.86	7.84	134.1	133.90	134.1	133.90
<b>Q8</b>	8.11	8.10	8.11	8.09	127.8	127.70	127.8	127.70
<b>Q9</b>	–	–	–	–	133.2	133.00	133.2	133.00
<b>Q10</b>	–	–	–	–	133.7	133.50	133.7	133.50
<b>C1</b>	4.99	4.97	5.00	4.98	101.3	101.20	101.4	100.60
<b>C2</b>	1.47; 1.95	1.45; 1.93	1.48; 1.95	1.46; 1.92	24.6	24.50	24.6	24.50
<b>C3</b>	1.62; 1.94	1.61; 1.93	1.63; 1.95	1.60; 1.93	26.8	26.70	26.8	26.70
<b>C4</b>	3.34	3.33	3.34	3.31	67.7	67.50	67.7	67.80
<b>C5</b>	3.20	3.18	3.19	3.15	68.4	68.30	68.5	68.30
<b>C6</b>	0.49	0.47	0.49	0.46	16.8	16.70	16.8	16.70

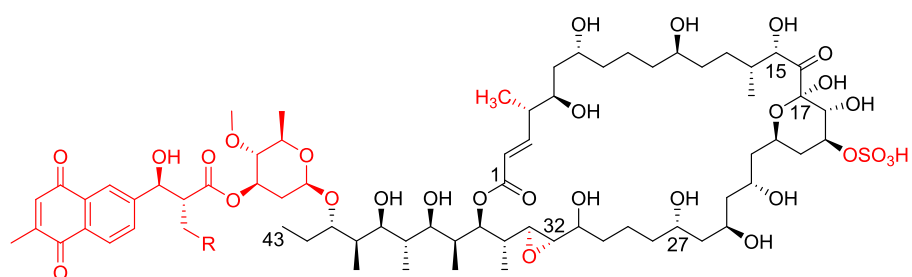
Литературные данные цитированы по Perez, M.; Schleissner, C.; Fernandez, R.; Rodriguez, P.; Reyes, F.; Zuniga, P.; de la Calle, F.; Cuevas, C. PM100117 and PM100118, New Antitumor Macrolides Produced by a Marine *Streptomyces Caniferus* GUA-06-05-006A. *J Antibiot* **2016**, *69*, 388–394.

**Приложение 9. Сравнение химических сдвигов в спектрах ЯМР астолидов А,В (3,4) с описанными данными для деппелидов**



**Астолид А:** R = OH

**Астолид В:** R = H



**Деппелид А:** R = H

**Деппелид В:** R = Me

#	$^1\text{H NMR}, \delta, \text{ppm}$				$^{13}\text{C NMR}, \delta, \text{ppm}$			
	астолид А	астолид В	деппелид А	деппелид В	астолид А	астолид В	деппелид А	деппелид В
<b>M1</b>	–	–	–	–	168.7	168.7	168.8	168.8
<b>M2</b>	5.92	5.92	5.92	5.92	124.7	124.7	122.4	122.4
<b>M3</b>	7.04	7.03	7.09	7.09	148.1	148.1	154.3	154.3
<b>M4</b>	2.37; 2.46	2.36; 2.46	2.50	2.49	41.3	41.4	43.5	43.5
<b>M4'</b>	–	–	1.10	1.10	–	–	13.7	13.7
<b>M5</b>	3.94	3.95	3.82	3.83	70.3	70.3	74.3	74.3
<b>M6</b>	1.60	1.64	1.54– 1.64	1.55– 1.65	45.2	45.0	41.8	41.8
<b>M7</b>	3.79	3.79	3.80	3.78– 3.83	71.2	71.3	72.0	72.0
<b>M8</b>	1.50	1.50	1.35– 1.40, 1.48– 1.52	1.35– 1.41, 1.48– 1.55	38.7	38.9	38.8	38.8
<b>M9</b>	1.51	1.52	1.46– 1.54	1.46– 1.55	22.8	22.9	23.1	23.1
<b>M10</b>	1.51	1.51	1.45– 1.55	1.44– 1.59	38.8	38.8	38.6	38.7
<b>M11</b>	3.54	3.55	3.51	3.49– 3.54	72.8	72.8	72.9	72.9
<b>M12</b>	1.44; 1.44;	1.44; 1.44;	1.38–	1.39–	36.4	36.4	36.3	36.3

	1.60	1.60	1.45, 1.52– 1.59	1.45, 1.53– 1.60				
<b>M13</b>	1.28; 1.65	1.29; 1.64	1.22– 1.28, 1.58– 1.67	1.23– 1.28, 1.61– 1.67	31.6	31.6	31.7	31.7
<b>M14</b>	2.22	2.22	2.15– 2.21	2.15– 2.22	36.8	36.8	36.7	36.7
<b>M14'</b>	0.84	0.85	0.83	0.83	14.0	14.0	14.0	14.0
<b>M15</b>	4.62	4.63	4.61	4.61	75.7	75.7	75.5	75.5
<b>M16</b>	–	–	–	–	208.9	208.9	208.2	208.3
<b>M17</b>	–	–	–	–	99.9	99.9	99.9	99.9
<b>M18</b>	3.52	3.53	3.75	3.73– 3.77	75.5	75.6	73.8	73.3
<b>M19</b>	3.89	3.90	4.64	4.64	69.8	69.8	77.7	77.7
<b>M20</b>	1.43; 2.0	1.44; 2.00	1.55– 1.60, 2.35	2.35	41.1	41.1	39.3	39.2
<b>M21</b>	4.24	4.26	4.28	4.28	67.7	67.8	67.5	67.5
<b>M22</b>	1.63	1.63	1.54– 1.59, 1.59– 1.66	1.55– 1.61, 1.61– 1.67	45.0	45.2	45.1	45.1
<b>M23</b>	4.02	4.03	3.99	3.97– 4.03	65.9	65.9	65.7	65.7
<b>M24</b>	1.59	1.60	1.50– 1.56	1.50– 1.56	45.9	46.0	46.4	46.4
<b>M25</b>	4.05	4.05	4.03	4.03	68.7	68.6	68.7	68.7
<b>M26</b>	1.54	1.55	1.54– 1.61	1.55– 1.61	46.4	46.5	45.8	45.8
<b>M27</b>	3.76	3.77	3.76	3.75	71.6	71.7	71.8	71.8
<b>M28</b>	1.49	1.50	1.43– 1.53	1.44– 1.53	38.8	38.8	38.9	38.9
<b>M29</b>	1.48	1.51	1.33– 1.40, 1.60– 1.66	1.35– 1.39, 1.61– 1.67	22.7	22.9	22.7	22.7
<b>M30</b>	1.42	1.42	1.31– 1.38, 1.38– 1.46	1.32– 1.39, 1.39– 1.46	38.7	38.7	34.0	34.0
<b>M31</b>	3.96	3.97	3.43	3.43	72.6	72.7	71.2	71.2
<b>M32</b>	5.53	5.53	2.78	2.78	135.4	135.4	63.9	63.9
<b>M33</b>	5.52	5.53	2.74	2.74	133.3	133.4	60.7	60.7

<b>M34</b>	2.54	2.56	1.57– 1.63	1.57– 1.63	40.6	40.6	40.6	40.6
<b>M34'</b>	1.04	1.04	1.07	1.07	17.5	17.5	14.6	14.6
<b>M35</b>	5.14	5.15	5.32	5.32	77.6	77.6	75.4	75.4
<b>M36</b>	1.97	1.97	1.95	1.92– 1.98	38.9	39.1	38.7	38.7
<b>M36'</b>	0.91	0.91	0.86	0.86	9.9	9.9	9.6	9.6
<b>M37</b>	3.40	3.40	3.38	3.38	78.7	78.7	78.5	78.4
<b>M38</b>	1.83	1.84	1.81	1.81	36.2	36.3	36.1	36.1
<b>M38'</b>	0.91	0.92	0.90	0.91	5.1	5.1	4.9	4.9
<b>M39</b>	3.53	3.54	3.49	3.48	79.6	79.6	79.8	79.8
<b>M40</b>	2.02	2.02	1.93	1.94	38.8	38.9	40.3	40.3
<b>M40'</b>	0.80	0.81	0.76	0.76	10.8	10.8	10.6	10.6
<b>M41</b>	3.90	3.89	3.87	3.87	80.8	81.0	81.4	81.4
<b>M42</b>	1.41; 1.64	1.43; 1.65	1.25– 1.32, 1.45– 1.54	1.27– 1.32, 1.47– 1.53	23.1	23.2	22.8	22.8
<b>M43</b>	1.00	1.01	0.95	0.96	11.6	11.6	11.3	11.3

Литературные данные цитированы по Takeuchi, T.; Hatano, M.; Umekita, M.; Hayashi, C.; Wada, S.; Nagayoshi, M.; Sawa, R.; Kubota, Y.; Kawada, M.; Igarashi, M.; Shibasaki, M. ATP Depletion Assay Led to the Isolation of New 36-Membered Polyol Macrolides Deplelides A and B from *Streptomyces* Sp. MM581-NF15. *Org. Lett.* **2017**, *19* (16), 4207–4210.



