

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых
антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

На правах рукописи



Омельчук Ольга Александровна

**Химическая модификация макролидного антибиотика
олигомицина А и изучение связи структура-активность**

04.06.01 Химические науки

02.00.03 Органическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

Д.х.н., проф. РАН Щекотихин Андрей Егорович

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Выделение и установление структуры антибиотиков семейства олигомицинов.....	12
1.2. Выделение и исследование других макролидных антибиотиков, родственных олигомицинам.....	18
1.3. Выделение и исследование природных макролидных ингибиторов АТФ-синтазы.....	20
1.4. Особенности механизма действия и биологической активности олигомицина А и других макролидных ингибиторов АТФ-синтазы.....	31
1.5. Направленная модификация природных антибиотиков – ингибиторов АТФ-синтазы.....	42
1.5.1. Модификация олигомицина А.....	43
1.5.2. Модификация апоптолидина.....	61
1.5.3. Модификация манделаидов.....	80
1.6. Заключение.....	83
2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	85
2.1. Восстановление двойных С-С и С-О связей олигомицина.....	86
2.2. Окисление двойной С-С связи и формилирование олигомицина....	97
2.3. Реакции [4+2]циклоприсоединения олигомицина А с активными диенофилами.....	103
2.4. Модификация боковой гидроксипропильной цепи олигомицина А114	
2.5. Разработка методов селективного ацилирования гидроксильных групп олигомицина А.....	123
2.6. Биологические исследования.....	132
2.7. Заключение.....	138
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	140
ВЫВОДЫ.....	151
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	153

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ	аденозинтрифосфат
АФК	активные формы кислорода
ГТФ	гуанозинтрифосфат
МАМ	митохондрии, ассоциированные с мембраной эндоплазматического ретикулума
СЗК	стволовые злокачественные клетки
ЭР	эндоплазматический ретикулум
АМРК	5'аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа
Bn	бензильная группа
BNE	конъюгат бицикло[6.1.0]нонина с полиэтиленгликолем
Вос	<i>трет</i> -бутоксикарбонильная группа
Cy3	цианиновый краситель
DBU	диазабциклоундецен
DDQ	2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон
DIA	диизопропиламин
DIEA	диизопропилэтилендиамин
DMAP	диметиламинопиридин
DMF	диметилформамид
DMSO	диметилсульфоксид
ER	рецепторы эстрогена
EWG	электроноакцепторная группа
FCCP	карбонилцианид-4-трифторметоксифенилгидразон
GLI1	глиома-ассоциированный белок 1
HIF-1 α	гипоксия индуцируемый фактор
HMPA	гексаметилфосфортриамид
<i>m</i> -CPBA	<i>m</i> -хлорпероксибензойная кислота
mPTP	митохондриальные Ca ²⁺ зависимые поры

Ms	метансульфонильная группа
mTORC1	комплекс 1 мишени рапамицина в клетках млекопитающих
NMP	N-метилпирролидон
P-gp	P-гликопротеин
PMB	<i>n</i> -метоксибензильная группа
Pu	пиридин
PuBOP	бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфония гексафторфосфат
PuBroP	бромотриспирролидинофосфония гексафторфосфат
SERCA	Ca ²⁺ -АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулула
TBAB	тетрабутиламмоний бромид
TBDMS	<i>трет</i> -бутилдиметилсилильная группа
TBDPS	<i>трет</i> -бутилдифенилсилильная группа
TBS	трибутилсилильная группа
TES	триэтилсилильная группа
TESOTf	триэтилсилильный эфир трифторметансульфоновой кислоты
TFA	Трифторуксусная кислота
Tf ₂ O	ангидрид трифторметансульфоновой кислоты
THF	тетрагидрофуран
TMSOTf	триметилсилильный эфир трифторметансульфоновой кислоты
TNF	фактор некроза опухоли
TRAIL	цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд, индуцирующий апоптоз
UGT1A	уридин 5'-дифосфат глюкуронилтрансфераза 1A

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время АТФ-синтаза рассматривается в качестве перспективной биологической мишени для разработки препаратов нового поколения [1] для терапии онкологических [2, 3] и инфекционных заболеваний [4, 5]. Олигомицин А является высокоактивным ингибитором F_0F_1 АТФ-синтазы и обладает высокой противогрибковой и антипролиферативной активностью, что обуславливает перспективность его использования в качестве основы для разработки новых лекарственных препаратов. Основными проблемами, возникающими при применении противоопухолевых средств, являются их высокая токсичность для нормальных клеток и развитие множественной лекарственной устойчивости после курса химиотерапии. Результаты скрининга антипролиферативной активности 37 000 веществ показали, что олигомицин А входит в 0,1% наиболее селективных соединений в отношении злокачественных линий клеток человека NCI-60 [6]. Олигомицин А также способен преодолевать множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток [7, 8]. Однако, практическое применение этого антибиотика ограничено его высокой токсичностью для клеток млекопитающих и низкой растворимостью в водных средах. Важнейшим методом оптимизации физико-химических и фармакологических свойств природных антибиотиков является их химическая модификация. Синтез ранее неизвестных производных олигомицина А позволит получить новые данные о связи структура-активность в этом ряду и может привести к открытию низкотоксичных полусинтетических олигомицинов, сохраняющих химиотерапевтические свойства исходного антибиотика.

Целями данного исследования ставились разработка новых направлений химической модификации и получение данных о связи

структура-активность в ряду макролидного антибиотика олигомицина А. Для достижения намеченной цели были **поставлены следующие задачи:**

- химическая модификация двойных С-С и С-О связей олигомицина А;
- химическая модификация боковой гидроксипропильной цепи антибиотика;
- ацилирование гидроксильных групп антибиотика;
- очистка и установление строения новых производных олигомицина А с помощью физико-химических методов анализа;
- анализ связи структура-активность на основе результатов скрининга цитотоксической и противогрибковой активности новых производных олигомицина А.

Научная новизна

Разработаны новые методы селективной химической модификации олигомицина А: региоселективное каталитическое гидрирование двойных связей олигомицина, регио- и стереоспецифичное восстановление карбонильных групп антибиотика, эпоксидирование С16-С17 двойной связи с последующим раскрытием цикла, [4+2] циклоприсоединение к диеновой системе, а также найдены способы селективного ацилирования, окисления, эпитомеризации С33-ОН группы и ацилирования С9-ОН группы антибиотика без использования защитных групп. Изучение биологических свойств производных олигомицина А позволили получить новые данные о связи структура-активность. Впервые найдены высокоактивные и менее токсичные полусинтетические производные олигомицина А.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанные в рамках выполнения диссертационного исследования методы химической модификации олигомицина А могут быть использованы для модификации других антибиотиков со схожей структурой и ценной биологической активностью (маклафунгин, неомаклафунгины, оссамицин и др.). Ряд полученных производных олигомицина А, обладающих сниженной цитотоксичностью и высокой активностью, перспективен для дальнейших

углубленных биологических исследований. Кроме того, полусинтетические производные олигомицина А востребованы для исследования механизмов формирования антибиотикорезистентности.

Методология и достоверность диссертационного исследования

В рамках выполнения данного исследования новые методики получения полусинтетических производных изложены достаточно подробно для возможности их воспроизведения, физико-химические и спектральные характеристики полусинтетических олигомицинов приведены в полном объеме. Очистка полученных соединений проведена методами прямой колоночной хроматографии и флеш-хроматографии. Установление строения проведено с помощью современных методов физико-химического анализа: спектроскопии ЯМР, включая двумерные корреляционные спектры (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC) и масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS ESI). Оценка чистоты проводилась методом ВЭЖХ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Химическая модификация антибиотика олигомицина А является перспективным способом оптимизации его биологических свойств (снижения токсичности и сохранения высокой противоопухолевой и противогрибковой активности).
2. Для выявления связи структура-активность целесообразна разработка селективных методов модификации структуры олигомицина А по трем направлениям: (I) трансформация двойных С-С и С-О связей макроцикла, (II) трансформация боковой гидроксипропильной цепи и (III) ацилирование гидроксильных групп антибиотика.
3. Модификацию олигомицина возможно осуществить за 1-2 стадии с использованием коммерчески доступных реагентов без применения защитных групп. Селективность трансформации этого антибиотика достигается за счет различий в реакционной способности функциональных

групп, стерических факторов, хирального окружения и подбора реагентов, катализаторов и других условий реакций.

4. Наиболее перспективными направлениями модификации олигомицина являются трансформация боковой гидроксипропильной цепи и ацилирование С9-ОН группы. Ряд производных, модифицированных по С33 и С9 положениям, проявляют высокую активность и сниженную токсичность *in vitro*.

Апробация результатов исследования

Материалы работ были представлены в виде постерных и устных докладов на 14 международных и российских конференциях: Dombay Organic Conference Cluster DOCC-2016 (Домбай, Карачаево-Черкесская респ., Россия, 2016), Кластер конференций по органической химии «ОргХим-2016» (Санкт-Петербург, Россия, 2016), Solutions for Drug-Resistant Infections conference 2017 «SDRI-2017» (Brisbane, Australia, 2017), 42, 43 и 44 FEBS Congresses (Jerusalem, Israel, 2017; Prague, Czech Republic, 2018; Krakow, Poland, 2019), VIII и IX научные конференции молодых ученых «Инновации в химии: достижения и перспективы» (Москва, Россия, 2017 и 2018), The IV and V International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing» (Москва, Россия, 2017 и 2019), 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry (Казань, Россия, 2017), XV Всероссийская научно-практическая конференция имени А.Ю. Барышникова "Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы достижения, перспективы" (Москва, Россия, 2018), VIII EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry (Афины, Греция, 2019), Научная конференция с международным участием "Вакцинология как ответ биологическим угрозам" (Москва, Россия, 2019).

Публикации

Результаты работы опубликованы в 6 научных статьях в журналах *Macroheterocycles*, *J. Antibiotics*, *Natural Product Research* (индексируются в WoS, Scopus) и в 4 тезисах докладов в журналах *FEBS Journal* и *FEBS*

OpenBio (WoS, Scopus) и в Российском биотерапевтическом журнале (РИНЦ, RSCI). По результатам работы получен патент РФ № 2623087.

Личный вклад автора

Разработка методов химической модификации олигомицина, проведение синтеза, выделения и очистки полусинтетических производных олигомицина А, проведение физико-химических анализов (ВЭЖХ, снятие УФ-спектров), интерпретация результатов исследований методами масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии; анализ результатов скрининга биологической активности производных, установление связи структура-активность.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность к.б.н. Лысенковой Л.Н., д.х.н. Королеву А.М., к.х.н. Деженковой Л.Г., к.б.н. Грамматиковой Н.Э., Белову Н.М., Малютиной Н.М. (ФГБНУ «НИИНА»); к.б.н. Щербакову А.А. (РОНЦ им. Н.Н. Блохина); д.б.н., проф. Даниленко В.Н., к.б.н. Беккер О.Б., к.б.н. Ватлину А.А. (ИОГен РАН), к. ф.-м. н. Медведеву М.Г. (ИОХ им. Зелинского РАН), Савельеву О.Ю. (МГУ им. М.В. Ломоносова).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Работа изложена на 170 страницах машинописного текста, включает 24 рисунка, 44 схемы и 14 таблиц. Список цитируемой литературы включает 168 библиографических ссылок.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В медицинской практике термин «макролидные антибиотики» традиционно означает антимикробные препараты широкого спектра действия, активными компонентами которого являются 14-ти, 15-ти и 16-членные гликозилированные макролиды. Широкое применение в противомикробной терапии нашли как природные антибиотики (препараты первого поколения – эритромицин, олеандомицин, пикромицин), так и их полусинтетические производные (препараты второго и третьего поколений – кларитромицин, азитромицин, солитромицин). Биологической мишенью данных антибиотиков является субъединица 50S бактериальной рибосомы [9]. Однако, в медицинской химии, микробиологии и биохимии класс макролидных антибиотиков понимается в более широком смысле. К настоящему времени выделено и охарактеризовано множество биологически активных природных метаболитов поликетидного строения, в основе структуры которых лежит макролактонный цикл. Одним из вариантов классификации природных макролидов может быть их разделение по принципу механизма биологического действия. Так, помимо противомикробных макролидов, выделяется как минимум еще две крупных группы макроциклических антибиотиков – противогрибковые полиеновые макролиды, биологической мишенью которых является эргостерин, и макролидные антибиотики-ингибиторы АТФ-синтаз. Основными представителями противогрибковых полиеновых макролидов являются амфотерицин, нистатин и натамицин; механизм их действия связан с нарушением функционирования мембраны грибковых клеток за счет связывания с эргостерином и образования трансмембранных каналов [10, 11]. Основными представителями макролидных антибиотиков-ингибиторов F_0F_1 АТФ-синтаз являются олигомицины, апоптолидины, оссамицин, цитоварицины и вентурицидины [12]. Некоторые плекомакролиды, такие как бафиломицин и конканамицин, являются специфическими ингибиторами

АТФаз V-типа [13]. Стоит также отдельно отметить иммуносупрессорные макролидные антибиотики, используемые в клинической практике – рапамицин и такролимус, биологической мишенью которых является цитозольный белок FKBP 12 [14, 15]. Еще одно семейство природных биологических веществ с ценной терапевтической активностью, не входящее в вышеперечисленные группы макролидов – авермектины, также являются макролидными антибиотиками. Наиболее значимый представитель семейства – ивермектин, полусинтетическое производное природного антибиотика авермектина В₁, является важнейшим противопаразитным препаратом, механизм действия которого связан с воздействием на глутаматрегулируемые хлорные каналы [16].

Химия и биология противомикробных и противогрибковых макролидов хорошо изучена и систематизирована в свежих обзорах [9-11], тогда как для макролидных ингибиторов митохондриальной АТФ-синтазы накопленные знания практически не подвергались систематическому анализу. Данный обзор посвящен рассмотрению исторического развития знаний химии и биологии семейства олигомицинов, и, в частности, олигомицина А, как одного из наиболее известных, «модельных» ингибиторов АТФ-синтазы. Кроме того, в обзоре будут рассмотрены и другие макролиды, близкие по структуре и биологическому действию к олигомицинам.

1.1. Выделение и установление структуры антибиотиков семейства олигомицинов

В большинстве случаев продуцентами макролидных антибиотиков являются актиномицеты рода *Streptomyces*. Первоначально олигомицины были выделены из *S. diastatochromogenes* [17]. Позднее были найдены и другие штаммы *Streptomyces*, продуцирующие олигомицины: *S. avermitilis* [18], оказавшийся высокопроизводительным продуцентом (концентрация антибиотика составила 1,461 мкг/мл культуральной жидкости) [19], *S. ostreogriseus* [20], *S. lydicus* [21], *S. libani* [22], *S. griseolus* [23], *S. cyaneogriseus* [24], *S. diastaticus* [25], *S. gancidicus* [26].

Макролидные антибиотики семейства олигомицинов были открыты в виде смеси компонентов А, В и С в 50-х годах XX века, однако представления об их структуре были весьма неточными [27]. Изначально молекулярные массы олигомицинов были занижены примерно в 2 раза, видимо, это было связано с деградацией антибиотиков в процессе подготовки пробы для проведения масс-спектрометрии [28], а правильная молекулярная масса и брутто формула олигомицинов А, В и С была установлена спустя 10 лет [29, 30]. Пионерские исследования структуры олигомицинов проводилось в отношении минорных представителей семейства. Так, установление структуры данных антибиотиков началось с изучения строения продуктов деградации олигомицина В в условиях основного гидролиза. Полученных данных было недостаточно для каких-либо однозначных выводов, однако результаты исследования говорили о том, что структура молекулы должна содержать гетероциклический макроцикл с тремя ненасыщенными С-С связями, замещенный карбонильными, метильными и гидроксильными группами, и сочлененный с двумя насыщенными шестичленными гетероциклами [31]. Позже удалось получить кристаллы антибиотиков, и с помощью рентгеноструктурного анализа установить структуру олигомицина В [32] и олигомицина D (также известного как рутамицин) [33].

Любопытен тот факт, что структуру олигомицина А первыми установили Morris G.A. и Richards M.S., используя исключительно данные ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии в процессе изучения неизвестного антибиотика, который позднее был идентифицирован как олигомицин А по физико-химическим и спектральным характеристикам [34]. В это же время G.T. Carter провел независимые химические исследования строения олигомицинов А и С методом сравнения продуктов деградации этих антибиотиков с соответствующими продуктами деградации олигомицина В [35]. Результаты исследования коррелировали с определенным ранее строением олигомицина А методом ЯМР-спектроскопии, а также впервые позволили установить структуру олигомицина С. Итак, структура олигомицинов представляет собой замещенный 26-членный α,β -ненасыщенный лактон поликетидного строения, содержащий сопряженную диеновую систему и сочлененный с бициклической спирокетальной структурой, содержащей боковую гидроксипропильную цепь (рис. 1.1). Олигомицин В отличается от олигомицина А наличием кето-группы в положении С28 спирокетального фрагмента, олигомицин С – отсутствием гидроксильной группы в положении С12, а олигомицин D – отсутствием метильного заместителя в положении С26 спирокетального фрагмента. В своем исследовании G.T. Carter также сделал заключение о том, что олигомицин С является биосинтетическим предшественником олигомицина А, который, в свою очередь, может быть конвертирован в олигомицин В на более поздних стадиях биосинтеза [35].

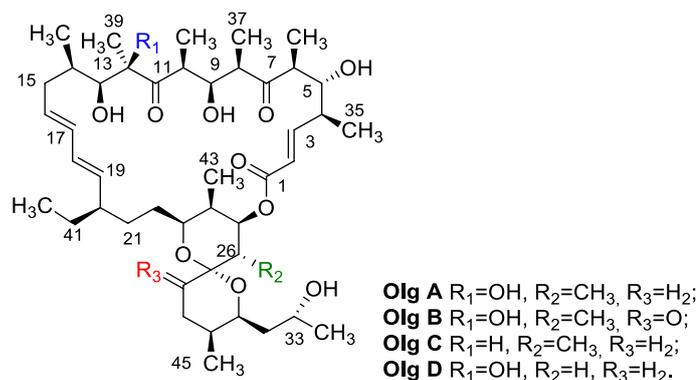


Рисунок 1.1. Структура олигомицинов А, В, С и D

Развитие методов физико-химического анализа в совокупности с накопленным опытом определения структур макролидных антибиотиков семейства олигомицинов позволило успешно установить структуру ряда природных олигомицинов в дополнении к известным А, В, С и D. Так, в 80-х годах были выделены и охарактеризованы 12-дезоксидолигомицин D (рутамицин В) [36] и олигомицин Е, главное отличие структуры которого от остальных олигомицинов состоит в наличии гидроксильной группы в положении С26 спирокетального фрагмента (другим названием олигомицина Е может быть 26-гидроксиолигомицин В) [37] (рис. 1.2). Олигомицин F, еще один представитель семейства олигомицинов, выделенный в 90-х годах, отличается от олигомицина А удлиненной на один атом углерода боковой цепью (т.е. С4С замещен метильной группой) (рис. 1.2) [38]. Наконец, были выделены и охарактеризованы олигомицин G, структура которого отличалась от структуры олигомицина А отсутствием метильных заместителей в С10 и С12 положениях [39], и олигомицин SC-II, или 7-гидро-10-дезметил-олигомицин А [40] (рис. 1.2).