**Приложение 10. Список компонентов фракций, собранных с препаративной ТСХ гауземицина**

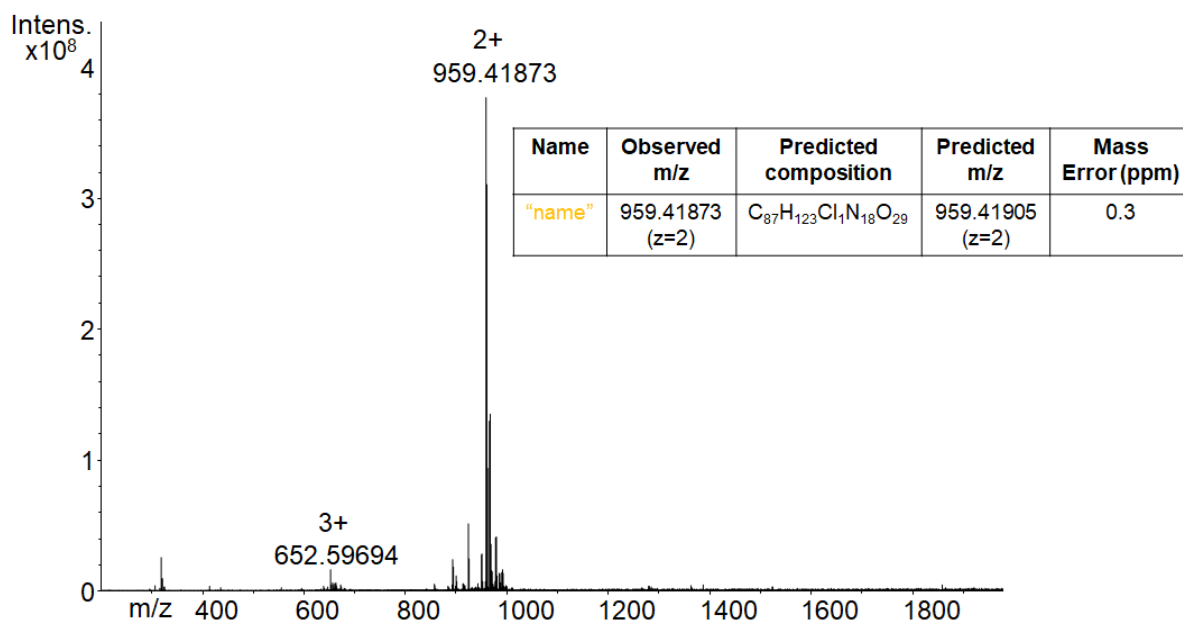
№ фракции	Число пиков ВЭЖХ	Массы компонентов	MS, интенсивность, %				
			M+H	M+Na	M+K	M+HMT	M+NMT
1	6	1930		97	41	-	71
		1944		25	6	-	21
		1952		16	9	-	7
		1827		9	7	-	-
		1974		9	4	-	-
		1966		9	2	-	-
2	9	1916		100	40	77	75
		1930		28	6	25	25
		1798		20	7	-	64
		1846		9	3	4	11
		1986		7	3	-	-
		1812		7	6	-	12
		1938		18	9	5	6
		1960		9	4	-	-
3	6	1846	23	100	94	79	50
		1859	11	44	27	70	24
		1867		14	19	12	-
		1915		5	4	2	75
		1929		2	3	2	41
		1883		19	9	8	14
4	7	1784		100	58	3	100
		1806		21	24	-	10
		1762		18	-	-	-
		1798		16	9	-	12
		1828		9	4	-	-
5	-	1713	20	100	53	-	-
		1727	6	22	12	-	-
		1735		19	16	-	-
6	9						
7	6	1860	-	100	41	-	-
		1844	-	30	100	-	-

Нумерация фракций снизу вверх (наиболее гидрофильные фракции имеют минимальный номер). Для фракции 6 не удалось получить масс-спектр из-за ее недостаточного количества. В последних двух столбцах указаны интенсивности пиков соответствующих веществ при дериватизации гексаметокситритильной (HMT) и нонаметокситритильной (NMT) метками.

## Приложение 11. Изотопный состав гауземицина В

Обработку данных FTICR MS и идентификацию фрагментов и разницы масс проводили с использованием программного обеспечения DataAnalysis (Bruker). Распределение изотопов моделировали с помощью программного обеспечения Xcalibur (Thermo Fisher).

**Масс-спектр FTICR гауземицина В. На вставках показан заданный молекулярный состав и экспериментальная ошибка массы.**



Доминирующий пик в широкополосном масс-спектре соответствует двухзарядному иону с  $m/z = 959.41873$  (ошибка 0.3 м.д.). Для подтверждения правильности задания формул был получен масс-спектр в узкополосном режиме для получения тонкой изотопической структуры. Экспериментальное распределение интенсивности хорошо согласуется с теоретическим распределением. Это доказывает молекулярный состав, предложенный для гауземицина В.

### Тонкая изотопная структура иона гауземицина В.

Состав	Масса	Минорный изотоп	Расчетная интенсивность	Интенсивность
C <sub>87</sub> H <sub>121</sub> ClN <sub>18</sub> O <sub>29</sub>	959.41896	-	100	100
C <sub>87</sub> H <sub>121</sub> Cl <sup>15</sup> N <sub>1</sub> N <sub>17</sub> O <sub>29</sub>	959.91746	<sup>15</sup> N	6.65	6.5
C <sub>86</sub> <sup>13</sup> C <sub>1</sub> H <sub>121</sub> ClN <sub>18</sub> O <sub>29</sub>	959.92069	<sup>13</sup> C	94.10	98.8
C <sub>87</sub> H <sub>121</sub> Cl <sup>15</sup> N <sub>2</sub> N <sub>16</sub> O <sub>29</sub>	960.41634	<sup>15</sup> N <sub>2</sub>	0.21	1.4
C <sub>87</sub> H <sub>121</sub> <sup>37</sup> ClN <sub>18</sub> O <sub>29</sub>	960.41753	<sup>37</sup> Cl	31.96	28.5
C <sub>86</sub> <sup>13</sup> C <sub>1</sub> H <sub>121</sub> Cl <sup>15</sup> N <sub>1</sub> N <sub>17</sub> O <sub>29</sub>	960.41924	<sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N	6.26	5.4
C <sub>87</sub> H <sub>121</sub> ClN <sub>18</sub> O <sub>28</sub> <sup>18</sup> O <sub>1</sub>	960.42117	<sup>18</sup> O	5.96	5.0
C <sub>85</sub> <sup>13</sup> C <sub>2</sub> H <sub>121</sub> ClN <sub>18</sub> O <sub>29</sub>	960.42240	<sup>13</sup> C <sub>2</sub>	43.76	41.3
C <sub>87</sub> H <sub>121</sub> <sup>37</sup> Cl <sup>15</sup> N <sub>1</sub> N <sub>17</sub> O <sub>29</sub>	960.91595	<sup>37</sup> Cl, <sup>15</sup> N	2.12	2.0
C <sub>86</sub> <sup>13</sup> C <sub>1</sub> H <sub>121</sub> <sup>37</sup> ClN <sub>18</sub> O <sub>29</sub>	960.91917	<sup>37</sup> Cl, <sup>13</sup> C	30.07	30.4

$C_{85}^{13}C_2H_{121}^{37}ClN_{18}O_{29}$	961.42085	$^{37}Cl, ^{13}C_2$	13.99	11.9
$C_{84}^{13}C_3H_{121}^{37}ClN_{18}O_{29}$	961.92245	$^{37}Cl, ^{13}C_3$	4.29	3.9

## Приложение 12. Масс-спектрометрический анализ хиральных производных аминокислот в гидролизате гауземицина

Порядок выхода производных подтверждали методом LCMS (2→98% ацетонитрила за 10 мин)

Аминокислота	Exact mass конъюгата	Найдено в LCMS			Время удерживания LCMS
		M+H	M+Na	M+K	
Ser	357,09	358,2	380,2	396,2	7,6
Asp	386,10	386,2	408,3	424,2	8,1
OHGlu	415,10 667,15	-	-	-	-
OHGlu – H <sub>2</sub> O	397,09	-	-	-	-
Gly	327,08	328,2	350,2		8,2
Ala	341,10	341,3	363,3	379,2	8,6
Pro	367,11	368,3	390,3	406,2	9,6
bAla	341,10	342,3	364,2	380,2	9,8
Orn	384,14 636,18	637,2	659,2	675,2	12,4
Dab	370,12 622,18	623,3	645,2	661,2	12,9
Ahpb	447,14 699,796	-	-	-	-
Ahpb – H <sub>2</sub> O	429,13	-	-	-	-
ClKyn	494,096	495,2	517,2	533,2	14,0-14,2
Leu	383,14	384,3	406,3	422,3	14,5
Tyr	433,12 685,18	686,3	708,2	724,2	14,6

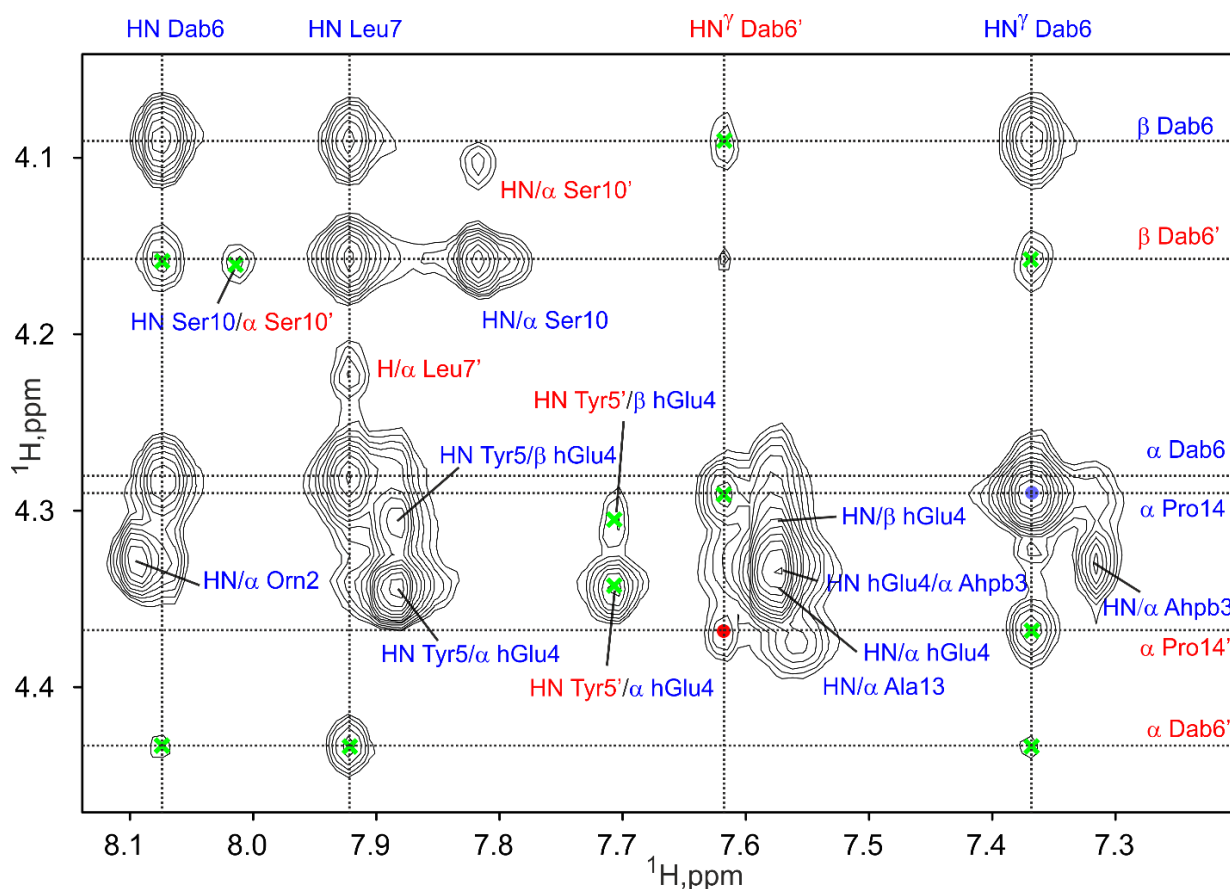
**Приложение 13. Химические сдвиги гауземицинов А, В (13,14) в DMSO-d<sub>6</sub>**

		гауземицин А				гауземицин В			
		осн. форма (trans)		минор (cis)		осн. форма (trans)		минор ("cis")	
		$\delta_H$	$\delta_C(\delta_N)$	$\delta_H$	$\delta_C(\delta_N)$	$\delta_H$	$\delta_C(\delta_N)$	$\delta_H$	$\delta_C(\delta_N)$
bAla1	H <sup>N</sup>	7.84	120.0	7.82	119.9	7.84	119.9	7.86	119.9
		3.29/3.3				3.28/3.3		3.31/3.3	
	$\alpha$	3	35.5	—	—	2	35.4	5	—
	$\beta$	2.37	35.6	—	—	2.37	35.6	2.37	—
Orn2	C'		171.2		—		171.5		—
	H <sup>N</sup>	8.09	121.9	8.07	121.8	8.06	122.8	8.03	122.6
	$\alpha$	4.32	52.4	4.32	—	4.28	52.9	4.32	—
		1.57/1.7		1.57/1.7		1.53/1.7		1.54/1.6	
	$\beta$	4	29.3	4	—	0	29.7	9	—
						1.42/1.4			
	$\gamma$	1.57	24.0	—	—	7	25.9	1.45	—
	$\delta$	2.80	39.0	2.79	—	3.08	38.7	3.08	—
	$\varepsilon$					8.00	118.7	—	—
	C'		171.7		—		172.3		—
Ahpb 3	H <sup>N</sup>	8.28	119.5	8.23	119.4	8.26	119.3	8.20	119.2
	$\alpha$	4.32	51.3	4.32	—	4.27	51.2	4.27	—
		1.92/2.0		1.88/2.0		1.94/2.0		1.88/2.0	
	$\beta$	4	41.6	3	—	5	41.5	3	—
	$\gamma$	4.67	70.1	4.64	70.1	4.66	70.2	4.64	70.1
	$\delta$		145.6		—		145.8		—
	$\varepsilon$	7.30	126.3	7.29	—	7.30	126.3	7.29	—
	$\zeta$	7.31	128.5	—	—	7.32	128.5	—	—
	$\eta$	7.23	127.3	—	—	7.23	127.3	—	—
	C'		171.5		—		171.8		—
hGlu4	H <sup>N</sup>	7.57	109.3	7.57	109.7	7.58	109.3	7.57	109.8
	$\alpha$	4.33	57.1	—	—	4.33	57.2	—	—
	$\beta$	4.30	68.1	4.26	68.2	4.29	68.2	4.26	68.3
	$\gamma$	2.25	39.0	22.2	39.0	2.24	39.0	—	—
	$\delta$		172.5		—		172.7		—
	C'		169.9		—		170.1		—
Tyr5	H <sup>N</sup>	7.88	117.9	7.70	116.7	7.89	118.0	7.70	116.7
	$\alpha$	4.55	54.6	4.60	54.1	4.54	54.6	4.60	54.1
		2.80/2.9		2.79/2.9		2.80/2.9		2.77/2.9	
	$\beta$	7	36.8	3	37.0	8	36.7	3	37.1
	$\gamma$		131.0		—		131.2		—
	$\delta$	7.10	130.5	7.02	130.6	7.11	130.5	7.02	130.6
	$\varepsilon$	6.85	116.6	6.78	116.4	6.86	116.7	6.79	116.5
	$\zeta$		156.2		156.2		156.4		156.2
Dab6	C'		171.1		—		171.4		—
	H <sup>N</sup>	8.07	113.4	8.23	114.2	8.07	113.4	8.23	114.2
	$\alpha$	4.27	57.3	4.43	57.4	4.27	57.4	4.43	57.4
	$\beta$	4.09	46.7	4.15	46.8	4.08	46.7	4.15	46.8
	$\gamma$	0.99	16.5	1.00	16.9	0.99	16.4	0.99	16.8
	HN								
	$\gamma$	7.36	120.0	7.61	123.2	7.37	120.0	7.61	123.2