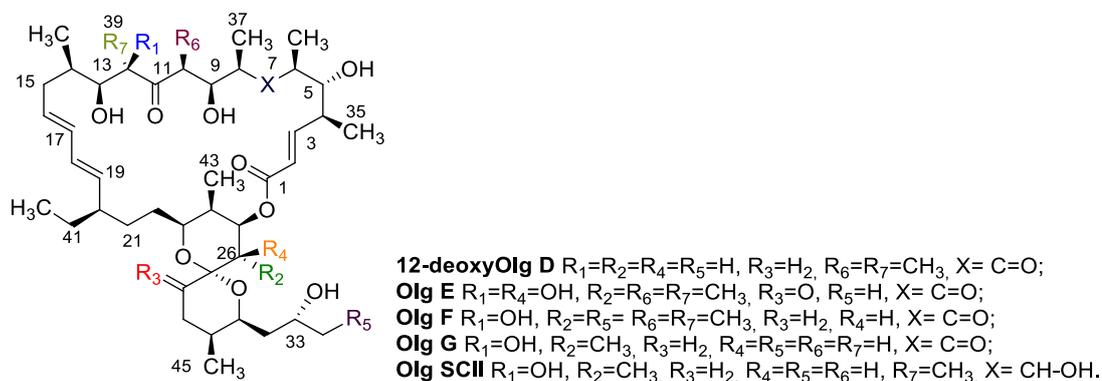


Рисунок 1.2. Структуры других природных олигомицинов.

Для олигомицинов А, В, С и Е были найдены их 44-гомоаналоги, т.е. содержащие в С26 положении спирокетального фрагмента этильный заместитель вместо метильного. Также, был выделен аналог гомоолигомицина В, содержащий метильный заместитель вместо этильного в положении С20. Структуры антибиотиков устанавливались методами ЯМР-

спектроскопии [20, 41, 42] (рис. 1.3). 44-Гомоолигомицин А был также запатентован под шифром NK130119 [43], а 44-гомоолигомицин В – под шифром NK86-0279 [44]. Структура гомоолигомицина В была подтверждена рентгеноструктурным анализом [45].

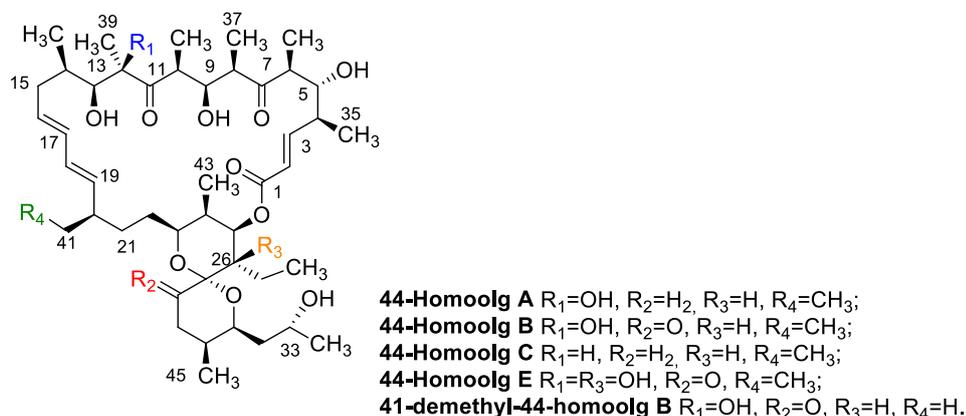


Рисунок 1.3. Структуры 44-гомоолигомицинов

Спектр биологической активности всех природных олигомицинов примерно одинаков – все антибиотики проявляли высокую противогрибковую и цитотоксическую активность, тогда как грам-положительные и грам-отрицательные бактерии были не чувствительны к их действию (за исключением олигомицина Е, см. подробнее в разделе 2.4).

Впервые абсолютная конфигурация хиральных центров олигомицинов была доказана группой D.A. Evans, осуществившей полный синтез 12-дезоксиолигомицина D (рутамицина В) [46]. Относительная конфигурация хиральных центров была тщательно исследована для структур олигомицинов В и С по совокупности данных ЯМР спектроскопии и рентгеноструктурного анализа. Так, анализ геминальных и вицинальных констант спин-спинового С-Н и С-С взаимодействия в спектрах олигомицинов В и С в сравнении с торсионными углами, полученными из данных кристаллических структур олигомицина D и 44-гомоолигомицина В, позволил установить конформацию структур олигомицинов в растворе [47]. Позднее относительная конфигурация хиральных центров была определена для олигомицина А

методом ЯМР спектроскопии, разработанном для определения анти- или син-конфигурации α и β положений в структуре соединений, полученных по реакциям альдольной конденсации, и основанного на анализе гетероядерных $^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$ констант дальнего спин-спинового взаимодействия в дополнение к гомоядерным константам $^3J_{HH}$ [48]. Наконец, абсолютные конфигурации 18 хиральных центров олигомицинов были однозначно доказаны в исследовании структуры 21-гидроксиолигомицина А методами ЯМР-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа [24]. Позднее в работе Palmer R.A. и Potter B.S. общепринятая структура олигомицина А была подвергнута сомнению. Результаты рентгеноструктурного анализа олигомицинов А, В и С свидетельствовали о том, что боковая гидроксипропильная цепь в структуре олигомицина А, в отличие от олигомицинов В и С, должна быть ненасыщенной [49, 50]. Однако, сами авторы не исключают, что противоречивые результаты исследований могут являться следствием либо отличия форм олигомицина А в зависимости от штамма-продуцента, либо возможной трансформации антибиотика в процессе кристаллизации. Кроме того, в работе не приведены другие методы анализа (масс-спектрометрия и ЯМР-спектроскопия) строения антибиотиков, что дополнительно ставит под сомнения результаты исследования.

Интересные результаты были получены в процессе масс-спектрометрического MS/MS анализа олигомицина А. Оказалось, что деградация молекулы происходит по различным путям в зависимости от режима ионизации (положительного или отрицательного). В случае положительного режима сначала происходит расщепление макролактона и отщепление C1-C5 фрагмента и молекулы воды у C25 положения спирокетального кольца, затем ретроальдольный распад поликетидного фрагмента; в результате остается C13-C33 альдегид с m/z 447. В отрицательном эксперименте возможны два пути фрагментации: либо ретроальдольная деградация полиольного участка с последующим отщеплением C1-C5 участка и образованием альдегида с m/z 463, либо

ретроальдольное расщепление C8-C9 связи и присоединение карбаниона по Михаэлю к C3 положению с образованием C3-C8 шестичленного цикла. Дальнейшая деградация данного фрагмента приводит в итоге к альдегиду с m/z 463 [51].

Большое количество кислородосодержащих функциональных групп в макроцикле олигомицина А обуславливает его склонность к комплексообразованию. Поскольку данное свойство значительно влияет на конформацию молекулы и может оказывать существенное влияние на ее биоактивность, особый интерес представляет исследование комплексов олигомицина А с катионами металлов. Такие исследования были проведены Gierczyk В. с сотр. методами масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии и с привлечением квантово-химических расчетов, однако биологические свойства комплексов изучены не были. Данный макролид образует устойчивые комплексы как с одновалентными катионами Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , так и с ионами двухвалентных металлов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} в соотношении 1:1. Предпочтительность связывания олигомицина с одновалентными катионами уменьшается по мере увеличения атомного радиуса металла, из двухвалентных катионов связывание протекает легче всего с ионами магния и кальция, затруднительно – с барием. Комплекс олигомицина с ионами свинца не образуется. В процессе комплексообразования важную роль играют как поликетидная часть макроцикла, так и спирокетальный фрагмент. Так, ионы лития и натрия располагаются внутри макроцикла, ближе к C20-C1 части молекулы, и спирокетальная часть с боковой цепью «накрывают» ион металла сверху. Двухвалентные катионы формально находятся вне макроцикла, изгибая его так, что координационные связи создаются между гидроксильными группами в 12, 13, 33 положениях, карбоксильной группой лактона, карбонильной группой в положении 7 и атомом кислорода в C-23-C26 пиранозном цикле [52, 53].

1.2. Выделение и исследование других макролидных антибиотиков, родственных олигомицинам

Ближайшими по структуре к семейству олигомицинов являются антибиотик IB-96212, маклафунгин, антибиотик YO-001A и неомаклафунгины (рис. 1.4).

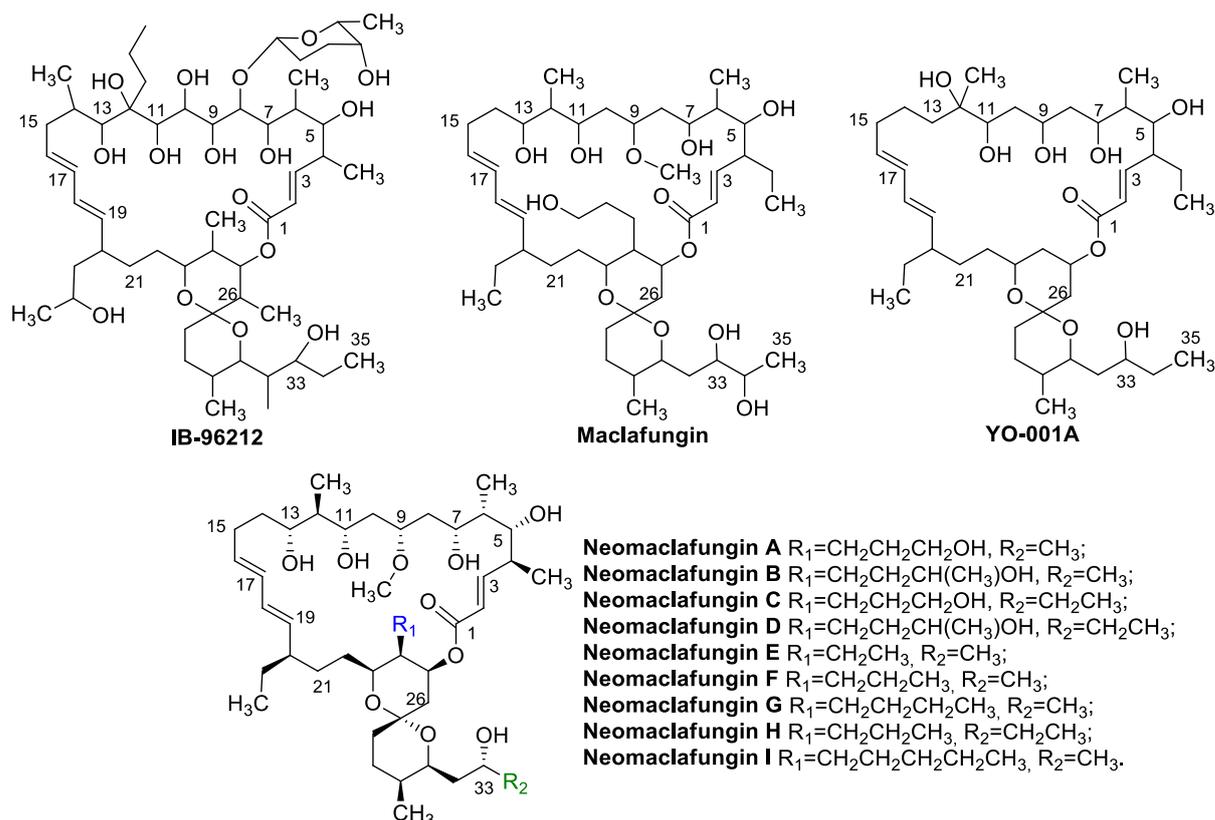


Рисунок 1.4. Структуры антибиотиков семейства олигомицинов

Антибиотик IB-96212, также как и олигомицины, является 26-членным α,β -ненасыщенным макролактоном, содержащим диеновые связи в С16-С19 положениях и сочлененным с бициклическим спирокетальным фрагментом. Значительные различия структуры данного антибиотика с олигомицинами прослеживаются в полиольном участке молекулы: так, IB-96212 вместо метильных и карбонильных групп в положениях С7, С8, С10 и С11 содержит гидроксильные группы, С8-ОН гликозилирована, а в положении С12 вместо метильного заместителя – пропильный. Боковая цепь антибиотика IB-96212, в отличие от боковой цепи олигомицина А, увеличена на один атом углерода

и замещена в С32 положении метильной группой. Кроме того, в С20 положении антибиотика вместо этильного заместителя – гидроксипропильный. Структура IB-96212 была установлена методами ЯМР-спектроскопии, конфигурация хиральных центров не была определена. Спектр биологической активности антибиотика IB-96212 – типичный для олигомицинов: отсутствие активности в отношении грам-положительных и грам-отрицательных бактерий, высокая цитотоксическая активность в отношении опухолевых линий клеток [54, 55].

Еще один 26-членный макролид - маклафунгин, родственный олигомицинам, был выделен из *Actinomycete sp.* Y-8521050. Структура антибиотика была установлена методами ЯМР спектроскопии. Его основные отличия также состоят в полиольном участке макроцикла, заместителях спирокетального фрагмента и боковой цепи. Так, положения С4 и С26 вместо метильных заместителей функционализированы этильным и гидроксипропильным заместителями, соответственно. На участке С7-С14 вместо карбонильных групп – гидроксильные, единственная метильная группа располагается в положении С12, гидроксильная группа в С12 отсутствует, а С9-ОН группа алкилирована метильным заместителем. Боковая цепь антибиотика представляет собой бутил-2,3-диол. Маклафунгин обладает высокой антифунгальной активностью, характерной для олигомицинов [56]. Позднее из культуры *Actinoalloteichus sp.* NPS702 были выделены неомаклафунгины А-I. Структура неомаклафунгинов была установлена методами масс-спектрометрии и ЯМР спектроскопии. Конфигурация хиральных центров была определена с использованием метода дальних гетероядерных спин-спиновых констант и NOESY корреляций. В отличие от маклафунгина, данные антибиотика, как и олигомицины, в С4 содержат метильную группу. Неомаклафунгины также, как и маклафунгин, содержат гидроксильные группы вместо кетонных в положениях С7 и С11, метильный эфир в положении 9 макроцикла, не имеют заместителей в положениях С8, С10 и С14, а также не содержат ОН-группу в положении

C12. Между собой неомаклафунины отличаются строением длинных алкильных/гидроксиалкильных заместителей в положении C24, а также боковой цепью (разные соединения содержат либо гидроксипентильные, либо гидроксипентильные боковые цепи). Активность неомаклафунинов была изучена только в отношении *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533). Все неомаклафунины проявили высокую активность (1-3 мкг/мл), олигомицин оказался в 3-10 раз менее активным (10 мкг/мл) [57]. Недавно был также выделен антибиотик YO-001A, основным отличием которого от маклафунинов и неомаклафунинов является незамещенное C24 положение спирокетала. Противогрибковая и цитотоксическая активность YO-001A оказалась схожей с активностью олигомицина А [58]. Стоит отметить, что механизм действия вышеперечисленных антибиотиков не исследован, но схожесть структур и биологических свойств с олигомицинами позволяет сделать предположение о том, что данная группа антибиотиков способна ингибировать работу митохондриальной АТФ-синтазы.

1.3. Выделение и исследование природных макролидных ингибиторов АТФ-синтазы.

В пионерских работах по исследованию митохондриальных токсинов [59], помимо олигомицинов были обнаружены еще три макролидных антибиотика, ингибирующих окислительное фосфорилирование – оссамицин и вентурицидины А и В. Эти антибиотики были впервые выделены в 60-х годах прошлого века из различных культур *Streptomyces* [60-62]. Строение вентурицидинов А и В было установлено спустя 10 лет после их открытия с использованием всех доступных методов установления структуры: исследованием продуктов химической деградации, использованием масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа [63]. Согласно проведенным исследованиям, вентурицидины А и В являются гликозилированными макролидами и содержат один и тот же агликон, отличаясь между собой только сахарным остатком (рис. 1.5). Агликон представляет собой 20-членный макролактон, содержащий метильные

заместители в С6, С8, С13, С16 и С18 положениях, гидроксильную группу в С3 положении, 2 ненасыщенные (С8-С9 и С14-С15) связи, а также внутримолекулярный 6-членный С5-С6-ненасыщенный С3-С7 полуацеталь. К С19 атому макроцикла присоединена С20-С27 боковая алкильная цепь, содержащая метильные заместители в С20, С22 и С24 положениях и кето-группу в положении С25. Боковая цепь также гликозилирована по С23 3-*O*-карбамоил-2-дезоксид-*D*-рамнозой в случае вентурицидина А, а в случае вентурицидина В – 2-дезоксид-*D*-рамнозой. Таким образом, структура этого антибиотика заметно отличается от строения олигомицинов меньшим размером и замещенностью макролактона, наличием сахарных остатков, отсутствием спирокетального фрагмента. К антиботикам данной группы также относятся 17-гидроксивентурицидин А, антибиотик Х-14952В, ирумамицин [64] и вентурицидин С [65] (рис. 1.5). Ирумамицин и антибиотик Х-14952В отличаются от вентурицидина А наличием гидроксильной группы в 17 положении, а также наличием эпоксидного цикла в С23-С24 положении (в структуре ирумамицина); этильным заместителем вместо метильного в С24 положении (в структуре Х-14952В). Вентурицидин С, как и вентурицидин А, не содержит ОН-группы в положении 17, но, как и антибиотик Х-14952В, замещен этильным заместителем в положении С24. Агликон вентурицидинов А и В также известен под названием вентурицидин Х [66].

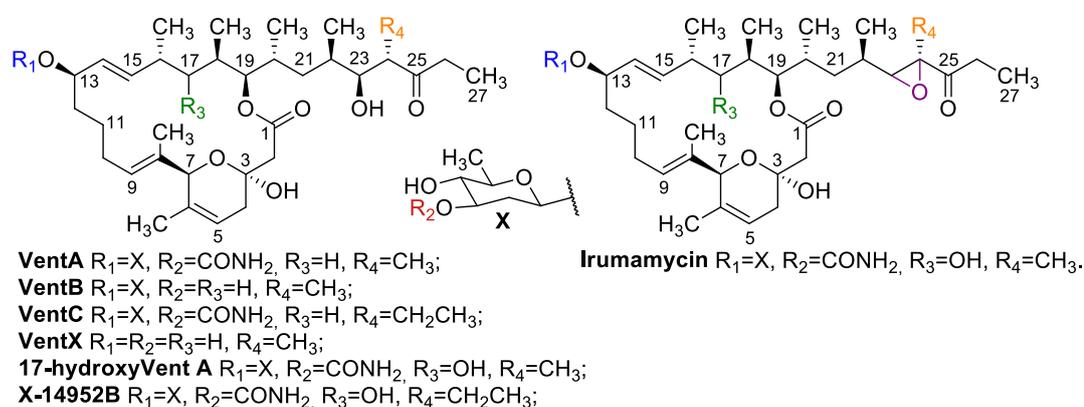


Рисунок 1.5. Строение вентурицидинов и ирумамицина.

Строение оссамицина было установлено спустя 30 лет после открытия данного антибиотика с использованием методов рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии. Он, подобно олигомицину, представляет собой 24-членный α,β -ненасыщенный макролактон, сочлененный с бициклическим спирокетальным фрагментом, замещенным гидроксibuтильной боковой цепью (рис. 1.6). Однако, структура оссамицина значительно отличается от олигомицина менее замещенным макролактоном с уникальным расположением метильных и гидроксильных заместителей, гликозилированным по положению C8 и аннелированным с 5-членным циклическим полуацеталем в положении C18-C19 [67]. Стоит отметить еще одну группу антибиотиков, близких по строению с оссамицином – дунаймицины [68], а также ушекулиды (ushikulide) А и В [69]. Не все антибиотики группы дунаймицинов содержали в своей структуре сахарный остаток и полуацетальный фрагмент, но структурное сходство между дунаймицинами и оссамицином все равно сохранялось (рис. 1.6). Ушекулиды являются практически структурными аналогами дунаймицина С1 с укороченным на два атома углерода макролактоном в области незамещенной алкильной цепочки (C11-C15). Между собой ушекулиды отличаются только расположением двойной связи: C14-C15 – в структуре компонента А и C15-C16 – в структуре компонента В. Для ушекулида А была определена конфигурация хиральных центров полным синтезом [70] (рис. 1.6).

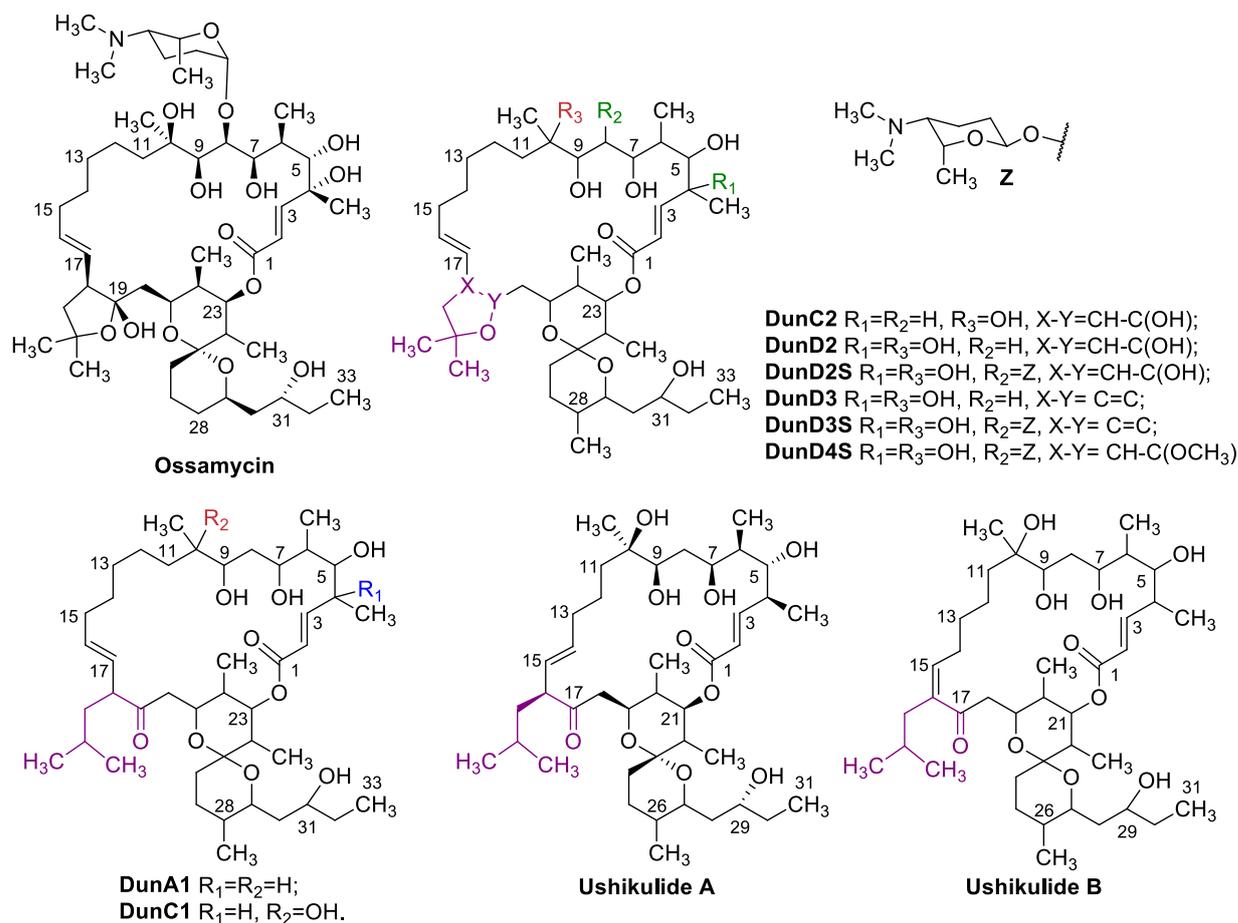


Рисунок 1.6. Структуры оссамицина, дунаймицинов и ушекулидов

К сожалению, биологическая мишень дунаймицинов и ушекулидов не исследовалась, что не позволяет однозначно причислить эти антибиотики к макролидным ингибиторам АТФ-синтаз. Дунаймицины проявили слабую противогрибковую активность, однако обладали иммуносупрессорными свойствами [71], как и ушекулиды [69]. Стоит отметить, что иммуносупрессорная активность также отмечалась для олигомицинов А, F, 44-гомоолигомицина Е и 41-дезметил-44-гомоолигомицина В [21, 38, 42], однако дальнейшая разработка антибиотиков семейства олигомицинов в качестве иммуносупрессорных агентов не была осуществлена. Позже у некоторых производных дунаймицина была отмечена инсектицидная активность [72].

Родственной оссамицину структурой обладает еще один известный ингибитор АТФ-синтазы [73] – цитоварицин. Он был выделен в 1981 году из культуры *S. diastatochromogenes* [74]. Его структура была определена

методом рентгеноструктурного анализа [75], а также было дополнительно проведено выделение сахарного остатка в результате кислотного метанолиза антибиотика и проведено изучение его строения методами ЯМР и встречным синтезом [76]. Цитоварицин является 22-членным ненасыщенным макролактоном, сочлененным со спирокетальным фрагментом, содержащим боковую гидроксibuтильную цепь (рис. 1.7). Полиольный C1-C10 участок цитоварицина идентичен C1-C10 участку оссамицина. Цитоварицин также, как и оссамицин, гликозилирован по положению C8, однако сахарные остатки антибиотиков различаются. Еще одно заметное отличие цитоварицина от оссамицина состоит в более коротком незамещенном алкильном участке макролактона, сочлененным не с 5, а с 6-членным полуацеталем. Кроме того, у цитоварицина присутствует метильный заместитель в C28 положении спирокетала. В 1997 году был выделен цитоварицин В, единственным отличием структуры которого от цитоварицина является OMe заместитель в положении C17 вместо свободной гидроксильной группы [77]. Описан также антибиотик А82548А, со структурой, близкой к структуре цитоварицина, отличаясь от него только природой сахарного остатка и отсутствием гидроксильных групп в положениях C10 и C17, метильного заместителя в положении C28 спирокетального фрагмента, а также наличием OH-группы в C34 положении полуацетала (рис. 1.7) [78].

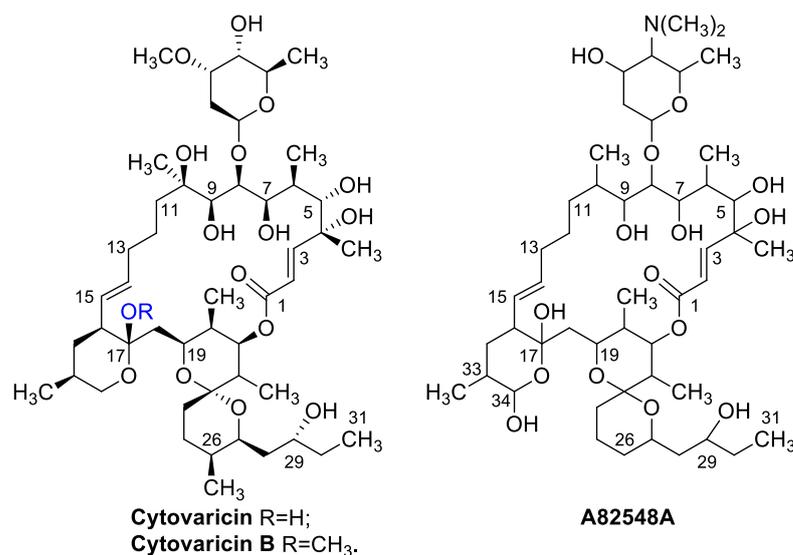


Рисунок 1.7. Структуры цитоварицинов

Наконец, еще один макролидный ингибитор митохондриальной АТФ-ситазы – апоптолидин, был выделен в 1997 году из культуры *Nocardiosis* [79] в процессе поиска соединений, вызывающих апоптоз опухолевых клеток. Структура антибиотика, включая конфигурацию хиральных центров, была установлена методами ЯМР-спектроскопии [80]. Апоптолидин представляет собой полиеновый 20-членный лактон, замещенный метильными группами в положениях С2,4,6,8,12, гидроксильной группой в положении С16 и гидроксиметильной – в положении С17 (рис. 1.8). Лактон гликозилирован 6-дезоксид-4-О-метилглюкозой по положению С9. К С19 положению макролактона присоединена С20-С28 боковая алкильная цепь, сочлененная с 6-членным полуацеталем. На данном участке молекулы присутствуют гидроксильные группы в положениях С20, 21 и 23, гидроксиметильная группа в положении С28 и метильные группы в С22 и С24 положениях. Положение С27 цепи гликозилировано двумя сахарными остатками. Таким образом, структура данного антибиотика заметно отличается от строения ранее рассмотренных ингибиторов АТФ-синтазы. Позднее были выделены и охарактеризованы апоптолидины В, С и D. Компонент В соответствует 16-дезоксид-апоптолидину А, а компонент С – 16,20-бис(дезоксид)-апоптолидину А [81]. Апоптолидин D отличается от

апоптолидина А отсутствием метильной группы в положении С6 [82] (рис. 1.8). Отсутствие гидроксильных групп в положении С16 и С20, как и отсутствие метильного заместителя в С6 не оказывали существенного влияния на антипролиферативную активность антибиотиков.

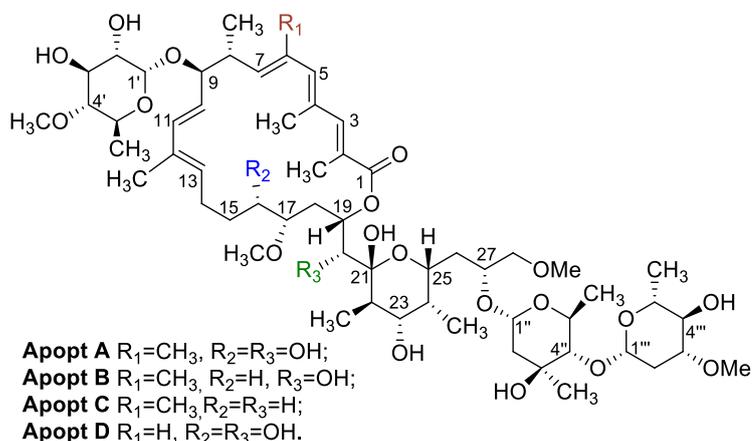


Рисунок 1.8. Структуры апоптолидинов А-D

Выделены также апоптолидины Е и F и изучены их структуры и биологическая активность (рис. 1.9) [83]. Апоптолидин Е отличается от основного представителя семейства отсутствием гидроксильных групп в С16 и С20 положениях, а также конфигурацией гидроксильной группы в С'2 положении (т.е. является С'2-эпимером апоптолидина С). Апоптолидин F отличается от апоптолидина Е отсутствием дисахаридного остатка в положении С27. Стоит отметить, что апоптолидин F является природным метаболитом, а не продуктом распада апоптолидина Е в процессе выделения и очистки. Замена 6-дезокси-4-О-метилглюкозы на 4-О-метилрамнозу в С9 положении макроцикла апоптолидина не оказала существенного влияния на биологическую активность, тогда как потеря дисахарида С27 привела к снижению цитотоксичности практически на порядок [83]. Наконец, был выделен и охарактеризован апоптолидин G (рис. 1.9) [84]. Изучение его строения методами ЯМР спектроскопии позволило определить, что данный антибиотик является геометрическим изомером апоптолидина А, отличаясь от него конфигурацией С2-С3 двойной связи (Z у апоптолидина G, E – у

апоптолидина А). Изамеризация С2-С3 двойной связи также была проведена путем УФ-обработки апоптолидина А в ацетоне и в метаноле, соотношение Z/E изомеров составило примерно 5:1. Сравнительный анализ антипролиферативной активности двух антибиотиков показал, что изменение конфигурации двойной связи не оказывает существенного влияния на цитотоксические свойства апоптолидинов [84].

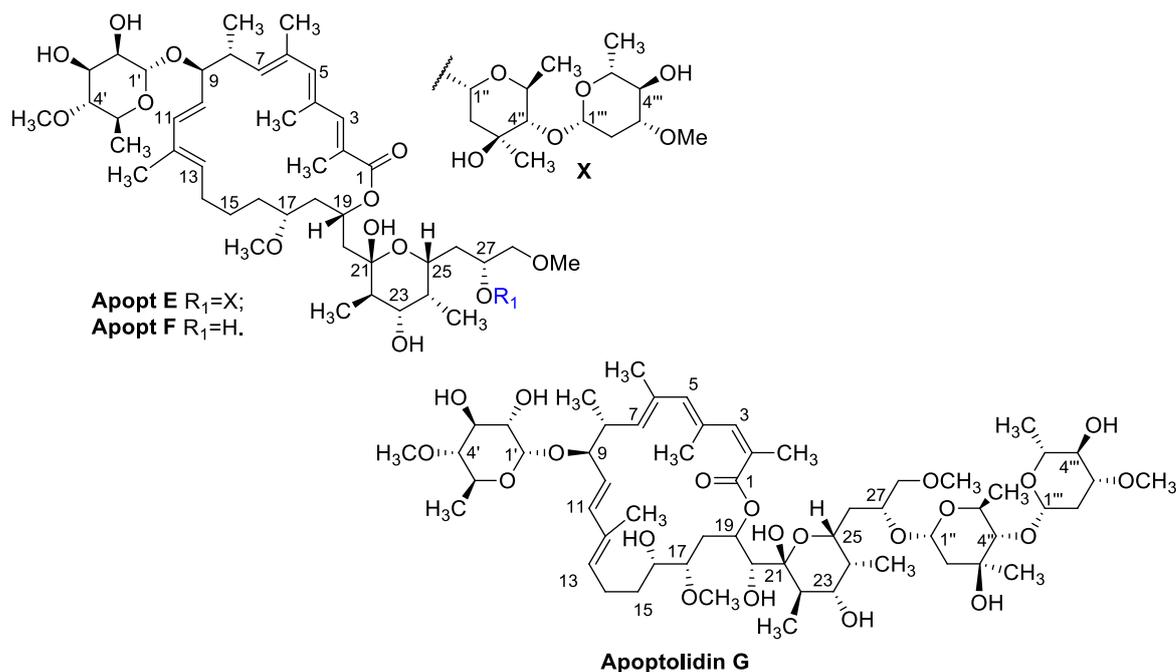


Рисунок 1.9. Структуры апоптолидинов Е-F.

Из культуры индонезийской *Amycolatopsis sp.* ICBB 8242 были выделены сукцинаты апоптолидина: 2'-О-сукцинилапоптолидин А и 3'-О-сукцинилолигомицин А, а также ациклический аналог апоптолидина А с раскрытым макролактоном (рис. 1.10) [85]. Структура новых представителей семейства апоптолидинов была доказана методами масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Установлено, что сукцинильные производные апоптолидина не способны ингибировать клеточное дыхание, однако при длительной инкубации (до 6 дней) опухолевых клеток с сукцинилапоптолидинами в наномолярной концентрации наблюдается их гибель. Авторами было показано, что, скорее всего, цитотоксическая

активность ацилированных антибиотиков проявляется по причине того, что в клетке происходит расщепление сложноэфирной связи неспецифическими эстеразами до активного апоптолидина. Таким образом, сукцинильные производные могут служить про-лекарственной формой. Ациклическое производное апоптолидина А не проявляло цитотоксической активности, что указывает на необходимость наличия замкнутого макролактона для проявления биологической активности апоптолидинов [85].

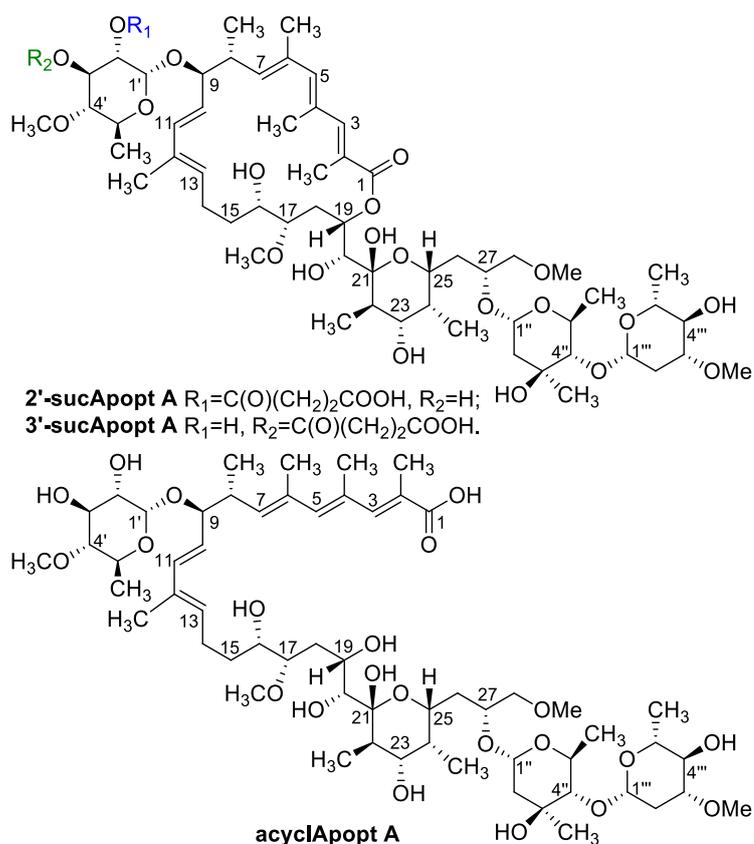
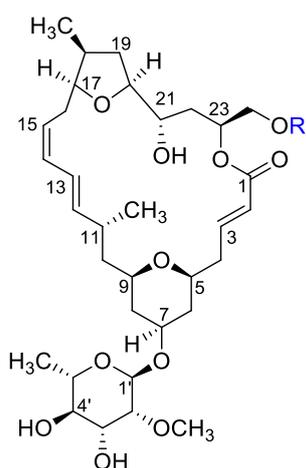


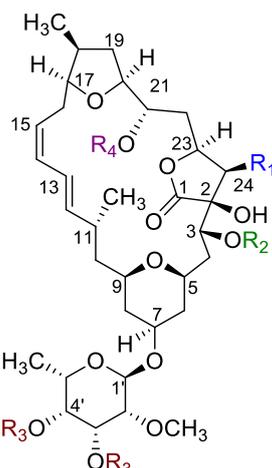
Рисунок 1.10. Структуры природных апоптолидинов

Недавно была открыта новая группа макролидных ингибиторов АТФ-синтаз, выделенных из асцидий рода *Lissoclinum* – манделаиды [86]. Всего было описано 12 соединений (манделаиды А-Л), которые были условно разделены на три типа (рис. 1.11). Тип «А» представляет собой 24-членный α,β -ненасыщенный лактон, содержащий диеновые связи в С12-С15 положениях, гидроксильную группу в С21 положении, гидроксиметильную группу в С23 положении и метильные группы в С11 и С18 положениях.