Leu7	C'		170.9		—		170.5		—	
	H <sup>N</sup>	7.92	121.8	7.92	121.0	7.91	121.8	7.94	121.0	
	α	4.15	52.7	4.21	52.3	4.15	52.7	4.21	52.3	
			1.46/1.5				1.46/1.5			
	β	6	40.2	1.49	40.9	6	40.2	1.49	40.9	
Asp8	γ	1.64	24.5	—	—	1.64	24.3	—	—	
			0.84/0.8				0.84/0.8		22.1/23.	
	δ	7	3	—	—	7	1	—	—	
	C'		172.9		—		173.1		—	
	H <sup>N</sup>	8.56	119.6	8.48	118.7	8.57	119.6	8.49	118.7	
Gly9	α	4.61	50.0	4.73	49.9	4.63	50.0	4.73	49.9	
			2.60/2.7		2.53/2.8		2.60/2.7		2.53/2.8	
	β	7	35.9	2	36.2	8	36.0	2	36.2	
	γ		172.1		—		172.3		—	
	C'		171.4		—		171.6		—	
Ser10	H <sup>N</sup>	8.16	106.6	7.85	104.6	8.17	106.6	7.87	104.6	
	α	3.85	43.3	3.86	42.7	3.86	43.2	3.85	42.9	
	C'		170.4		—		170.6		—	
	H <sup>N</sup>	7.81	113.3	8.01	113.9	7.83	113.3	8.01	113.9	
	α	4.15	56.5	4.10	56.7	4.15	56.6	4.10	56.7	
Gly11			3.61/3.6				3.61/3.6			
	β	9	61.5	3.61	61.5	9	61.5	3.61	61.5	
	C'		171.1		—		171.3		—	
	H <sup>N</sup>	8.19	107.5	8.46	109.1	8.21	107.5	8.46	109.1	
	α		3.68/3.7				3.68/3.7			
CIKy n12	C'		169.0		—		169.3		—	
	H <sup>N</sup>	7.78	115.6	7.56	115.3	7.78	115.6	7.56	115.3	
	α	4.76	49.7	4.86	49.4	4.77	49.7	4.86	49.4	
			3.25/3.3		3.33/3.5		3.25/3.4		3.33/3.5	
	β	9	40.5	6	40.9	1	40.5	6	40.9	
	γ		197.6		197.6		197.9		198.0	
	δ		152.2		—		152.5		—	
	ε <sub>1</sub>	7.70	133.5	7.87	133.8	7.71	133.6	7.88	133.9	
	ε <sub>2</sub>		115.7		—		115.7		—	
	ζ <sub>1</sub>	6.53	114.8	6.56	114.9	6.54	114.9	6.55	115.0	
	ζ <sub>2</sub>	6.82	116.0	6.78	115.9	6.83	116.0	6.79	116.0	
	η		139.1		—		139.2		—	
	C'		171.1		—		171.4		—	
	Ala13	H <sup>N</sup>	7.55	119.7	7.73	122.4	7.55	119.7	7.74	122.4
		α	4.36	47.9	4.32	47.3	4.37	47.9	4.32	47.3
β		1.24	16.6	1.16	17.8	1.25	16.7	1.17	17.8	
C'			171.0		170.8		171.3		171.0	
Pro14		α	4.28	60.5	4.36	60.3	4.29	60.5	4.36	60.3
			1.82/1.9		1.95/2.0		1.83/1.9		1.96/2.0	
	β	9	29.3	9	30.9	9	29.2	9	30.9	
	γ	1.83	24.8	1.69	21.8	1.83	24.7	1.69	21.8	
			3.52/3.5		3.33/3.4		3.52/3.5		3.32/3.4	
δ	8	46.9	1	46.5	8	46.9	1	46.5		
C'		171.5				171.2				

FA	$\alpha$	5.60	120.1			5.61	120.2		
	$\beta$	6.30	140.5			6.30	140.5		
	$\gamma$	7.44	124.8			7.44	124.9		
	$\delta$	5.91	149.0			5.91	149.0		
	$\epsilon$	2.38	31.1			2.38	31.0		
	$\zeta$	1.00	22.2			1.00	22.2		
	C'		166.0				166.2		
bAra [Tyr5]	$\alpha$	4.75	101.4	4.72	101.4	4.75	101.4	4.72	101.4
	$\beta$	3.59	70.8	3.58	—	3.59	70.8	3.58	—
	$\gamma$	3.46	72.9	3.69	—	3.47	72.9	3.46	—
	$\delta$	3.69	67.9	3.46	—	3.69	67.9	3.69	—
		3.53/3.7				3.53/3.7			
	$\epsilon$	3	65.8	3.52	—	3	65.8	3.52	—
bAla [Orn2 ]	$\alpha$					3.00	35.8	—	—
	$\beta$					2.44	32.3	—	—
	C'						169.8		

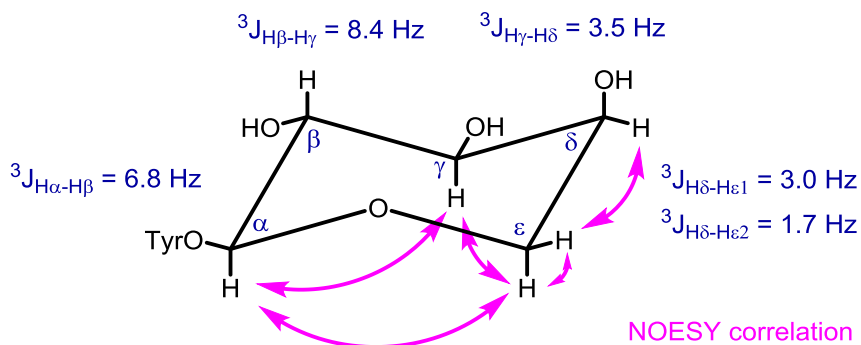
**Приложение 14. Спектр ЯМР 2D NOESY гауземицина А (область Dab6-Pro14)**