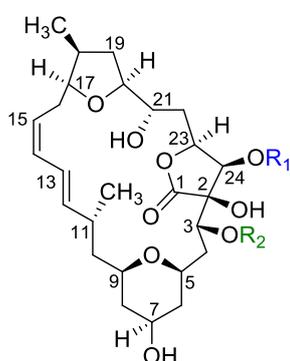
Лактон также содержит внутримолекулярный тетрагидропирановый цикл в положениях C5-C9 и тетрагидрофурановый цикл в положениях C17-C20. Антибиотик типа «А» также гликозилирован по C7 положению. Манделаиды типов «В» и «С» формально не являются макролактонами. Они представляют собой 23-членный макроцикл, содержащий диеновую систему, метильные заместители и внутримолекулярные тетрагидропирановый и тетрагидрофурановый циклы в тех же положениях, что и тип «А», а также бутиролактон в положениях C1-C2-C23-C24. Макроцикл типа «В» содержит гидроксильные группы в C2, C3 и C21 положениях, при этом C3-ОН группа ацилирована остатком карбоновой кислоты, а C7 положение содержит сахарный остаток. Макроцикл типа «С» является агликоном и содержит гидроксильные группы в C2, C3, C7, C21 и C24 положениях, C3-ОН группа также ацилирована остатком карбоновой кислоты.



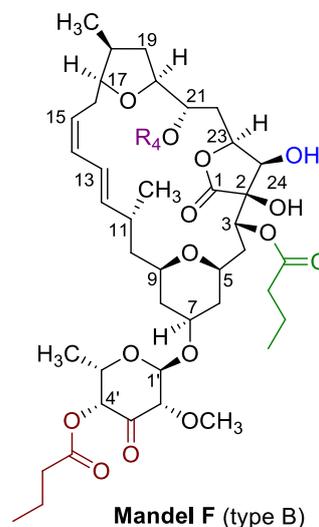
Type "A":
Mandel A R=H;
Mandel L R=C(O)n-C₇H₁₅.



Type "B":
Mandel B R₁=H, R₂=C(O)n-C₃H₇, R₃=R₄=H;
Mandel E R₁=OH, R₂=R₄=H, R₃=C(O)n-C₃H₇;
Mandel G R₁=OH, R₂=R₃=C(O)n-C₃H₇, R₄=H;
Mandel I R₁=R₄=H, R₂=R₃=C(O)n-C₃H₇;
Mandel J R₁=H, R₂=R₃=C(O)n-C₃H₇, R₄=C(O)CH₃;
Mandel K R₁=H, R₂=R₄=C(O)CH₃, R₃=C(O)n-C₃H₇.



Type "C":
Mandel C R₁=H, R₂=C(O)n-C₃H₇;
Mandel D R₁=R₂=C(O)n-C₃H₇;
Mandel H R₁=C(O)n-C₃H₇, R₂=C(O)n-C₅H₁₁.



Mandel F (type B)

Рисунок 1.11. Структура манделаидов А-Л.

Биологическое действие манделаидов схоже с действием олигомицина и апоптолидина, т.е. данные природные соединения проявляют цитотоксичность в отношении опухолевых клеток, энергетический метаболизм которых протекает по пути окислительного фосфорилирования (подробнее см. п. 2.4). Структура манделаидов была установлена методами масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Для манделаидов А и Л был выполнен полный синтез, подтверждающий структуру и конфигурацию хиральных центров. Соединения, содержащие сахарный остаток, оказались более активны, чем агликоны. Среди агликонов наибольшую активность проявляли производные, гидроксильные группы которых были ацилированы остатками бутановой и гексановой кислот. Авторы предположили, что

отсутствие сахарного остатка затрудняет проникновение манделаидов через мембрану, и ацилирование гидроксильных групп за счет повышения гидрофобности позволяет проникнуть внутрь путем пассивной диффузии. Тип строения макроцикла не играет решающей роли в биологической активности манделаидов, однако наиболее активными соединениями являются манделаиды типа «А» с классическим макролактоном. Соединения с ацилированными гидроксильными группами в сахарном остатке проявляют меньшую активность, чем незамещенные соединения, тогда как влияние ацильных групп в макроцикле выражено в меньшей степени.

1.4. Особенности механизма действия и биологической активности олигомицина А и других макролидных ингибиторов АТФ-синтазы

Первичное исследование биологической активности олигомицинов А, В и С показало, что данное семейство антибиотиков обладает противогрибковым действием, однако грам-положительные и грам-отрицательные бактерии не чувствительны к их действию (вследствие «ограниченной активности» данные антибиотики и получили название «олигомицины») [17]. Позднее смесь была разделена на индивидуальные компоненты и исследована антифунгальная активность каждого антибиотика в отношении широкой панели патогенных культур грибов: основной компонент смеси, олигомицин А, оказался немного более активным, чем олигомицины В и С, в отношении как растительных, так и животных патогенных штаммов грибов. Однако, одновременно была отмечена токсичность олигомицинов *in vivo*, что препятствовало разработке противогрибковых препаратов на их основе [27]. Причины высокой токсичности данных антибиотиков впервые были изучены группой Н.А. Lardy. Они открыли ингибирующее действие олигомицина на АТФ-синтазу митохондрий, выделенных из печени крыс, в 1958 году [87]. Позднее Е. Racker показал, что F_0 субъединица отвечает за чувствительность АТФ-синтазы к действию олигомицина [88].

Компонента F_0 человека состоит из субъединиц *c*, *a*, *b*, *d*, F_6 , *OSCP* и дополнительных субъединиц *e*, *f*, *g* and *A6L* [89]. Субъединица *c* компоненты F_0 является интегральным мембранным белком, состоящим из двух спиралей 1 и 2, которые пронизывают внутреннюю часть мембраны митохондрий. В пространстве этот белок представляет собой гомомерное кольцо, состоящее из десяти единиц в митохондриях дрожжей и из восьми единиц в митохондриях млекопитающих. Карбоксильная группа аминокислоты Glu59, располагающаяся в липидном бислое вблизи центра спирали 2, непосредственно участвует в переносе протонов из цитозоля в митохондриальный матрикс в процессе синтеза АТФ. Субъединица *a*, расположенная в непосредственной близости к субъединице *c*, образует с ней два полу-канала с водной средой, что позволяет протонам проникать к карбоксильной группе аминокислоты Glu59 в «открытой» (анионной) форме и делает возможными реакции протонирования и депротонирования [90]. В результате интенсивных биолого-генетических исследований различных олигомицин-устойчивых мутантных штаммов дрожжей R.J. Devenish и P. Nagley с сотр. установили, что сайт связывания олигомицина находится между аминокислотным остатком Gly23 спирали 1 и Glu59 спирали 2 *c*-субъединицы F_0 компоненты и в непосредственной близости к *a*-субъединице, т.е. локализуется в протонном канале [91]. Молекулярный докинг олигомицинов А, В и С с F_0 субъединицей АТФ синтазы показал высокую аффинность олигомицина к *c*-субъединице, а также позволил выделить функциональные группы, которые вносят наибольший вклад в связывание антибиотика с мишенью – это карбоксильная группа лактона, С9, С13 и С33 гидроксильные группы. Авторы исследования также учли «неопределенности» в структуре олигомицина, опубликованные в работе Palmer R.A. и дополнительно установили, что в случае присутствия С32-С33 ненасыщенной связи, енольная гидроксильная группа перестает играть роль в формировании межмолекулярных связей между антибиотиком и *c*-субъединицей [92]. Исследования кристаллических структур *c*-субъединицы

АТФ, выращенных в присутствии олигомицина, подтвердили предыдущие исследования и окончательно установили сайт связывания данного антибиотика [93]. Так, олигомицин связывается с парой аминокислотных цепочек 2 соседних *c*-субъединиц, гидрофобной частью располагаясь в поверхности *c*-кольца. Между карбоксильной группой аминокислоты Glu59 и карбоксильной группой лактона ($1C=O$) олигомицина образуются водородные связи через мостиковую молекулу воды, что фиксирует карбоксильную группу Glu59 в полу-«закрытом» состоянии, блокируя транслокацию протонов. Гидрофобная поверхность олигомицина закрывает доступ Glu59 к водной среде полуканалов. Остальные связи олигомицина с *c*-субъединицей основаны на Ван-дер-Ваальсовом взаимодействии. При связывании с мишенью наиболее заметное конформационное изменение претерпевает спирокетальный фрагмент: минимизация энергии достигается изгибом боковой гидроксипропильной цепи для проникновения в пространство между двух аминокислотных цепочек *c*-субъединицы. Небольшие изменения конформации также наблюдаются в положении C9-C13 макролактонного цикла, что в целом согласуется с проведенными ранее *in silico* исследованиями.

С момента своего открытия олигомицин активно использовался в биохимии для изучения процессов окислительного фосфорилирования и установления строения митохондриальной АТФ-синтазы, однако долгое время не рассматривался как лекарственный препарат вследствие ограниченной антимикробной активности и значительной токсичности.

Впервые цитотоксическая активность олигомицинов в отношении опухолевых клеток была отмечена К. Kobayashi и С. Nishino в 1987 году. В своей работе они описали выделение олигомицина E из культуры *Streptomyces sp.* MCI-2225 в рамках поиска соединений, активных в отношении линии клеток рака шейки матки HeLa. Авторы провели исследования антипролиферативной активности как нового антибиотика, так и ранее известных олигомицинов, согласно которым, клетки HeLa оказались

наиболее чувствительны к олигомицину А, чем к остальным представителям семейства олигомицинов (В, С и Е). Стоит также отметить, что в данном исследовании олигомицин Е практически не проявил противогрибковых свойств, однако оказался активен в отношении некоторых штаммов грамположительных бактерий [37]. Несколько лет спустя также в рамках поиска противоопухолевых соединений японскими исследователями были выделены 44-гомоолигомицины А и В и изучена их цитотоксическая активность в сравнении с олигомицинами А и В на нескольких линиях опухолевых клеток. Антибиотики в концентрации от нескольких нанограмм до нескольких микрограмм на миллилитр в опытах *in vitro* подавляли пролиферацию клеток аденокарциномы простаты, рака шейки матки, аденокарциномы кишечника, рака легких и меланомы. Острая токсичность (LD_{50}) для мышей в опытах *in vivo* для 44-гомоолигомицинов составляла около 1 мг/кг [41].

Как упоминалось ранее, в 1997 году группа Seto Н. опубликовала короткое сообщение о новом 20-членном макролидном антибиотике – апоптолидине. Свое название он получил благодаря способности индуцировать апоптоз в клетках, содержащих онкогенную антиапоптотическую E1A мутацию. Апоптолидин проявлял селективную цитотоксичность в отношении E1A-глиальных клеток мыши, тогда как нормальные глиальные клетки и клетки фибробластов с экспрессией других онкогенов оказались нечувствительны к его действию [79]. Группа С. Khosla установила, что биологической мишенью апоптолидина является F_0F_1 -АТФ синтаза. Схожесть химических структур и механизма биологического действия апоптолидина и олигомицина, цитоварицина, оссамицина, а также бафиломицина (ингибитора АТФ синтаз V-типа) и высокая избирательная антипролиферативная активность апоптолидина побудила исследовательскую группу С. Khosla провести тестирование макролидных ингибиторов АТФ-синтазы на панели опухолевых и нормальных линий клеток человека NCI-60. Бафиломицин оказался токсичен и для опухолевых, и для нормальных клеток, тогда как олигомицин, апоптолидин, цитоварицин

и оссамицин проявили селективную цитотоксичность в отношении ряда опухолевых клеток. Кроме того, сравнение полученных результатов с результатами скрининга других цитотоксичных 37 000 молекул на панели NCI-60 показало, что макролидные антибиотики-ингибиторы АТФ синтазы входят в 0.1% соединений с наиболее селективным противоопухолевым действием [6]. Одна из возможных причин селективного цитотоксического действия поликетидных антибиотиков на злокачественные клетки заключается в типе энергетического метаболизма клетки и уровня ее потребности в энергии для роста и размножения. Метаболически активные клетки (т.е. злокачественные и некоторые активно пролиферирующие нормальные клетки), чувствительны к ингибированию АТФ синтазы в том случае, когда у них отсутствует возможность переключения с окислительного фосфорилирования на гликолиз в качестве основного источника энергии, т.е. не происходит перестройка энергетического метаболизма по Варбург-типу. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что опухолевые клетки с метаболизмом по Варбург-типу устойчивы к действию апоптолидина, однако в присутствии оксамата (ингибитора лактат-дегидрогеназы) и 2-дезоксиглюкозы (ингибитора гликолиза) при действии апоптолидина происходит их гибель по пути апоптоза [94].

Проблема поиска способов селективного действия на определенный тип опухолевых клеток является одной из центральных задач по разработке противоопухолевых препаратов. Открытие селективного антипролиферативного действия макролидных антибиотиков стимулировало дальнейшее изучение механизмов противоопухолевого действия олигомицина, апоптолидина и других ингибиторов АТФ-ситаз.

Madreiter-Sokolowski С.Т. с сотр. в своем исследовании обнаружили еще одну причину избирательного действия ингибиторов АТФ-синтаз на опухолевые клетки. Так, ингибиторы как F₁ субъединицы (ресвератрол и его производное), так и F₀ субъединицы (олигомицин), запускают стрессовое

состояние, характерное для митохондрий, ассоциированных с ЭР мембраной (МММ). В таких комплексах блокирование синтеза АТФ приводит к снижению активности сарко/эндоплазматической Ca^{2+} -АТФазы (SERCA), что препятствует захвату ионов кальция в сарко/эндоплазматический ретикулум и переключению активного транспорта Ca^{2+} на перенос в матрикс митохондрий, что в свою очередь создает избыточную концентрацию ионов кальция в матриксе митохондрий и индуцирует апоптоз. Избирательность действия ингибиторов синтеза АТФ на опухолевые клетки объясняется различием в количестве митохондрий, ассоциированных с ЭР мембраной (МММ): злокачественные клетки содержат значительно большее количество митохондрий, тесно связанных с эндоплазматическим ретикулумом в сравнении с нормальными клетками [95].

Интересное наблюдение было сделано российскими исследователями о том, что олигомицин в пиколярной концентрации вызывал апоптоз в клетках лимфолейкоза Р388. Этот эффект не был связан с нарушением энергетического метаболизма (для этого требуются более высокие концентрации антибиотика), а скорее являлся следствием взаимодействия с митохондриальными порами mPTP (permeability transition pore). В нормальных клетках (тимоцитах) индукции апоптоза в аналогичных условиях не наблюдалось [96]. Способность олигомицина влиять на неспецифическое открытие mPTP была примерно в это же время отмечена и другой научной группой [97], а позднее были созданы соединения-ингибиторы открытия mPTP, структура которых «имитирует» спирокетальный фрагмент олигомицина, а сайтом их связывания является с-субъединица АТФ-синтазы. [98]. В исследованиях синергического противоопухолевого действия олигомицина с ингибиторами тирозин-киназ в терапии миелоидной лейкемии был обнаружен тот факт, что антибиотик в концентрации ниже 1 нМ (что гораздо ниже, чем необходимо для подавления клеточного дыхания) вызывает деполяризацию мембраны митохондрий, что снижает уровень синтеза АТФ вследствие изменения электрохимического

градиента, что в совокупности ведет к открытию пор mPTP. Этой же концентрации достаточно для проявления синергетического эффекта олигомицина при совместном применении ингибиторов тирозин-киназ в отношении клеток хронической миелоидной лейкемии, несущих BCR-ABL мутацию и относящихся к Варбург-типу энергетического метаболизма. Авторы исследования предположили, что ключевым моментом в противоопухолевой активности олигомицина является его воздействие на проницаемость митохондриальных пор (mPTP) через ингибирование функции F_0 компоненты в ультранизких концентрациях. В исследовании было также показано, что для выживаемости клеток хронической миелоидной лейкемии при действии иматиниба (препарата, подавляющего процесс гликолиза) энергетические потребности клетки обеспечиваются вовлечением пирувата в цикл Кребса и дальнейшим окислительным фосфорилированием, что делает их чувствительными к действию ингибиторов АТФ-синтазы. В испытаниях *in vivo* подтвердилась эффективность использования сверхмалых доз олигомицина А в качестве адьюванта к ингибиторам тирозин-киназ, и олигомицин в такой дозировке не проявил токсичности на модели мышей [99]. Схожие результаты были получены и при предобработке олигомицином клеток гранулезоклеточной опухоли яичника, энергетический метаболизм которых основан на гликолизе. Действие олигомицина позволяло усилить цитотоксический эффект цисплатина и лиганда семейства TNF, индуцирующего апоптоз TRAIL (naturally occurring cytokine, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) и без специфического подавления гликолиза. Более выраженное синергическое действие оказывал разобщитель электронной цепи FCCP, что позволяет сделать вывод о том, что деполяризация мембраны митохондрии приводит к индукции апоптоза в клетках, трудноподдающихся химиотерапии [100]. Таким образом, мембранный потенциал митохондрий играет важную роль в индукции апоптоза, причем этот эффект не зависит от типа энергетического метаболизма.

Ценные свойства олигомицина как адьюванта для увеличения эффективности противоопухолевых препаратов, по всей видимости, обусловлены его способностью опосредованно запускать каскад различных проапоптотических процессов и подавлять механизмы резистентности клеток к воздействию ксенобиотиков. Существуют данные об альтернативном механизме восстановления чувствительности опухолевых клеток к действию TRAIL при действии олигомицина. Апоптотический эффект лиганда TRAIL реализуется через связывание с рецепторами клеточной смерти DR4 и DR5. Резистентность опухолевых клеток к данному лиганду возникает в результате экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xL и Survivin, а также супрессии рецепторов клеточной смерти. Показано, что олигомицин вызывает стресс-ответ эндоплазматического ретикулума, что запускает сигнальный каскад XBP1, который в свою очередь активирует транскрипционный фактор CHOP, и последующее связывание гомологичного белка CHOP с рецептором клеточной смерти DR5 приводит к активации апоптоза. Кроме того, действие олигомицина на митохондрию подавляет экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xL и Survivin [101]. В опытах Mizumachi T. и сотр. олигомицин проявил способность сенсibilизировать клетки рака гортани к действию доцетаксела, которые ранее приобрели устойчивость к данному препарату за счет активации F_0F_1 АТФазы, приводящую к повышению уровня митохондриальных ДНК и снижению уровня АФК [102]. Более ранние исследования отмечали способность олигомицина индуцировать апоптоз в клетках гепатокарциномы и их доксорубицин-устойчивых сублиниях клеток с повышенной экспрессией Р-гликопротеина (P-gp). Совместное применение доксорубицина и олигомицина усиливало противоопухолевый эффект за счет ингибирования антибиотиком работы P-gp [7]. Недавно же было показано, что одним из механизмов устойчивости раковых клеток является повышенная экспрессия глиома-ассоциированного белка 1, (Glioma-associated protein 1 (GLI1)), отвечающего за выработку уридин 5'-дифосфат глюкозилтрансфераз 1А

(UGT1A), катализирующих процесс глюкуронирования ксенобиотиков. В конечном итоге глюкуронирование многих противоопухолевых препаратов приводит к их «обезвреживанию», т.е. к потере возможности воздействия на соответствующую биомишень в клетке. Данный механизм затрагивает различные классы противораковых препаратов и является механизмом устойчивости с широким спектром действия. Было установлено, что действие олигомицина снижает экспрессию GLI1 и UGT1A, что преодолевает устойчивость клеток и восстанавливает их чувствительность к противораковым препаратам. Однако, механизм данного явления изучен не был [103].

Ряд исследований свидетельствует о ценных противоопухолевых свойствах антибиотика не только как адьюванта в комбинированной терапии, но и как основного химиотерапевтического агента. Ингибиторы АТФ-синтазы показали высокий потенциал в качестве их применения как таргетных препаратов для химиотерапии малопротелирующихся опухолевых клеток и стволовых опухолевых клеток. Как известно, при увеличении опухоли в размерах клетки, составляющие «ядро» опухоли, получают меньше энергии и питательных веществ, чем клетки на периферии, что замедляет их пролиферативную активность и приводит к их устойчивости к действию таргетных препаратов, направленных на процесс пролиферации. В *in vitro* испытаниях на сферических, т.н. 3D моделях раковых клеток, наиболее точно имитирующих свойства реальных опухолей, была показана эффективность олигомицина А и других ингибиторов дыхательной цепи вызывать клеточную смерть медленно пролифелирующих клеток, находящихся в центре сферы. Возможно, это связано с тем, что данные клетки не могут переключиться на гликолиз ввиду дефицита глюкозы, поэтому окислительное фосфорилирование необходимо для поддержания их жизнедеятельности [104]. В настоящее время митохондрии рассматриваются как биомишени для терапии опухолей, образованных стволовыми злокачественными клетками (СЗК), т.к. они не проявляют сдвига

по Варбург-типу, и процессы метаболизма и биогенеза, происходящие в митохондриях, необходимы для выживания СЗК [105, 106]. В частности, в опытах *in vitro* олигомицин А, как и другие ингибиторы АТФ-синтазы, эффективно подавлял образование маммосфер клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 [2]. В более ранних исследованиях также была отмечена чувствительность клеток MCF-7 к олигомицину. В условиях отсутствия глюкозы или при совместном применении с 2-дезоксид-глюкозой действие антибиотика на клетки MCF-7 приводит к быстрому исчезновению рецепторов эстрогена (ER), что, вероятно связано с их цитоплазматической деградацией вследствие падения уровня АТФ. Вероятно, олигомицин может также подавлять экспрессию рецептора эстрогена, однако данное предположение не было детально изучено [107]. Олигомицин также способен снижать уровень протоонкогенного циклина D1, предположительно путем активации его протеасомальной деградации, индуцируемой фосфорилированием Thr-286 [108], а также препятствовать локализации онкогенного K-Ras белка [109]. Эффект ингибирования локализации онкогенного белка олигомицином А, по всей видимости, опосредован путем активации AMPK в ответ на энергетический стресс. Активация AMPK и эндотелиальной NO-синтазы запускает сигнальный путь, приводящий к фосфорилированию Ser181 остатка K-Ras белка циклической ГТФ-зависимой протеинкиназой 2, что и приводит к делокализации K-Ras из плазматической мембраны [110].

Отдельно проводились исследования изменений энергетического метаболизма в опухолевых клетках, происходящих под действием олигомицина А, и роли AMPK в данном процессе. Адаптация биоэнергетических процессов, индуцируемая антибиотиком, отлична по своей природе от перестройки, происходящей в условиях гипоксии. Переход на гликолиз, вызванный ингибированием АТФ-синтазы олигомицином, не сопровождается активацией гипоксия индуцируемого фактора HIF-1 α и экспрессией белков гипоксии. Таким образом, механизмы обеспечения

жизнеспособности клеток, обработанных олигомицином, отличаются от таковых в клетках в условиях HIF-гипоксии. АМРК, известный маркер энергетического стресса в клетках, проявляет ограниченную роль в олигомицин-индуцируемой метаболической перестройке клеток. Экспрессия АМРК наблюдается в первые два часа после введения антибиотика, пока происходит переключение на гликолиз и временное падение уровня АТФ. После перестройки энергетического метаболизма на гликолиз, экспрессии АМРК не наблюдается [111]. При отсутствии у клеток возможности переключения по Варбург-типу, оксидативный стресс, вызываемый олигомицином, приводит к апоптозу, при этом наблюдается не только активация АМРК, но и ингибирование работы антиапоптотической серин-треониновой протеинкиназы mTORC1, однако аналогичное исследование действия апоптолидинов А и С показало, что они опосредованно активируют АМРК, но не влияют на mTORC1 [112].

Внимания заслуживают и работы по исследованию действия олигомицина на другие биологические системы. Так, Tettamanti G. с соавт., исследуя механизм биологического действия олигомицина А на модели клеток IPLB-LdFB, выделенных из телец особей непарного шелкопряда *Lymantria dispar*, обнаружили, что стресс, вызванный действием олигомицина, менее чем для 20% популяции клеток оказался летальным. В большинстве случаев в клетках IPLB-LdFB в ответ на повреждение митохондрий активировалась реорганизация актинового цитоскелета, что приводило к запуску процесса аутофагии поврежденных митохондрий [113, 114]. Интересные результаты были получены в исследовании действия олигомицина на сперматозоиды. Инкубирование с антибиотиком практически не оказывало влияния на выживаемость и энергетический метаболизм сперматозоидов, за исключением снижения уровня потребления кислорода и выработки АТФ при всплеске энергетической активности вследствие акросомной реакции. Однако, ингибирование АТФ-синтазы

олигомицином А приводило к практически полной потере подвижности сперматозоидов и подавлению процесса капацитации [115].

Работы Vestergaard M. и соавт. показывают, что ингибирование АТФ-синтаз позволяет преодолевать устойчивость грам-положительных бактерий к действию аминогликозидных и полипептидных антибиотиков. Таким образом, несмотря на отсутствие антибактериальной активности, олигомицин может быть использован в комбинированной терапии резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*. [5, 116]. На *in vitro* моделях была показана способность олигомицина подавлять репликацию вируса Лангата в клетках эпителия почки зеленых африканских мартышек Vero и в клетках зародышей клещей-переносчиков болезни Лайма *Ixodes scapularis* ISE6 [117].

1.5. Направленная модификация природных антибиотиков – ингибиторов АТФ-синтазы

Существует три основных пути получения соединений – аналогов биологически активных природных антибиотиков: микробиологический (использование генно-инженерных штаммов-продуцентов или штаммов, способных «перерабатывать» антибиотик), полусинтетический (химическая модификация природного антибиотика) и синтетический (синтез аналога природной структуры из субстратов простого строения). Выбор способа получения производных зависит от таких факторов, как доступность подходящих штаммов-продуцентов и возможность их направленной генетической модификации, доступность и ферментативное количество природного антибиотика в культуральной жидкости продуцента, а также сложность химической структуры и доступность ее синтеза. Для направленного получения полусинтетических антибиотиков наибольшее распространение получил метод химической модификации природных метаболитов вследствие их доступности в значительных ферментативных количествах, а также довольно сложной структуры, труднодоступной полным синтезом. Микробиологический метод также является весьма эффективным способом получения новых биологически активных структур;

с развитием генетики существенно повысились возможности направленного получения желаемых модификаций микробиологическим путем [118]. Полный синтез антибиотиков играет важную роль в установлении или подтверждении их точной структуры, и также является единственным способом получения препаративных количеств соединений, труднодоступных из природных источников.

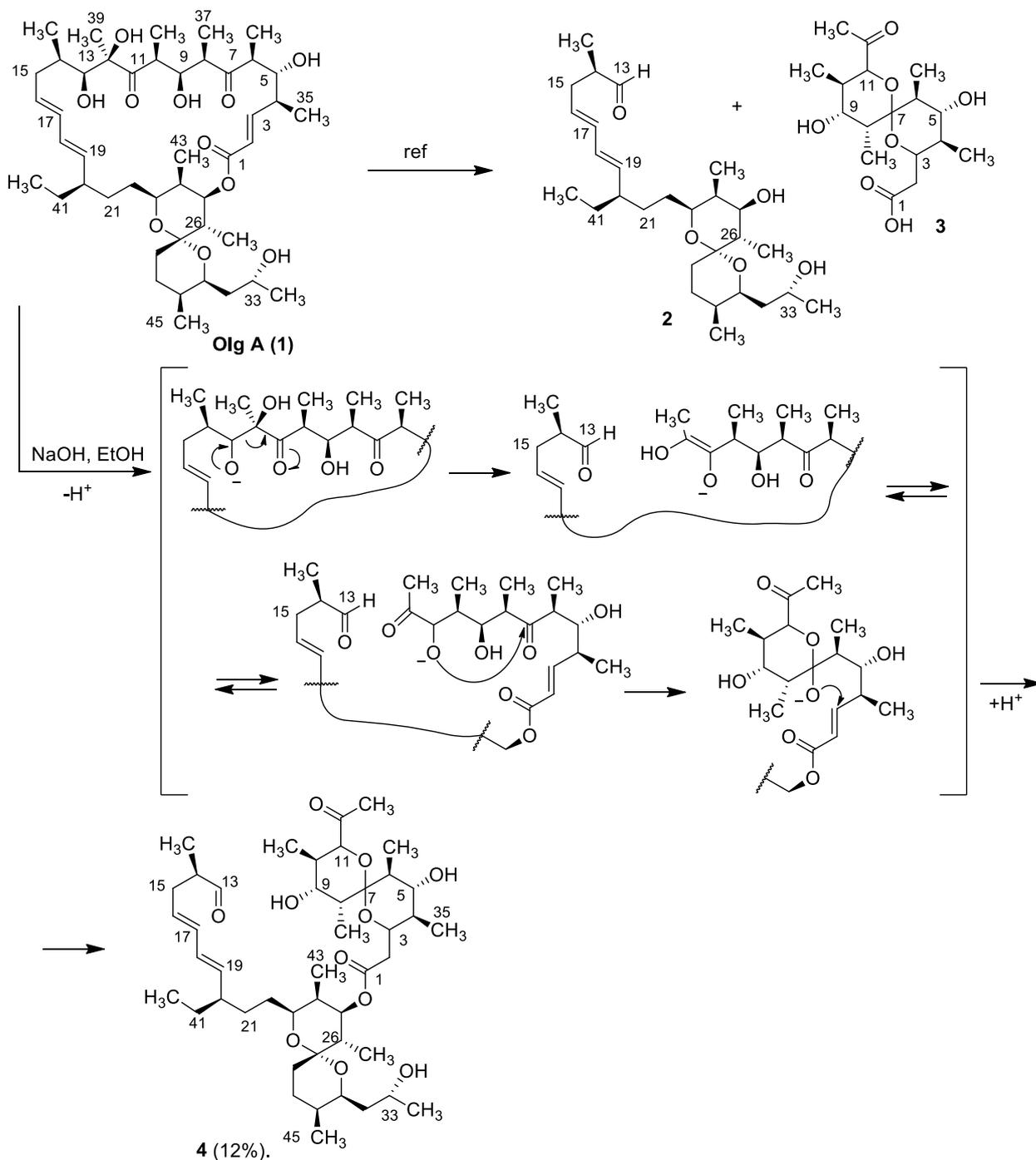
Из известных макролидных антибиотиков – ингибиторов F_0F_1 АТФ синтазы, работы по получению производных проводились в основном в отношении апоттолидина и олигомицина. При этом, несмотря на хорошую изученность штаммов-продуцентов *Streptomyces* и устройства комплекса поликетидных синтаз [119, 120], ответственных за синтез поликетидных макролидов, производных олигомицина и апоттолидина, полученных микробиологическим путем, практически не описано. В основном все производные олигомицина и апоттолидина являются полусинтетическими, т.е. полученными химической модификацией природного антибиотика. В случае апоттолидина несколько производных было получено в результате полного синтеза. Кроме того, некоторые производные манделаида были получены также с помощью полного синтеза.

1.5.1. Модификация олигомицина А

Химическая трансформация олигомицина А (1) является нетривиальной задачей вследствие наличия большого числа функциональных групп, хиральных центров и лабильности структуры антибиотика. В основных условиях макролактон олигомицина А легко подвергается деградации. Это свойство использовалось при установлении структур олигомицинов (см. главу 2.1.); тогда были выделены фрагменты С13-С33 **2** и кислота **3**, также содержащая спирокетальный фрагмент. Наиболее лабильным участком молекулы является полиольная С5-С13 цепь, а также макролактонная связь. Для олигомицина в присутствии сильных оснований даже в мягких условиях характерен ретроальдовый распад С12-С13 и С8-С9 связей, зачастую сопровождающийся дальнейшей трансформацией

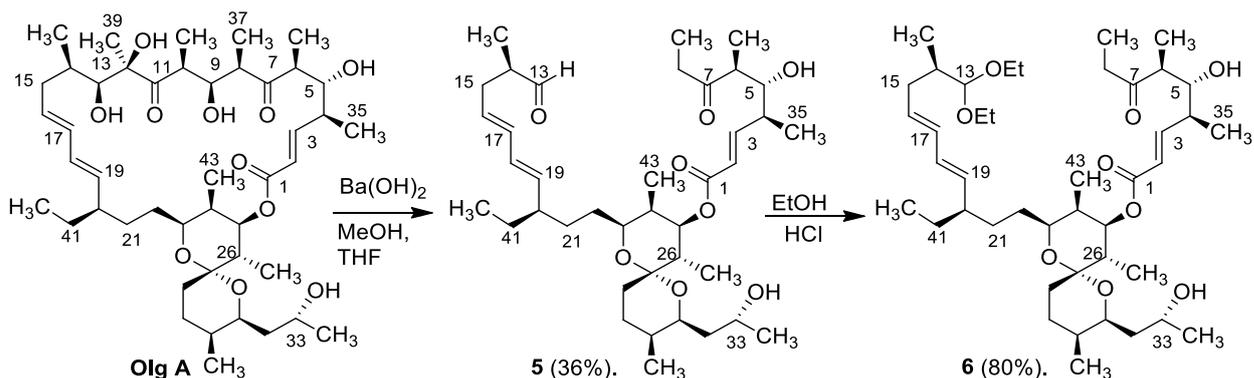
молекулы. Пути деградации данного антибиотика были исследованы группой М.Н. Преображенской. Так, удалось выделить продукт трансформации антибиотика с сохраненной лактонной связью после его кратковременной обработки NaOH в этаноле [121]. На начальном этапе деградации олигомицина происходит разрыв альдольной C12-C13 связи с образованием C13 альдегида и C12 енола, таутомеризация которого приводит к образованию кето-группы в положении C12. Затем анион C11-O присоединяется к карбонильной C7 группе, которая, в свою очередь, замыкает 6-членный C3-C7 тетрагидропирановый цикл, атакуя α,β -ненасыщенную связь лактона. В результате образуется ациклическое производное олигомицина, содержащее два спирокетальных фрагмента **4** (схема 1.1).

Схема 1.1



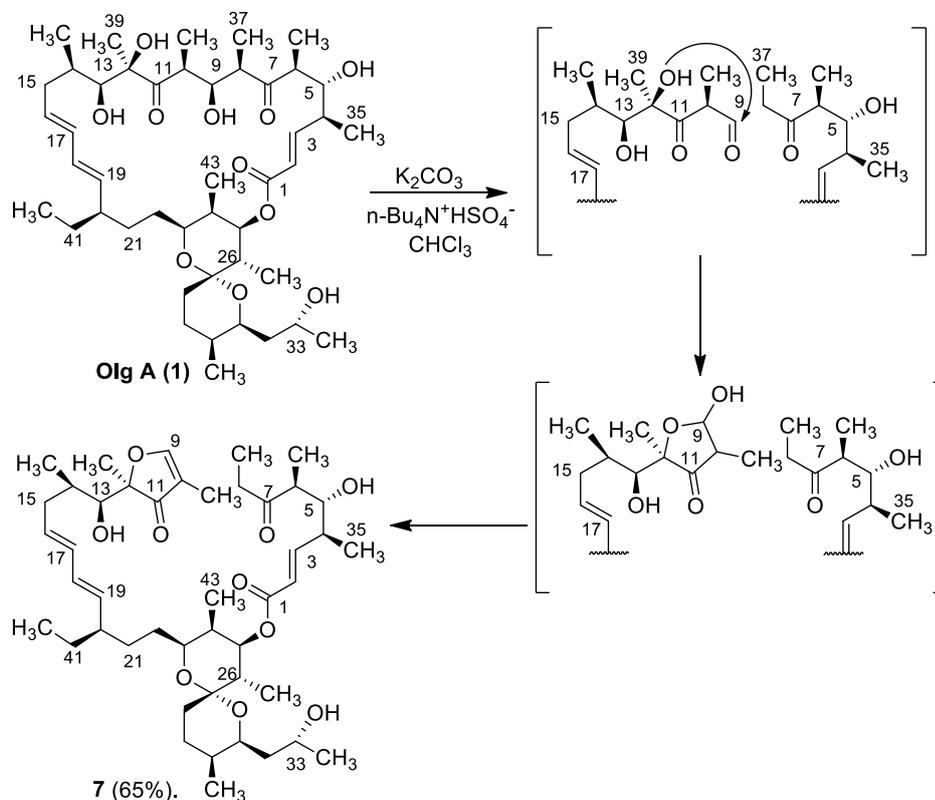
При использовании в качестве основания гидроксида бария в смеси тетрагидрофуран-метанол олигомицин подвергается двойной ретроальдовой деградации C8-C9 и C12-C13 связей с потерей соответствующего фрагмента молекулы и образованием C13 альдегида **5**. Действием этанола в присутствии HCl на производное **5** был также получен ацеталь **6** (схема 1.2) [121].