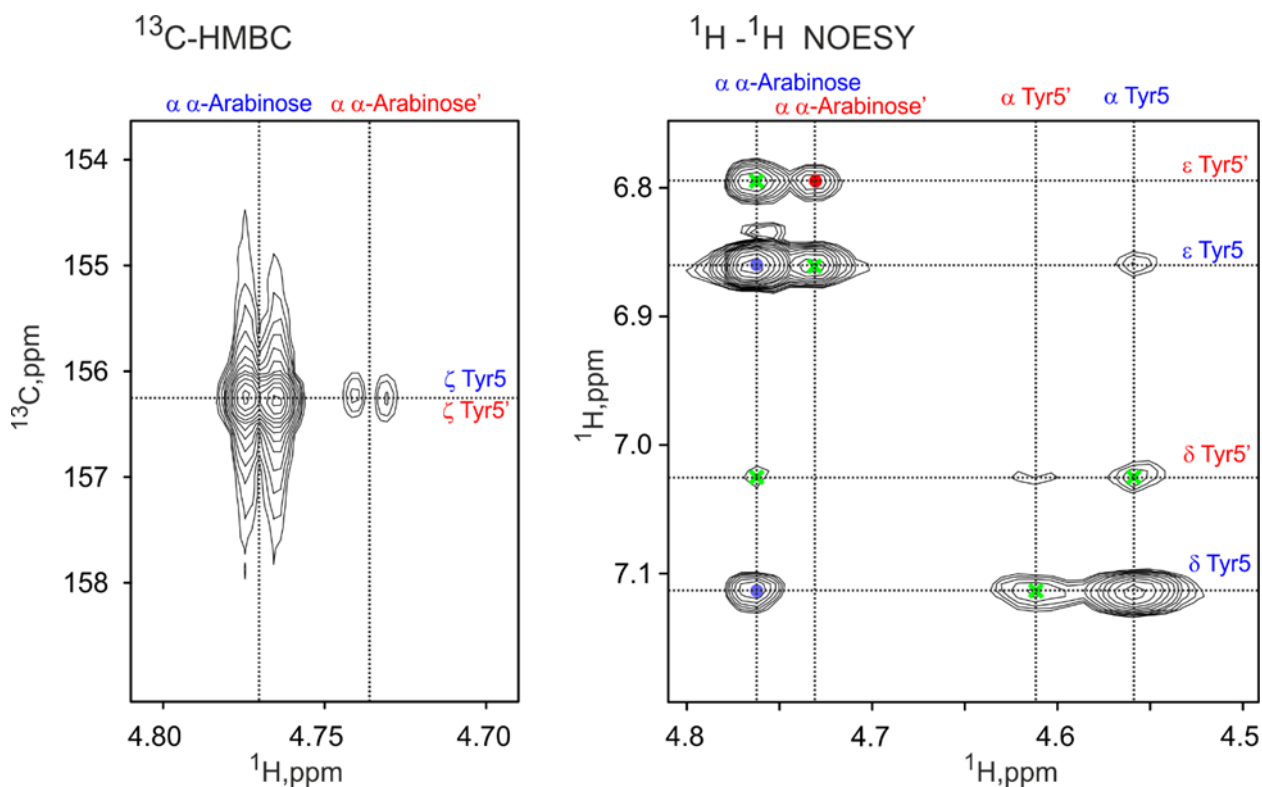
Фрагменты спектра 2D NOESY ( $\tau_m = 400$  мс, DMSO- $d_6$ , 45°C) гауземицина А выявили циклическую природу фрагмента Dab6-Pro14. Контакты между атомами Dab6 и Pro14 показаны синими (основная форма) и красными (второстепенная форма) точками. Зеленые кресты обозначают обменные кросс-пики между основной и второстепенной формами. Сигналы основной и второстепенной форм (Ala13-Pro14, *транс* и *цис*) отмечены синим и красным цветом соответственно.



**Приложение 15. Константы вицинального взаимодействия  $^1\text{H}$  арабинозы,  $^{13}\text{C}$ -HMBC и NOESY кросс-пики между арабинозой и сигналами Tyr5 в гауземицине А**

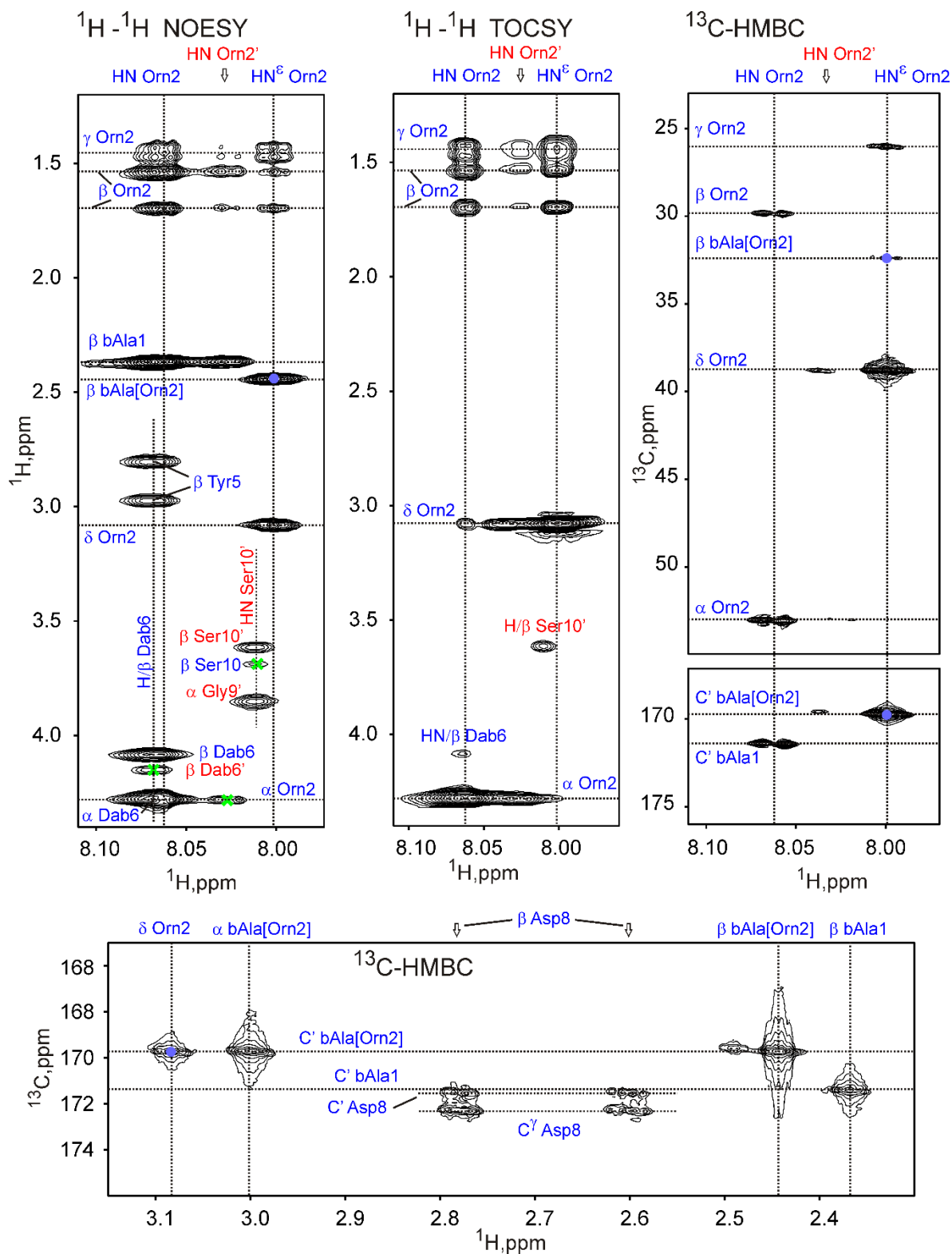


Корреляции NOESY и константы вицинального взаимодействия сахарного фрагмента позволили идентифицировать этот сахар как  $\alpha$ -арабинопиранозу.



Кросс-пики в 2D  $^{13}\text{C}$ -HMBC и NOESY (400 мс) спектрах гауземицина А выявили связь между  $\alpha$ -арабинозной группой и боковой цепью Tyr5.

**Приложение 16. Кросс-пики  $^{13}\text{C}$ -HMBC, TOCSY и NOESY между Orn2 и  $\beta$ Ala боковой цепи в гауземицине В**



Фрагменты спектров NOESY (400 мс), TOCSY и  $^{13}\text{C}$  HMBC гауземицина В выявили дополнительный остаток  $\beta$ -аланина, связанный с амидной группой в боковой цепи Orn2. Контакты между Orn2 и bAla [Orn2] показаны синими точками.