Схема 1.2



Наконец, обработка олигомицина А карбонатом калия в хлороформе в присутствии тетрабутиламмония гидросульфата приводит к разрыву C8-C9 связи с образованием C9 альдегида, который в дальнейшем подвергается внутримолекулярной атаке C12-гидроксильной группы с образованием 5-членного цикла. Дегидратация C9-C10 положений приводит к ациклическому производному олигомицина 7 (схема 1.3) [122].

Схема 1.3

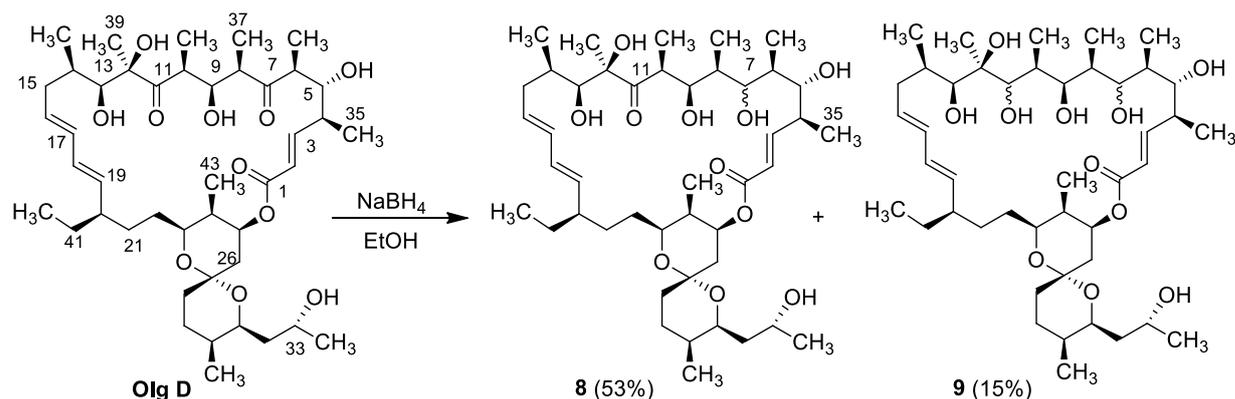


Все ациклические производные олигомицина оказались менее активными, чем исходный антибиотик. Соединение **7** с 5-членным циклом оказалось наиболее активным среди остальных производных. Важно отметить, что при сохранении высокой цитотоксической активности производного **7** (IC_{50} в отношении линии клеток миелоидной лейкемии K-562 – 0.2 μ M), он практически не ингибировал F_0F_1 АТФ-синтазу в концентрации 1 μ M, что служит еще одним подтверждением того, что подавление окислительного фосфорилирования не является единственным механизмом противоопухолевого действия олигомицинов.

Существует несколько возможных направлений химической модификации олигомицина А, которые условно можно разделить на две группы: трансформация боковой гидроксипропильной цепи и трансформация макролактона. В макроцикле антибиотика могут быть модифицированы двойные С-С связи (С16-С18 диен и С2-С3 ненасыщенная связь), кетогруппы в положениях С7 и С11 и вторичные гидроксильные группы в С5, С9 и С13 положениях. Гидроксильная группа С12 – единственная третичная ОН-группа антибиотика, вследствие низкой реакционной способности фактически не подвергалась химическим модификациям (за исключением деградации в основных условиях, см. выше).

Ранние работы по химии олигомицинов были посвящены модификации карбонильных и гидроксильных групп. Первая химическая трансформация антибиотика семейства олигомицинов затрагивала карбонильные группы лактона. В своей работе F. Ramirez с сотр. провели неселективное боргидридное восстановление олигомицинов А, В, С (в смеси) и олигомицина D [123]. Обработка олигомицина D боргидридом натрия в этаноле привела к смеси (R,S) 7-дигидроолигомицина D (**8**) и 7,11-тетрагидроолигомицинов D (**9**) в соотношении 3.5:1 (схема 1.4).

Схема 1.4

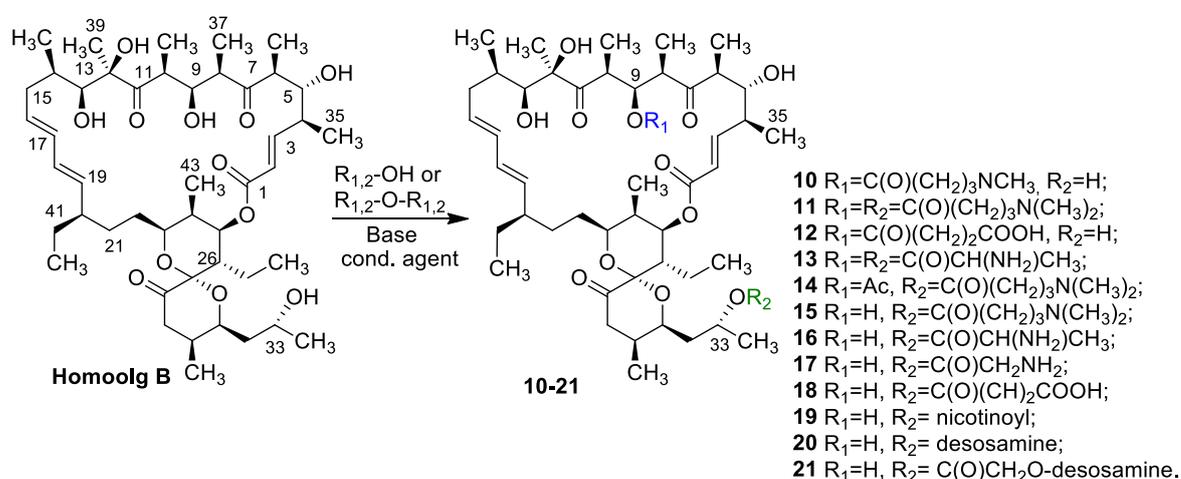


Полусинтетические производные олигомицинов А, В и С не были выделены и охарактеризованы как индивидуальные компоненты. Структура смеси диастереоизомеров 7-дигидроолигомицина D была частично подтверждена методами ЯМР-спектроскопии (только данными ¹³С спектра, без отнесения сигналов). Восстановленные антибиотики сохранили способность ингибировать АТФ синтазу, однако их активность была ниже, чем у природных антибиотиков. Таким образом, карбонильные группы в структуре олигомицинов не являются необходимыми функциональными группами для связывания олигомицина с основной биомишенью.

В качестве модификации гидроксильных групп первыми были проведены реакции ацилирования. В Японии были запатентованы производные 44-гомоолигомицина В **10-21**, ацилированные по С9 и С33 гидроксильным группам [124]. В качестве ацильных заместителей использовались аминокислоты и их производные, карбоновые кислоты и сахара. Ацилирование аминокислотами проводилось с использованием конденсирующего агента дициклогексилкарбодиимида и основания (диметиламинопиридина). Остатки карбоновых кислот и аминосахаров вводились в структуру 44-гомоолигомицина В путем ацилирования антибиотика ангидридами соответствующих кислот в присутствии оснований. Аминосахара вводились по реакции гликозилирования или ацилированием (в случае если молекула сахара содержала карбоксильную

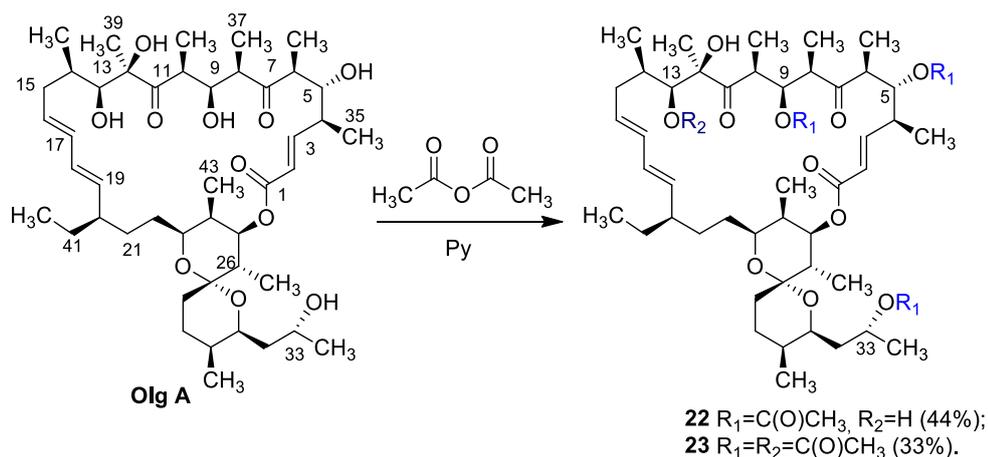
группу) (схема 1.5). Реакции протекали с низкой региоселективностью между 9 и 33 положением, при этом более реакционноспособным положением оказалась С9-ОН группа. Для получения производных, модифицированных только по 33 положению, использовалась стратегия защитных групп. Свободные гидроксильные группы антибиотика подвергались силилированию, затем селективно снималась защита с 33-ОН группы и проводилось ее ацилирование. На финальном этапе обработкой HCl в метаноле снимались все защитные группы. Ряд из полученных производных со свободными аминогруппами и карбоксильными группами представляли собой гидрохлориды, растворимые в воде. Некоторые ацилированные 44-гомоолигомицины В проявляли антипролиферативную активность, сравнимую с активностью исходного антибиотика, однако данные о их токсичности не приведены.

Схема 1.5



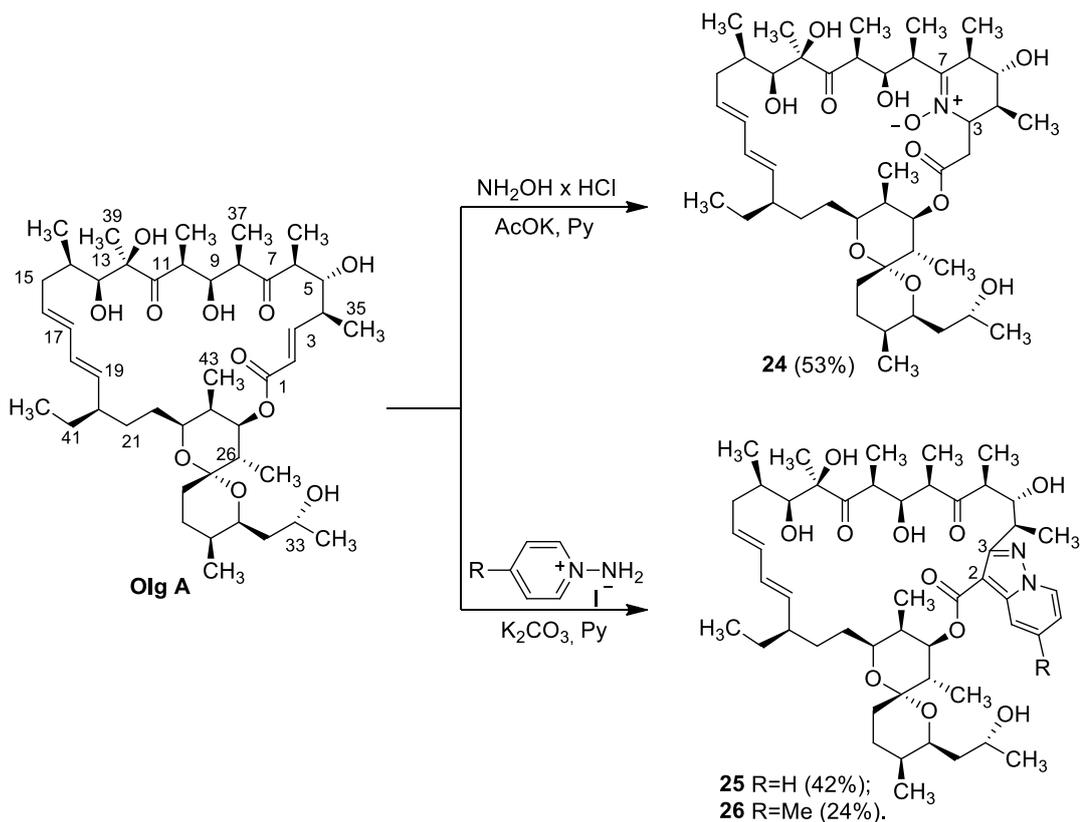
Неселективным ацетилированием олигомицина были получены 5,9,33-триацетилолигомицин А **22** и 5,9,13,33-тетраацетилолигомицин А **23** путем обработки антибиотика смесью пиридин:уксусный ангидрид (1:1) (схема 1.6) [125]. Полиацетилированные производные оказались неактивны в отношении *A. niger*.

Схема 1.6



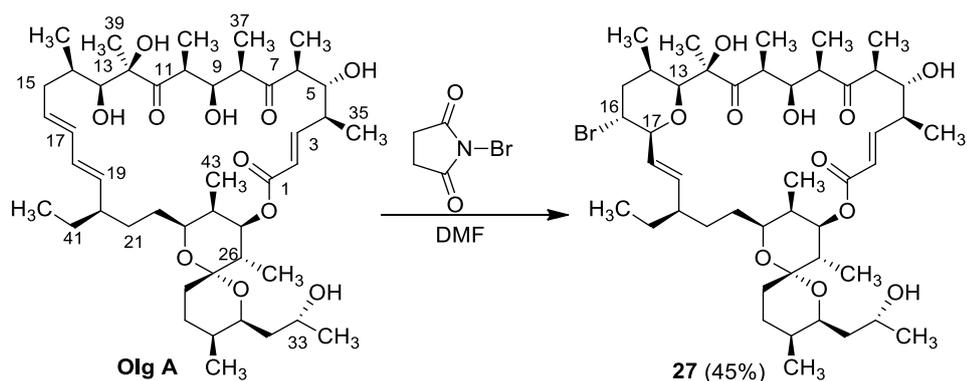
После 15-летнего перерыва дальнейшие работы по химической модификации олигомицина А были продолжены группой М.Н. Преображенской. Внимание этой группы исследователей сначала фокусировалось на трансформации кето-групп макролактона, а также двойных С-С связей. Так, была изучена реакция олигомицина А с гидросиламином и аминопиридином [126]. В первом случае оксим, образующийся в результате конденсации карбонильной С7 группы антибиотика с гидросиламином, претерпевает внутримолекулярную циклизацию в более устойчивый 6-членный С3-С7 нитрон, давая производное **24** (схема 1.7). При взаимодействии олигомицина А с аминопиридином иодидом (и его метильным аналогом) реакция протекает по неожиданному сценарию, не затрагивая карбонильную С7 группу. Вместо конденсации Шиффа происходит полярное [1+3] циклоприсоединение аминопиридина к С2-С3 связи олигомицина А, сопровождающееся дегидрированием с образованием устойчивого ароматического пирозол[1,5-а]пиридина, аннелированного с антибиотиком (производные **25**, **26**) (схема 1.7).

Схема 1.7



Еще один пример модификации двойных С-С связей с замыканием 6-членного гетероцикла был описан при бромировании олигомицина А *N*-бромсукцинимидом [127]. В этом случае электрофильное присоединение брома к С16 положению антибиотика сопровождается атакой С17 положения С13-ОН группы с замыканием тетрагидропиранозного цикла. Реакция протекает стереоселективно, давая в качестве основного изомера производное **27** (схема 1.8).

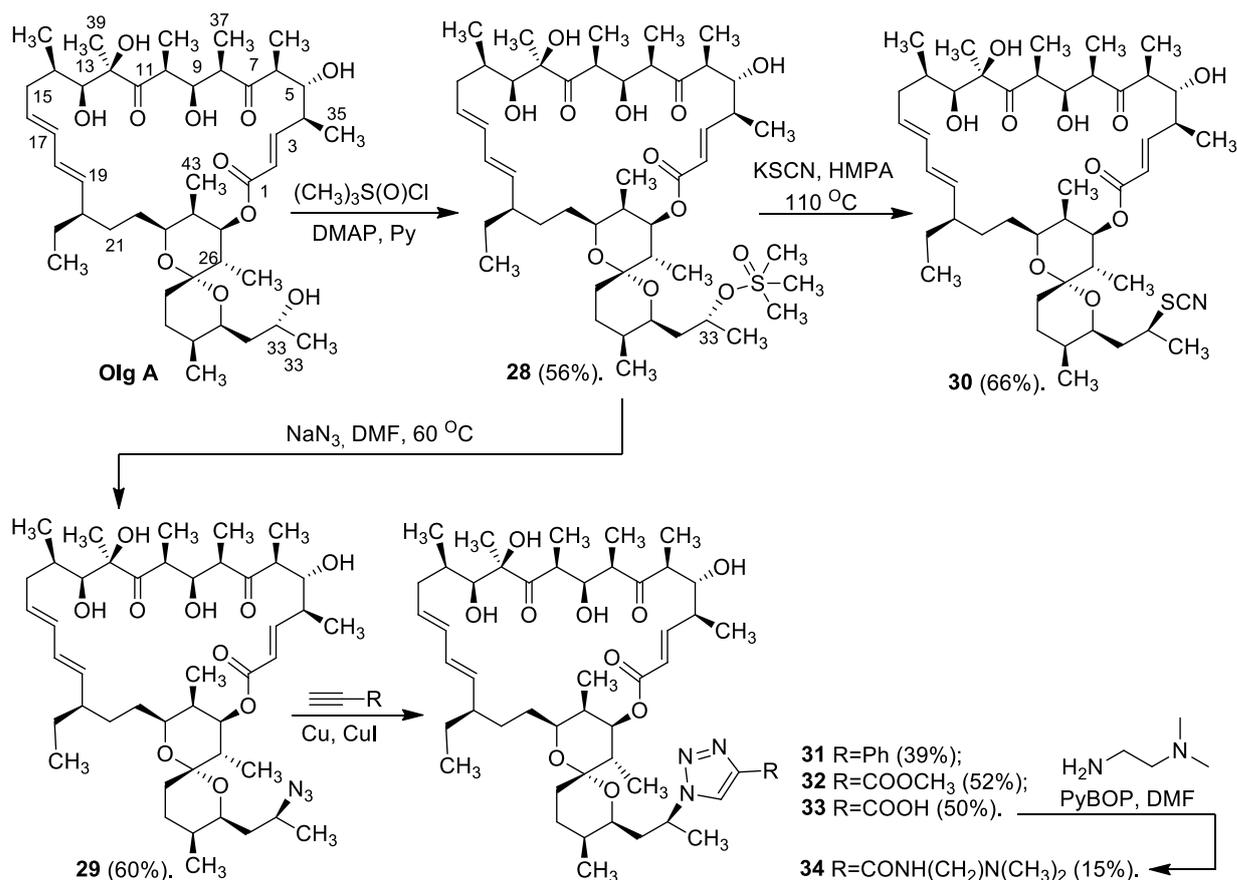
Схема 1.8



Полученные производные олигомицина А с гетероциклическими компонентами **24-27** оказались в целом менее активны, чем исходный антибиотик.

Другим перспективным направлением химии олигомицинов является модификация гидроксипропильной боковой цепи. Как было обсуждено ранее (см. главу 2.4.), этот участок молекулы непосредственно участвует в связывании олигомицина с мишенью. Для селективной трансформации гидроксильной группы в 33 положении был разработан способ ее активации через образование мезильного эфира. Соответствующее производное **28** было получено путем ацилирования олигомицина А хлорангидридом метансульфокислоты в пиридине в присутствии диметиламинопиридина (схема 1.9) [128]. 33-*O*-мезилолигомицин А был трансформирован в 33-дезоксидезокси-33-азидолигомицин **29** действием азидата натрия [128], а также в 33-дезоксидезокси-33-тиоцианатолигомицин А **30** действием тиоцианата калия (схема 1.9) [129]. Эти реакции протекают по механизму Sn_2 , что приводит к инверсии конфигурации положения 33 антибиотика. Азид олигомицина А также является удобным прекурсором для дальнейших химических превращений антибиотика. Так, по «клик»-реакции производного **29** с фенилацетиленом и метиловым эфиром пропаргиловой кислоты при катализе CuI были получены соответствующие триазольные производные олигомицина А **31** и **32** [128]. При использовании в этой реакции свободной пропаргиловой кислоты в качестве ацетиленового фрагмента, соли меди (I) приводили к образованию сложной смеси продуктов. Оказалось, что [1+3] циклоприсоединение пропаргиловой кислоты к азидолигомицину **29** протекает и в отсутствие катализатора, давая производное **33** с приемлемым выходом. Свободная карбоксильная группа производного **33** была функционализована *N,N*-диметилэтилендиамином по реакции конденсации в присутствии $PuVOP$ (соединение **34**) [128].

Схема 1.9

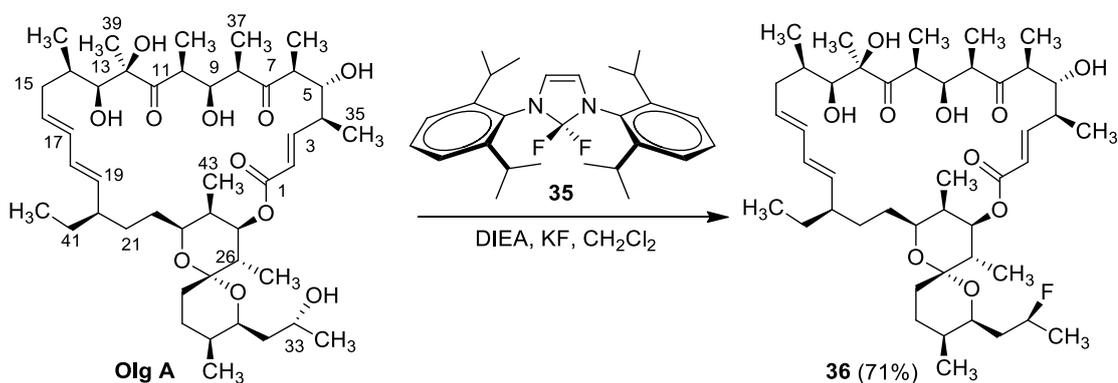


Азид олигомицина и его триазольные производные сохранили высокую цитотоксическую активность в отношении клеток миелоидной лейкемии K-562, за исключением антибиотика **33** со свободной карбоксильной группой, однако все они оказались более токсичны для неопухолевых фибробластов кожи человека hFB-hTERT6. Мезилолигомицин **А 28** проявил на порядок меньшую активность, чем олигомицины **29, 31-34**. Для тиоцианата **30** была изучена только антимикробная активность в отношении *S. fradiae* – он также оказался менее активен, чем исходный антибиотик.

Недавно был описан способ, позволяющий проводить селективное деоксифторирование спиртов сложной структуры, и его эффективность была продемонстрирована на примере олигомицина **А** [130]. Действием коммерчески доступного фенофтора **35** гидроксильная группа в **33** положении была селективно заменена на атом фтора с обращением конфигурации, давая 33-дезоксидеокси-(33S)-фторолигомицин **А (36)** (схема 1.10).

Селективность действия именно по 33-гидроксильной группе заключается в том, что остальные вторичные гидроксильные группы стерически более затруднены заместителями в β , β' положениях, а также их реакционная способность снижена наличием водородных связей с соседними карбонильными группами. Третичные спирты (за исключением аллильных) в данную реакцию не вступают.

Схема 1.10



Существенным недостатком олигомицина и его производных является низкая растворимость в воде и, соответственно, биодоступность. Одним из возможных способов повышения биодоступности данного антибиотика является создание лекарственных форм и систем доставки на его основе. К настоящему времени описан единственный пример создания лекарственной формы олигомицина. Так, Zu. с соавт. разработали методику создания наночастиц, содержащих олигомицин А, на основе хитозана, конъюгированного с фолиевой кислотой [131]. При разработке систем доставки цитотоксических соединений широко используется соль фолиевой кислоты (ФА) как лиганд ФА-рецепторов опухолевых клеток, поскольку на поверхности ряда раковых клеток, включая клетки миелоидной лейкемии и опухоли яичника, наблюдается повышенная экспрессия данных рецепторов. Избирательность такой доставки обеспечивается тем, что злокачественные клетки активно захватывают фолиевую кислоту, создавая ее дефицит в организме для нормальных клеток. Так, сначала была проведена конденсация

фолиевой кислоты с *N*-гидроксисукцинимидом в присутствии дициклогексилкарбодиимида в ДМСО. Затем проводилась конъюгация очищенного хитозана с полученным активным эфиром фолиевой кислоты. Наночастицы на основе конъюгата хитозана с молекулами фолиевой кислоты, содержащие олигомицин А, были изготовлены по методу ионного кросс-сшивания: наночастицы образовывались благодаря супрамолекулярному самоорганизующему взаимодействию отрицательно заряженного поли-трифосфата и положительно заряженного хитозана. Диаметр полученных частиц составил 182,6 нм, растворимость и доступность олигомицина в форме наночастиц оказалась значительно выше, чем просто субстанции антибиотика. Однако, биологические испытания наночастиц олигомицина проведены не были.

Микробиологическая трансформация олигомицина описана только на одном примере. Так, культивированием штамма *Streptomyces venezuelae* (продуцента специфических α,β -насыщенных макролидных антибиотиков) в присутствии олигомицина А был получен 2,3-дигидроолигомицин А **37** (рис. 1.12) [132]. Восстановленное производное оказалось более активно в отношении штамма *Saccharomyces cerevisiae*, чем исходный антибиотик.

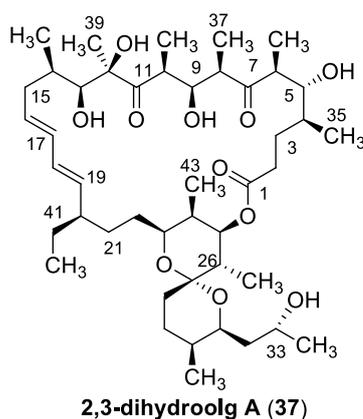
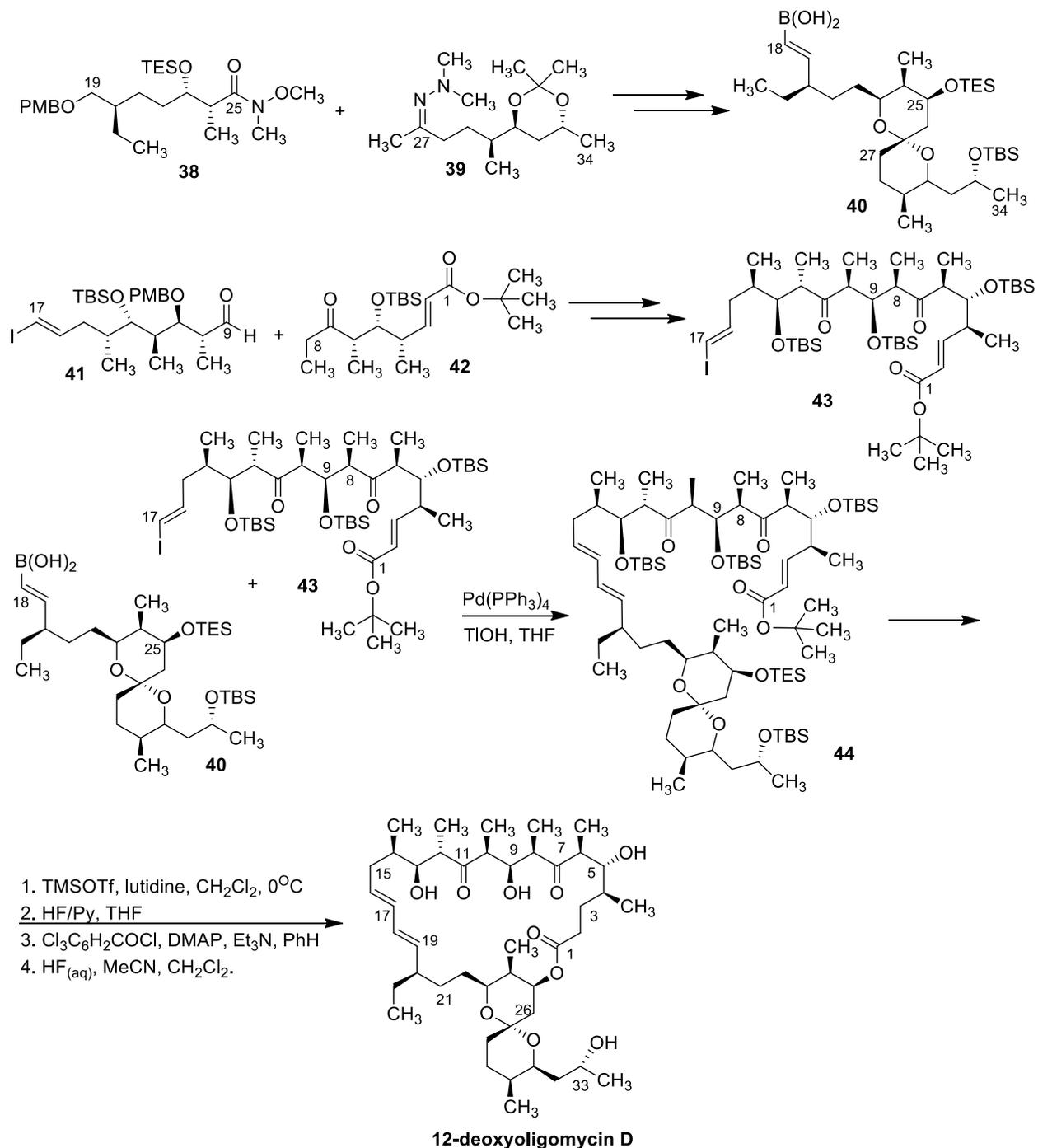


Рисунок 1.12. Структура 2,3-дигидроолигомицина А

Как было отмечено ранее, первый полный синтез олигомицинов был проведен группой D.A. Evans [46]. В качестве целевой структуры был выбран

12-дезоксиполигомицин D. Стратегия синтеза заключалась в получении полиольных звеньев C1-C8 (**42**) и C9-C17 (**41**), а также спирокетального фрагмента C18-C34 (**40**) (схема 1.11) для последующего конструирования молекулы олигомицина. Ключевым этапом синтеза спирокетального фрагмента является конденсация *N*-метокси-*N*-метиламида **38** с гидразоном **39**, активируемого литием, и последующая внутримолекулярная спирокетализация. По альдольной реакции C1-C8 кетона **42** с C9-C17 альдегидом **41** была синтезирована полиольная часть молекулы антибиотика **43**. Кросс-сочетанием по реакции Сузуки полиольной части **43** и спирокетального фрагмента **40** был получен трет-бутиловый эфир ациклической кислоты **44**. Гидролиз и макролактонизация соответствующей кислоты в присутствии диметиламинопиридина, триэтиламина и трихлорбензоилхлорида с последующим снятием защитных групп позволила получить 12-дезоксиполигомицин D (схема 1.11).

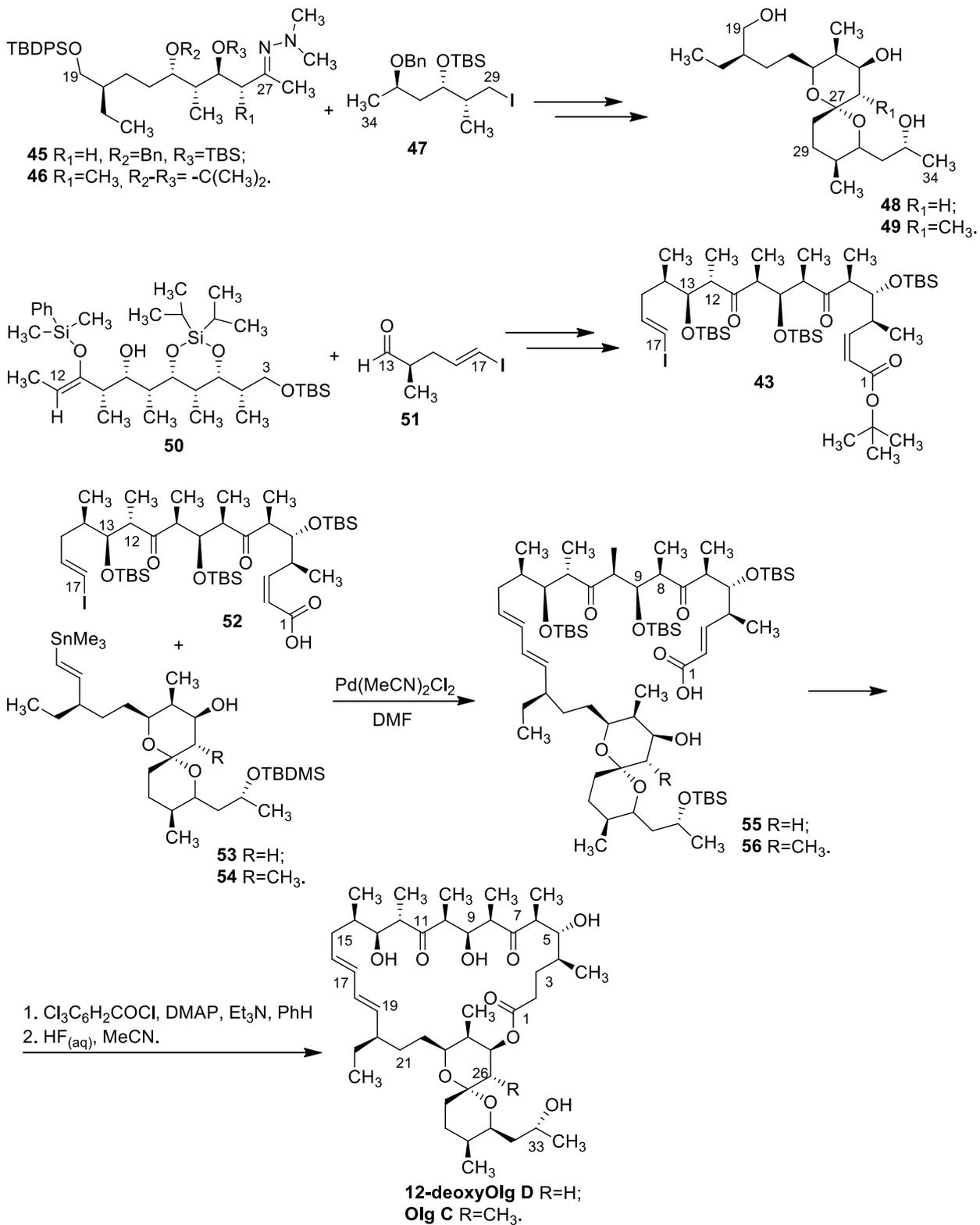
Схема 1.11



Позднее J.S. Panek и N.F. Jain осуществили полный синтез олигомицина С и 12-дезоксиолигомицина D [133]. Дизайн синтеза не отличался от предложенного ранее Эвансом – кросс-сочетание C1-C17 (**43**) и C18-C34 (**52**, **53**) фрагментов с последующей макролактонизацией (схема 1.12). Принципиальное отличие синтеза состояло в методе получения

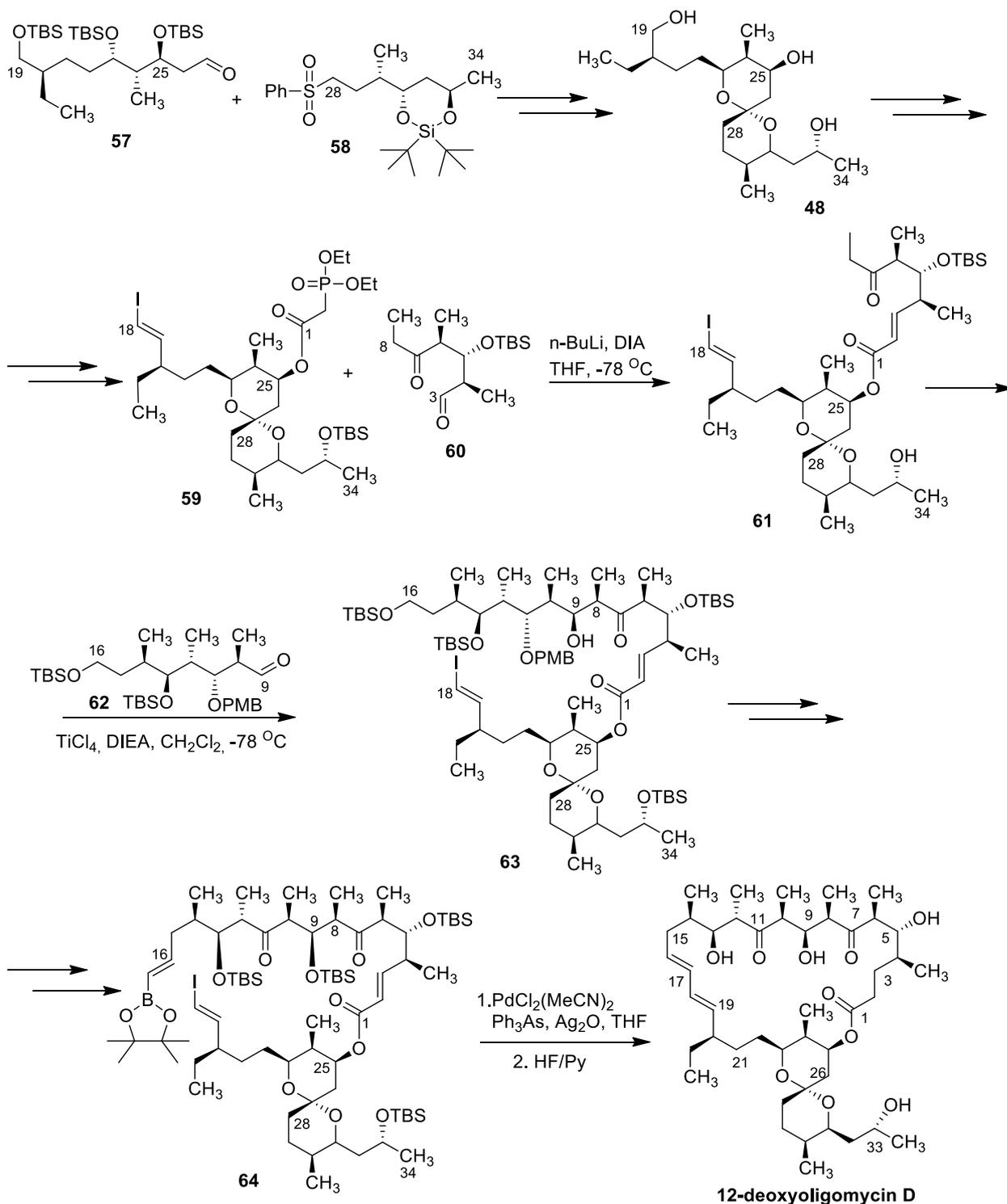
полиольной цепи: ключевым этапом сборки стала альдольная конденсация по реакции Микаяма C3-C12 (Z)-О-силлил-енольного эфира **50** и альдегида **51**.