**Приложение 17. Статистика входных данных, используемых для расчета структуры CYANA циклического фрагмента (Tyr5-Pro14) и полноразмерной пептидной цепи гауземицина А**

<b>Ограничения длины и угла</b>	<b>Tyr5-Pro14</b>	<b>Полная длина</b>
<b>Общее число NOE контактов</b>	88	106
межостаточные	23	33
последовательные ( $ i-j =1$ )	29	41
средние ( $1 <  i-j  \leq 4$ )	14	12
дальние ( $ i-j  > 4$ )	22	23
<b>Ограничения торсионного угла</b>	11	16
Угол $\phi$	8	9
Угол $\chi^1$	2	4
Угол $\psi$	1	3
<b>Общие ограничения/на остаток:</b>	99/9.9	122/8.7

**Приложение 18. Статистика лучших CYANA-структур циклического (Tug5-Pro14) фрагмента гауземицина А с различными абсолютными конфигурациями асимметрических центров (C $\alpha$  и C $\beta$ ) в остатке Dab6**

Статистика для расчетных структур	C $^{\alpha}$ – L (S) C $^{\beta}$ – D (R)	C $^{\alpha}$ – L (S) C $^{\beta}$ – L (S)	C $^{\alpha}$ – D (R) C $^{\beta}$ – L (S)	C $^{\alpha}$ – D (R) C $^{\beta}$ – D (R)
Структуры расчетные/отобранные	100/10			
Средняя CYANA целевая функция ( $\text{\AA}^2$ )	0.70 $\pm$ 0.02	1.82 $\pm$ 0.17	1.61 $\pm$ 0.10	1.45 $\pm$ 0.03
<b>Нарушения ограничений</b>				
Расстояние (>0.2 $\text{\AA}$ )	6	13	11	10
Расстояние (>0.5 $\text{\AA}$ )	0	4	2	2
Двугранный угол (>5 $^{\circ}$ )	0	0	1	1
<b>RMSD (<math>\text{\AA}</math>)</b>				
Скелет	0.16 $\pm$ 0.12	0.41 $\pm$ 0.06	1.14 $\pm$ 0.29	0.81 $\pm$ 0.09
Тяжелые атомы	0.85 $\pm$ 0.24	1.17 $\pm$ 0.42	2.09 $\pm$ 0.62	1.60 $\pm$ 0.24

**Приложение 19. Значения целевой функции CYANA (среднее  $\pm$  стандартное отклонение, Å<sup>2</sup>) в наборах полноразмерных структур гауземина А с различными абсолютными конфигурациями асимметрических центров в остатках Ahrb3 (C $\alpha$  и C $\gamma$ ) и hGlu4 (C $\alpha$  и C $\beta$ )**

В каждом случае было рассчитано 100 структур и для анализа выбраны 10 лучших.

<b>Конфигурация Ahrb3/hGlu4</b>	<b>LS</b>	<b>LR</b>	<b>DS</b>	<b>DR</b>
<b>LS</b>	1.82 $\pm$ 0.57	1.76 $\pm$ 0.61	1.46 $\pm$ 0.57	1.67 $\pm$ 0.37
<b>LR</b>	1.93 $\pm$ 0.60	1.98 $\pm$ 0.69	2.06 $\pm$ 0.73	1.99 $\pm$ 0.46
<b>DS</b>	2.08 $\pm$ 0.68	2.61 $\pm$ 0.53	2.58 $\pm$ 0.42	2.26 $\pm$ 0.76
<b>DR</b>	2.23 $\pm$ 0.61	2.36 $\pm$ 0.72	2.52 $\pm$ 0.81	2.64 $\pm$ 0.41

**Приложение 20. RMSD атомов основной цепи (среднее  $\pm$  стандартное отклонение, Å) в наборах полноразмерных структур гауземицина А с различными абсолютными конфигурациями асимметрических центров в остатках AhpB3 (C $\alpha$  и C $\gamma$ ) и hGlu4 (C $\alpha$  и C $\beta$ )**

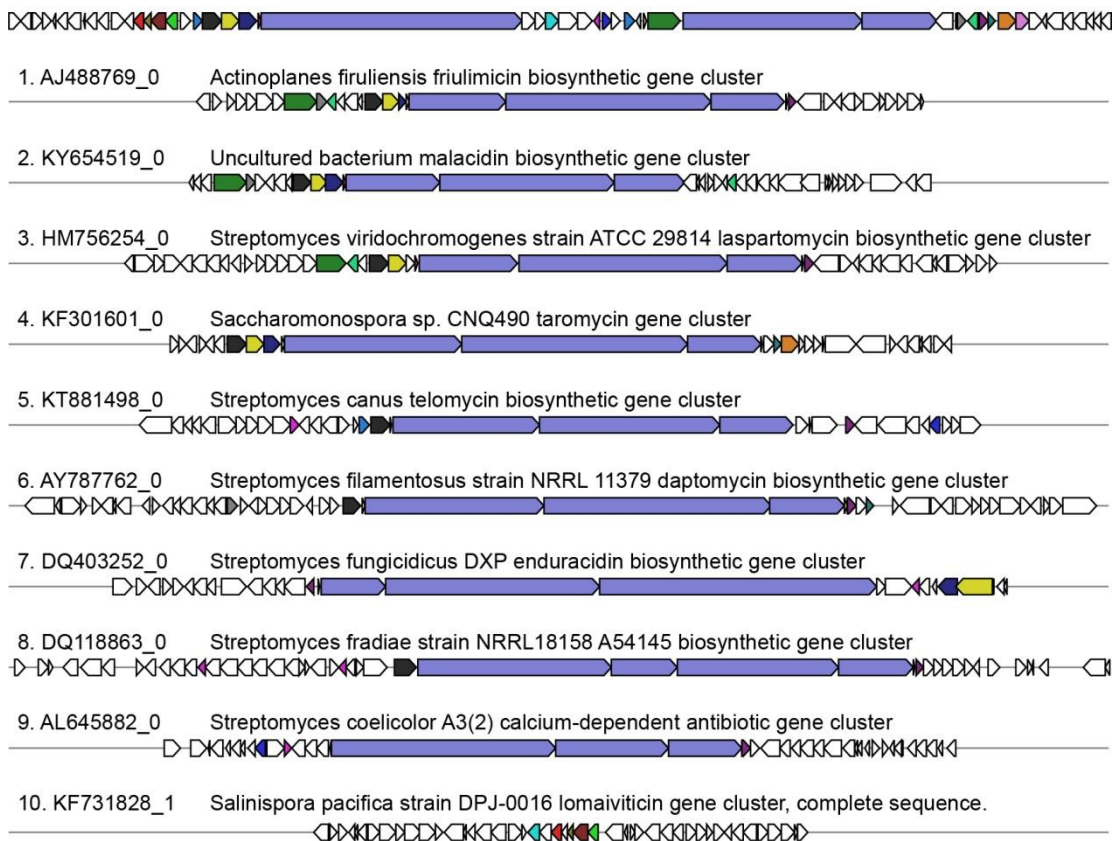
В каждом случае было рассчитано 100 структур и для анализа выбраны 10 лучших.

<b>Конфигурация AhpB3/hGlu4</b>	<b>LS</b>	<b>LR</b>	<b>DS</b>	<b>DR</b>
<b>LS</b>	0.87 $\pm$ 0.24	0.86 $\pm$ 0.14	0.87 $\pm$ 0.06	0.88 $\pm$ 0.18
<b>LR</b>	0.96 $\pm$ 0.31	1.01 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.18	1.07 $\pm$ 0.19
<b>DS</b>	0.98 $\pm$ 0.12	0.92 $\pm$ 0.17	1.02 $\pm$ 0.19	0.80 $\pm$ 0.19
<b>DR</b>	0.93 $\pm$ 0.21	0.92 $\pm$ 0.08	0.97 $\pm$ 0.25	1.13 $\pm$ 0.14

## Приложение 21. Сравнение кластеров NRPS, гомологичных Gau BGC

Гомологичные кластеры из MiBiG, сравнение с помощью MultiGeneBlast с предполагаемым гауземициновым BGC

### Gausemycin biosynthetic gene cluster



## Приложение 22. Анализ BLASTp ферментов, закодированных в *Gau* BGC

ORF	Размер (bp)	Название гена	Предполагаемая функция	Протеин [Организм]	Номер NCBI Gene Bank	E-value	ID%
1	1215	orf1		calcineurin [Streptomyces sp. NRRL S-920]	<b>WP_051820272.1</b>	0.0	88.89
2	1050	orf2	UDP-Ara biosynthesis	alcohol dehydrogenase catalytic domain-containing protein [Streptomyces sp. NRRL S-920]	<a href="#">WP_030793214.1</a>	0.0	88.22
3	921	orf3		hypothetical protein [Streptomyces sp. HST28]	<a href="#">WP_127909017.1</a>	3.00E-89	75.16
4	933	orf4		Ku protein [Streptomyces sp. HST28]	<a href="#">WP_127909018.1</a>	0.0	91.14
5	327	orf5		hypothetical protein [Streptomyces]	<a href="#">WP_030793208.1</a>	9.00E-66	94.44
6	1014	orf6	Ahpb biosynthesis	SDR family oxidoreductase [Streptomyces sp. WAC 01529]	<a href="#">WP_125518190.1</a>	3.00E-171	84.47
7	1185	orf7	UDP-Ara biosynthesis	Zn-dependent alcohol dehydrogenase [Streptomyces sp. NRRL S-920]	<a href="#">WP_030793202.1</a>	0.0	97.46
8	174	orf8		CsbD family protein [Streptomyces sp. HmicA12]	<a href="#">WP_018532571.1</a>	5.00E-26	91.23
9	984	orf9		hypothetical protein [Streptomyces sp. HST28]	<a href="#">WP_127910615.1</a>	0.0	82.01
10	972	orf10	UDP-Ara biosynthesis	SDR family oxidoreductase [Streptomyces sp. SPMA113]	<a href="#">WP_069869837.1</a>	0.0	90.09



11	1164	orf11		acyl-CoA dehydrogenase [Streptomyces]	<a href="#">WP_069869838.1</a>	0.0	90.44
12	927	orf12		hypothetical protein [Streptomyces malaysiensis]	<a href="#">WP_142881337.1</a>	6.00E-173	84.23
13	1035	orf13	AhpB biosynthesis	MULTISPECIES: isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase family protein [Streptomyces]	<a href="#">WP_103537994.1</a>	0.0	96.77
				3-isopropylmalate dehydrogenase [Nostoc punctiforme]	WP_012409012.1	3.00E-39	33.63
14	606	orf14	AhpB biosynthesis	MULTISPECIES: 3-isopropylmalate dehydratase small subunit [Streptomyces]	<a href="#">WP_103537993.1</a>	2.00E-134	95.00
				homoaconitate hydratase family protein [Nostoc punctiforme]	<a href="#">WP_012409013.1</a>	5.00E-09	35.45
15	1395	orf15	AhpB biosynthesis	MULTISPECIES: 3-isopropylmalate dehydratase large subunit [Streptomyces]	<a href="#">WP_103537992.1</a>	0.0	96.55
				homoaconitate hydratase family protein [Nostoc punctiforme]	<a href="#">WP_012409013.1</a>	3.00E-65	32.77
16	1185	orf16	AhpB biosynthesis	MULTISPECIES: pyruvate carboxyltransferase [Streptomyces]	<a href="#">WP_103537991.1</a>	0.0	95.43
				2-benzylmalate synthase HphA [Nostoc punctiforme]	<a href="#">WP_012409019.1</a>	5.00E-19	26.29

17	1056	orf17	glycosylation	MULTISPECIES: glycosyltransferase family 2 protein [Streptomyces]	<a href="#">WP_103537990.1</a>	0.0	94.87
18	903	orf18	regulatory	winged helix-turn-helix transcriptional regulator [Streptomyces sp. SPMA113]	<a href="#">WP_107474662.1</a>	0.0	88.67
19	1815	orf19	Precursor biosynthesis	MULTISPECIES: fatty acyl-AMP ligase [Streptomyces]	<a href="#">WP_103538012.1</a>	0.0	94.83
20	1707	orf20	Precursor biosynthesis	MULTISPECIES: acyl-CoA dehydrogenase [Streptomyces]	<a href="#">WP_103537988.1</a>	0.0	93.82
21	1746	orf21	Precursor biosynthesis	MULTISPECIES: acyl-CoA dehydrogenase [Streptomyces]	<a href="#">WP_103537987.1</a>	0.0	94.85
22	264	orf22	Precursor biosynthesis	MULTISPECIES: hypothetical protein [Streptomyces]	<a href="#">WP_103537986.1</a>	9.00E-47	87.36
23	25344	GauA	Scaffold biosynthesis, X-hydrophilic - X - X - tyr - X	non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces malaysiensis]	<a href="#">WP_099015585.1</a>	0.0	85.75
24	1287	orf24	Pro hydroxylation (monooxygenation)?	MULTISPECIES: cytochrome P450 [Streptomyces]	<a href="#">WP_103537799.1</a>	0.0	97.20
25	957	orf25	Hydroxylation of Glu	TauD/TfdA family dioxygenase [Streptomyces malaysiensis]	<a href="#">WP_099015587.1</a>	0.0	89.31
26	1182	orf26	tyrosine aminotransferase	pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase [Streptomyces malaysiensis]	<a href="#">WP_099015588.1</a>	0.0	89.82

27	1923	orf27	transport	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding pro- tein [Streptomy- ces]	<a href="#">WP_103537802.1</a>	0.0	96.72
28	1455	GauE	Scaffold bio- synthesis, X	hypothetical pro- tein [Streptomy- ces sp. SPMA113]	<a href="#">WP_069869853.1</a>	0.0	87.92
29	660	orf29	regulatory	MULTISPECIES: response regula- tor transcription factor [Strepto- myces]	<a href="#">WP_079153535.1</a>	6.00E- 136	93.12
30	960	orf30	transport	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding pro- tein [Streptomy- ces]	<a href="#">WP_103537806.1</a>	0.0	98.75
31	804	orf31	transport	MULTISPECIES: ABC transporter permease [Strep- tomyces]	<a href="#">WP_103537807.1</a>	2.00E- 178	95.51
32	1002	orf32	regulatory	MULTISPECIES: winged helix- turn-helix tran- scriptional regula- tor [Streptomy- ces]	<a href="#">WP_069869855.1</a>	0.0	86.75
33	510	orf33	aromatic halogenation	flavin reductase family protein [Streptomyces sp. B226SN101]	<a href="#">WP_103546903.1</a>	9.00E-96	91.39
34	213	orf34	NRPS func- tioning	MULTISPECIES: MbtH family pro- tein [Streptomy- ces]	<a href="#">WP_103538195.1</a>	1.00E-43	98.57
35	3153	GauB	Scaffold bio- synthesis, X	MULTISPECIES: amino acid ade- nylation domain- containing pro- tein [Streptomy- ces]	<a href="#">WP_103538194.1</a>	0.0	94.00
36	1743	GauC	Scaffold bio- synthesis,	putative non- ribosomal pep-	<a href="#">ATL86844.1</a>	0.0	78.97

	6		asp - gly - ser - gly - hydro- phobic- aliphatic	tide synthetase [Streptomyces malaysiensis]			
37	7227	GauD	Scaffold bio- synthesis, X - pro	non-ribosomal peptide synthe- tase [Streptomy- ces malaysiensis]	<a href="#">WP_099015593.1</a>	0.0	85.14
38	1641	orf38	regulatory	MULTISPECIES: histidine kinase [Streptomyces]	<a href="#">WP_103538992.1</a>	0.0	92.31
39	216	orf39	2,3- Diaminobu- tyric acid biosynthesis	MULTISPECIES: argininosuccinate lyase [Streptomy- ces]	<a href="#">WP_103538995.1</a>	2.00E-10	44.64
40	912	orf40	Regula- tion/resistan- ce?	MULTISPECIES: kinase [Strepto- myces]	<a href="#">WP_103538994.1</a>	0.0	96.19
41	987	orf41	Hydroxyla- tion of Glu	MULTISPECIES: hypothetical pro- tein [Streptomy- ces]	<a href="#">WP_103538990.1</a>	0.0	93.29
42	849	orf42		MULTISPECIES: alpha/beta hydro- lase [Streptomy- ces]	<a href="#">WP_103538989.1</a>	2.00E- 179	91.13
43	729	orf43		MULTISPECIES: tryptophan 2,3- dioxygenase [Streptomyces]	<a href="#">WP_103538988.1</a>	3.00E- 155	94.14
44	1599	orf44	aromatic halogenation	MULTISPECIES: tryptophan 7- halogenase [Streptomyces]	<a href="#">WP_103538987.1</a>	0.0	97.73
45	1290	orf45	transport	cation/H(+) anti- porter [Strepto- myces malay- siensis]	<a href="#">WP_099015597.1</a>	0.0	85.51
46	1254	orf46		decarboxylase [Streptomyces malaysiensis]	<a href="#">WP_099015598.1</a>	0.0	83.89
47	462	orf47		NUDIX domain- containing pro-	<a href="#">WP_069867525.1</a>	4.00E-97	90.20

				tein [Streptomyces sp. SPMA113]			
48	1524	orf48	Scaffold biosynthesis, X	MULTISPECIES: long-chain fatty acid--CoA ligase [Streptomyces]	<a href="#">WP_069867524.1</a>	0.0	84.80
49	1053	orf49	resistance	MULTISPECIES: aminoglycoside phosphotransferase family protein [Streptomyces]	<a href="#">WP_069867523.1</a>	0.0	82.95
50	1194	orf50		hypothetical protein [Streptomyces malaysiensis]	<a href="#">WP_099015600.1</a>	0.0	82.41
51	642	orf51		hypothetical protein [Streptomyces sp. SPMA113]	<a href="#">WP_069867521.1</a>	7.00E-139	88.73
52	804	orf52		class I SAM-dependent methyltransferase [Streptomyces sp. SPMA113]	<a href="#">WP_079153219.1</a>	3.00E-152	82.64%
53	1005	orf53		hypothetical protein SMALA_6641 [Streptomyces malaysiensis]	<a href="#">ATL86862.1</a>	3.00E-179	77.78%
54	987	orf54		aldo/keto reductase [Streptomyces sp. SPMA113]	<a href="#">WP_069867518.1</a>	0.0	92.68%
55	771	orf55		MULTISPECIES: glucose 1-dehydrogenase [Streptomyces]	<a href="#">WP_069867517.1</a>	2.00E-171	94.92%
56	1077	orf56		myo-inositol-1-phosphate synthase [Streptomyces sp. SPMA113]	<a href="#">WP_069867516.1</a>	0.0	89.94%
57	804	orf57		histidinol-phosphatase [Streptomyces malaysiensis]	<a href="#">WP_099015605.1</a>	4.00E-179	91.76%

58	1218	orf58		MULTISPECIES: S-adenosylmethionine synthetase [Streptomyces]	<a href="#">WP_079153218.1</a>	0.0	92.10%
59	1023	orf59		hypothetical protein [Streptomyces malaysiensis]	<a href="#">WP_069867514.1</a>	0.0	84.71%
60	567	orf60		MULTISPECIES: hypothetical protein [Streptomyces]	<a href="#">WP_141765311.1</a>	2.00E-96	82.58%
61	1278	orf61		DegT/DnrJ/EryC1/StrS family aminotransferase [Streptomyces malaysiensis]	<a href="#">WP_099015606.1</a>	0.0	89.65%
62	492	orf62		NUDIX domain-containing protein [Streptomyces sp. SPMA113]	<a href="#">WP_141765310.1</a>	6.00E-95	87.65%
63	735	orf63		class I SAM-dependent methyltransferase [Streptomyces malaysiensis]	<a href="#">WP_069867510.1</a>	1.00E-154	83.61%
64	324	orf64		MULTISPECIES: hypothetical protein [Streptomyces]	<a href="#">WP_069867509.1</a>	2.00E-45	88.24%
65	750	orf65		HAD hydrolase family protein [Streptomyces malaysiensis]	<a href="#">WP_107528536.1</a>	2.00E-114	78.71%
66	1023	orf66	UDP-Ara biosynthesis	UDP-glucose 4-epimerase [Streptomyces malaysiensis]	<a href="#">ATL86874.1</a>	0.0	87.28%
67	912	orf67		MULTISPECIES: hypothetical protein [Streptomyces]	<a href="#">WP_069867507.1</a>	0.0	92.74%
68	1131	orf68		hypothetical protein [Streptomyces]	<a href="#">WP_069867506.1</a>	0.0	81.38%

				ces sp. SPMA113]			
--	--	--	--	------------------	--	--	--

## Приложение 23. Анализ доменов аденилирования в NRPS Gau BGC

Прогнозируемая селективность и код Stachelhaus [Stachelhaus, T.; Mootz, H. D.; Marahiel, M. A. The Specificity-Confering Code of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases. *Chem. Biol.* **1999**, 6 (8), 493–505. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(99\)80082-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(99)80082-9)] доменов аденилирования в GauA-GauD NRPS.

Ген	Домен аденилирования	Последовательность Stachelhaus	Ближайший Stachelhaus код	Совпадение Stachelhaus кода	Тип аминокислоты
GauA	1	IDTtvSIGDK	ala-b	70% (weak)	N/A
	2	DtwDLGIVDK	gln	70% (weak)	hydrophilic
	3	DtWAttgVgK	phe	50% (weak)	N/A
	4	DAWQaGLvDK	gln	80% (moderate)	hydrophilic
	5	DASTtAAVCK	tyr	90% (moderate)	hydrophobic-aromatic
	6	DALlvGAVMK	phe	80% (moderate)	hydrophobic-aliphatic
GauB	1	DiWQstadDK	gln	50% (weak)	N/A
GauC	1	DLTKvGAVNK	asp	90% (moderate)	hydrophilic
	2	DILQLGvVWK	gly	90% (moderate)	hydrophobic-aliphatic
	3	DVWHISLVDK	ser	90% (moderate)	hydrophobic-aliphatic
	4	DILQLGvVWK	gly	90% (moderate)	hydrophobic-aliphatic
	5	DAWTttglaK	phe	60% (weak)	hydrophobic-aliphatic
GauD	1	DILQmGgVyK	gly	70% (weak)	N/A
	2	DVQIAAHVVK	pro	90% (moderate)	hydrophobic-aliphatic



## Приложение 24. Сравнение предполагаемых белков, кодирующих Dab

Предполагаемые последовательности синтаз диаминамасляной кислоты были получены из базы данных MIBiG: BGC0000354 (фриулимицин A), BGC0000379 (ласпартомицин), BGC0001448 (малацидин).

Протеин	Гомологичные ферменты	Кластер	BLAST score	E value	Per. Ident
ctg1_6207	MlcT	BGC0001448	469	6e-165	49.69%
		BGC0000354	150	2e-43	63%
		BGC0000379	178	7e-54	60%
ctg1_6208	MlcB	BGC0001448	233	4e-79	47.37%
ctg1_6209	MlcS	BGC0001448	750	0	52.76%
	DabA	BGC0000354	231	2e-67	42.72%
	DabA	BGC0000379	248	2e-61	44.13%

**Приложение 25. Активность гауземицина против клинических изолятов *Staphylococcus* sp.**

МИС (µg/mL)									
Штамм	N	Гауземицин				Даптомицин		Ванкомицин	
		А		В		медiana	интервал	медiana	интервал
		медiana	интервал	медiana	интервал				
<b>Коагулазо-положительные <i>Staphylococcus</i> (КПС)</b>									
<i>S. aureus</i> (MSSA)	11	0.125	0.125–0.5	0.5	0.125–0.5	0.5	0.25–0.5	1	0.5–1
<i>S. aureus</i> (MRSA)	12	0.125	0.125–0.5	0.5	0.125–1	0.5	0.25–1	1	0.5–1
<i>S. intermedius</i> (MSS)	1	0.25	-	0.5	-	0.25	-	1	-
<i>S. intermedius</i> (MRS)	1	0.125	-	0.25	-	0.125	-	1	-
Все КПС (MSS+MRS)	25	0.125	0.125–0.5	0.5	0.125–0.5	0.25	0.125–1	1	0.5–1
<b>Коагулазо-негативные <i>Staphylococcus</i> (КПС)</b>									
<i>S. epidermidis</i> (MSSE)	10	0.25	0.125–0.25	0.5	0.25–0.5	0.375	0.25–0.5	1	0.5–1
<i>S. epidermidis</i> (MRSE)	7	0.25	0.125–0.25	0.375	0.25–0.5	0.5	0.25–1	1.5	0.5–2
Другие КНС MSS*	5	0.25	0.125–0.25	0.5	0.5–1	0.25	0.125–0.5	0.5	0.5–1
Другие КНС MRS**	13	0.25	0.125–0.25	0.5	0.5–1	0.25	0.25–0.5	0.5	0.5–1
Все КНС (MSS+MRS)	35	0.25	0.125–0.25	0.5	0.5–1	0.25	0.125–0.5	0.5	0.25–2

N – количество изученных штаммов; MSS – methicillin susceptible *Staphylococcus* sp.; MRS – Methicillin-resistant *Staphylococcus* sp.

\* *S. haemolyticus* (2), *S. cohnii* (1), *S. simulans* (1), *S. warneri* (1)

\*\* *S. haemolyticus* (6), *S. cohnii* (1), *S. simulans* (1), *S. sciuri* (2), *S. klosii* (1), *S. capitis* (1), *S. warneri* (1)