Схема 1.12



Синтез 12-дезоксиполигомицина D также был разработан J.D. White с сотр. [134]. В отличие от предыдущих работ, подход J.D. White к конструированию структуры олигомицина состоял в разделении структуры на такие составные элементы, как фрагмент C18-C2 **59**, уже содержащий сложноэфирную связь и сочлененный со спирокеталем, и альдегиды C3-C8 **60** и C9-C16 **62** (схема 1.13). Для синтеза спирокетального фрагмента был предложен альтернативный способ (без использования гидразинов). Ключевой реакцией в этом случае является сочетание по Джулия (Julia coupling) альдегида **57** с сульфонатом **58** в присутствии эфирата трифторида бора. Дальнейшее элиминирование фенилсульфонатной группы действием иодидом самария (II) (SmI_2) и внутримолекулярная спирокетализация дает C19-C34 фрагмент **48**. Окисление по Сверну C19-ОН группы и реакция соответствующего альдегида с йодоформом (CHI_3) и хлоридом хрома (II), а также ацилирование C25-ОН группы (диэтил)фосфоноацетил хлоридом приводит к фрагменту C18-C2 **59**. Конденсация по Ведворсу-Эммонсу (Wadsworth-Emmons) C2-фосфоната **59** и альдегида C3-C8 **60** и последующая альдольная реакция полученного C7 кетона **61** с C9-C15 альдегидом **62** позволила получить ациклический продукт **63**. Функционализация положения C16 метилбороновым эфиром пинакола (соединение **64**) и дальнейшее внутримолекулярное кросс-сочетание по Сузуки с последующим снятием защитных групп дает 12-дезоксиполигомицин D.

Схема 1.13

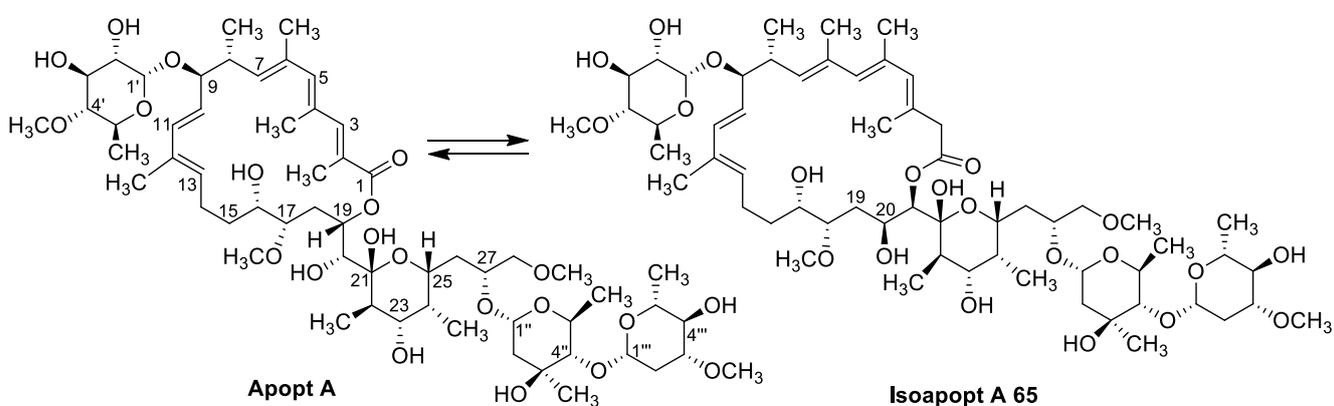


Таким образом, существует несколько вариантов полного синтеза олигомицинов, однако многостадийность (более 35 стадий) и трудоемкость процесса, а также низкий суммарный выход (менее 1%) обуславливают нецелесообразность получения аналогов олигомицина синтетическим путем.

1.5.2. Модификация апоптолидина

Химическая модификация апоптолидина также представляет собой сложную задачу вследствие наличия большого количества гидроксильных групп и ассиметрических центров, нескольких сахарных остатков, а также склонности макроцикла к изомеризации даже в слабоосновных условиях. Данный процесс был исследован двумя исследовательскими группами Р.А. Wender и G.A. Sulikowski. [135, 136]. В присутствии основания в молекуле апоптолидина происходит миграция С-20 гидроксильной группы и увеличение макроцикла на один атом углерода (схема 1.14). В метанольном растворе в присутствии следовых количеств триэтиламина соотношение изоапоптолидина **65** к апоптолидину составляет 1.4:1. Кинетика процесса изомеризации показывает, что конверсия апоптолидина в изоапоптолидин может происходить за несколько часов; константа равновесия составляет 0.6. Изомер был охарактеризован методами ЯМР, а также изучены его биологические свойства. Ингибирующая активность изоапоптолидина в отношении АТФазы оказалась на порядок ниже, чем активность апоптолидина. Следовательно, изомеризация данного антибиотика может происходить в физиологических условиях и вносить значительный негативный вклад в проявление активности апоптолидина.

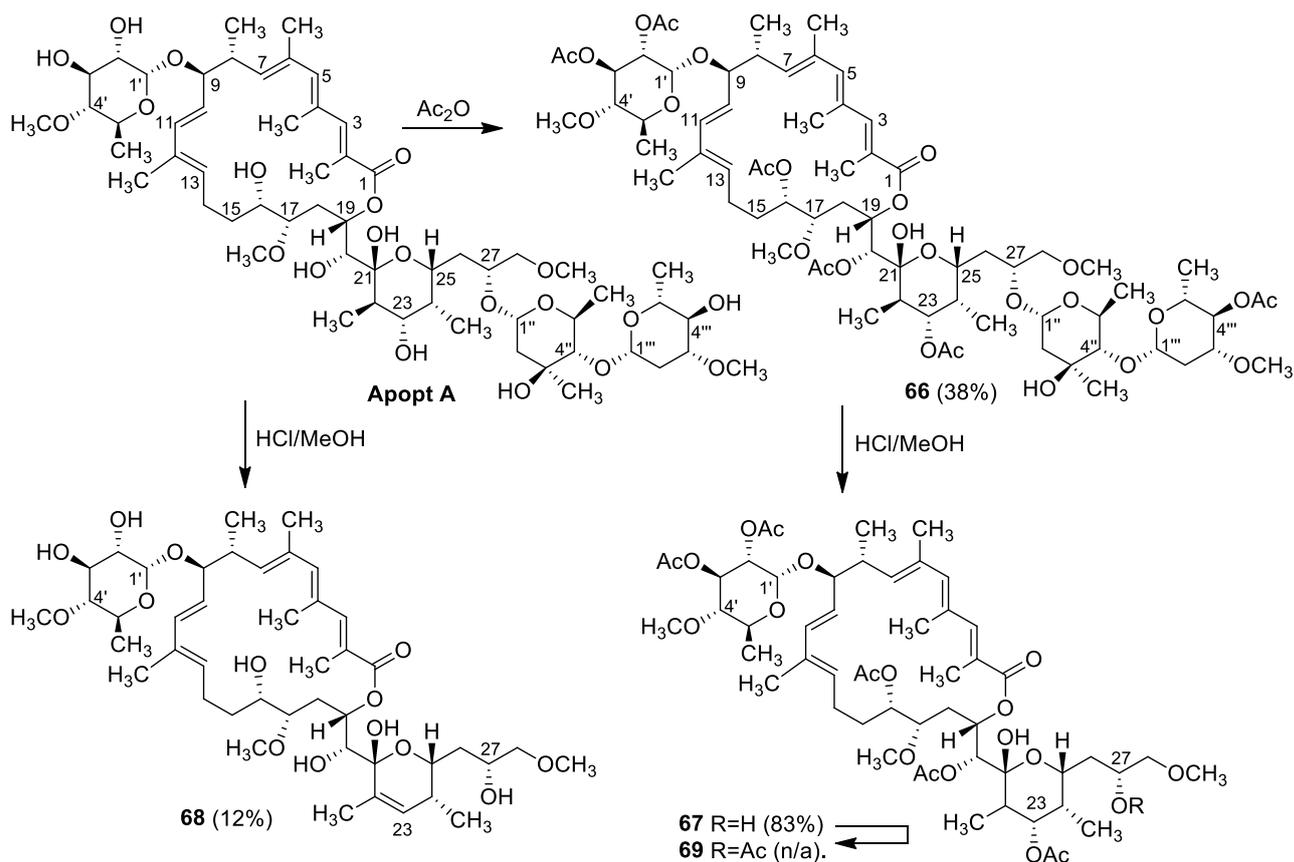
Схема 1.14



В процессе поиска более стабильного производного данного антибиотика был получен гексаацетат апоптолидина **66** и установлено, что в

процессе ацилирования не происходит C19-C20 ацильной миграции (схема 1.15) [136]. Гексаацетат оказался более устойчив к процессам изомеризации и деградации, чем исходный антибиотик. Так, обработка гексаацетата апоптолидина **66** безводной HCl в метаноле позволяет получить продукт дегликозилирования по C27 **67** с высоким выходом. В аналогичных условиях кислотный метанолиз апоптолидина сопровождается дегидратацией положений C-C, а также деградацией антибиотика, что позволяет получить производное **68** с выходом 12% (схема 1.15) [73]. Гидроксильная C27 группа тетраацетата **67** была ацелирована с образованием пентаацетата частично дегликозилированного апоптолидина **69** (схема 1.15) [136]. Биологические свойства полученных полусинтетических производных **66-69** были изучены на модели АТФазы дрожжей. Ацелированные производные **66**, **67**, **69** не проявили ингибирующей активности, тогда как частично дегликозилированное производное апоптолидина **68** сохранило способность ингибировать работу АТФаз, однако активность была снижена вдвое в сравнении с исходным антибиотиком. Последующее исследование цитотоксичности соединения **68** на линиях опухолевых клеток, чувствительных у апоптолидину, показало, что удаление фрагментов олеандорозы и оливомикозы (сахарных остатков) приводит к значительному снижению антипролиферативной активности полусинтетического производного, что может быть связано со снижением гидрофильности, и, соответственно, затрудненным проникновением в клетки.

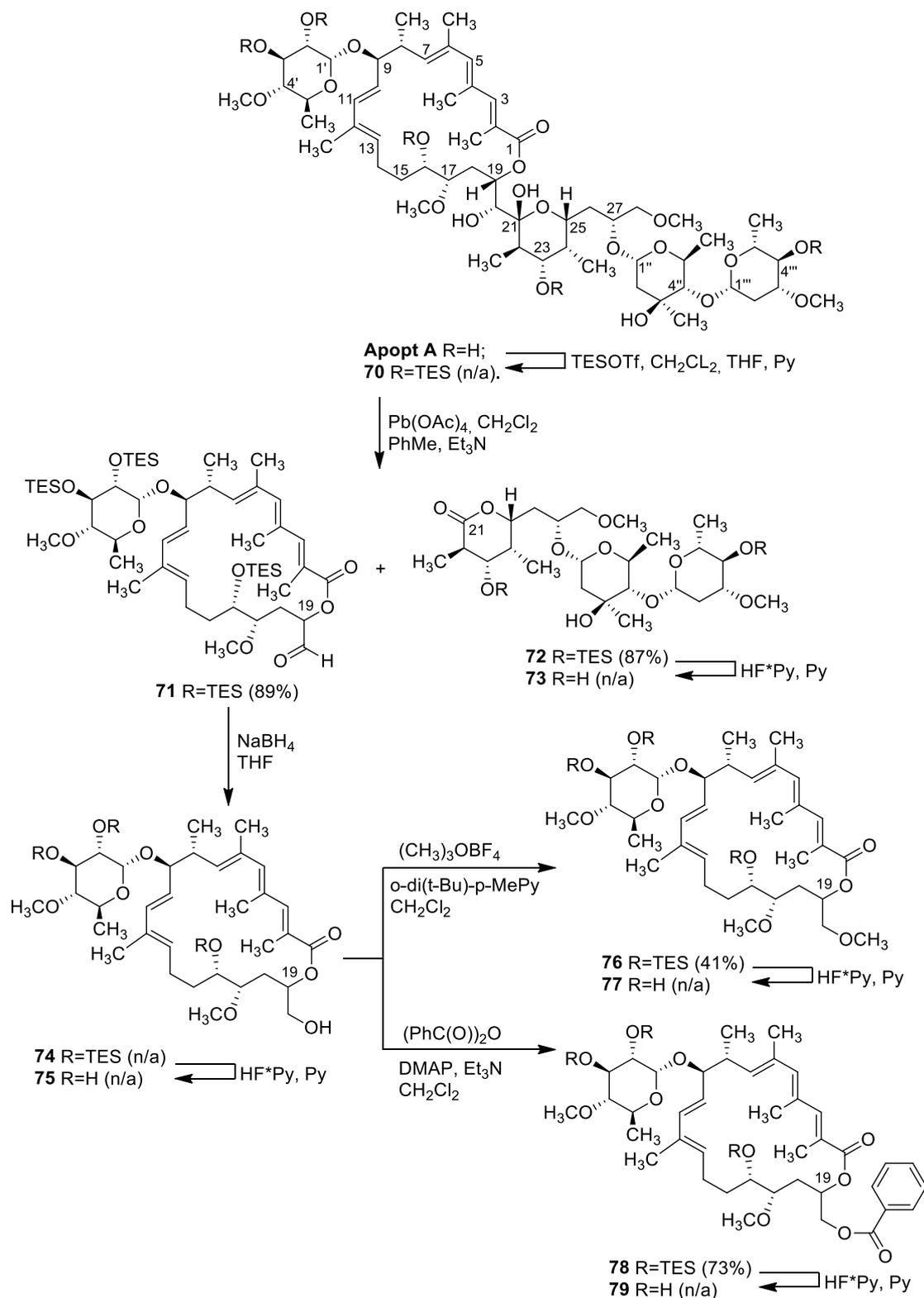
Схема 1.15



Для получения других частично гликозилированных производных апоптолидина был разработан метод окислительного расщепления C20/C21, позволяющий получить два фрагмента – C1-C19 макроцикл и C21-C27 остаток (схема 1.16) [137]. На первом этапе пять гидроксильных групп (C2', C3', C16, C23, C4''') были защищены триэтилсилильными заместителями, затем окислением тетраацетатом свинца силилированного апоптолидина **70** были получены соответствующий альдегид макроцикла **71** и β-лактон **72** с хорошим выходом. Снятие триэтилсилильных групп с фрагмента C21-C27 действием HF в пиридине, позволило получить соединение **73**. Альдегидная группа макроцикла **71** была восстановлена боргидридом натрия до гидроксильной группы (соединение **74**), и последующим снятием защитных групп был получен C9-гликозилированный макроцикл апоптолидина **75**, при этом побочной изомеризации не наблюдалось. Однако, в нейтральных и слабоосновных условиях, макроцикл **75** с незамещенной гидроксильной группой, как и исходный антибиотик, подвергался медленной изомеризации.

Одним из возможных способов предотвращения изомеризации является алкилирование или ацилирование С20-гидроксильной группы. Обработка солью Мейервейна или ангидридом бензойной кислоты макролида **74** с последующим снятием защитных групп позволяет получить, соответственно, метильный **77** и бензойный **79** эфиры. Все полученные соединения были протестированы на ингибирующую активность в отношении АТФ-синтазы. Фрагмент С21-С27 **73** не проявил активности, изоапоптолидин **65** и макролиды с С20-ОН **75** и С20-ОМе **77** заместителями оказались примерно равными по активности и на несколько порядков уступали природному антибиотику; бензойный эфир макролида **79** и изомерный 21-членный макролид проявили в 2 раза меньшую активность в сравнении с 20-членным макролидом **75** и его метильным производным **77**.

Схема 1.16



Лабильность антибиотика, затрудняющая его модификацию, а также его ценные биологические свойства стимулировали разработку синтетических путей получения апоптолидинов и их аналогов для

исследования роли сахарных остатков и строения макроцикла в активности антибиотика. Работы по полному синтезу апоптолидина рассмотрены в обзорах [138, 139], поэтому в данной главе будет упомянуты только синтетические аналоги апоптолидина, полученные с помощью методов полного синтеза без подробного рассмотрения самих схем. В 2001 году группой Nikolaou был опубликован первый полный синтез апоптолидина А, а также некоторых синтетических аналогов данного антибиотика, полученных из полупродуктов, синтезированных в процессе сборки молекулы апоптолидина [140]. Так, были получены и охарактеризованы макроциклический агликон С1-С19 **80** (недоступный ранее полусинтетическим путем) и частично гликозилированные макролиды **77** и **81** (также ранее не описанный) (рис. 1.13). Кроме того, исследованы аналоги С12-С27 части апоптолидина, отличающиеся между собой заместителем в С21 положении и наличием/отсутствием дисахаридного остатка при С27 **82-85** (рис. 1.13). Изучен также ряд соединений, представляющих собой аналоги карбогидратной части С21-С27 антибиотика, отличающиеся дисахаридной связью (С3''-С1''' у **86** вместо С4''-С1''' у **73**), а также агликон **87** (рис. 1.13). Синтетические производные апоптолидина и аналоги его структурных фрагментов были исследованы на цитотоксическую активность в отношении клеток рака яичника человека 1А9. Все фрагменты карбогидратной части олигомицина, не содержащие макроцикл, оказались гораздо менее активны, чем исходный антибиотик. Среди аналогов макроцикла активность пропорционально уменьшалась по мере упрощения структуры и удаления из структуры дисахарида при С27, циклического полуацеталя С21-С27 и наконец 6-дезоксиглюкозы в положении С9. Таким образом, было получено еще одно подтверждение того, что макролидное кольцо является необходимым структурным элементом для проявления активности, а сахарные остатки необходимы для усиления данной активности.

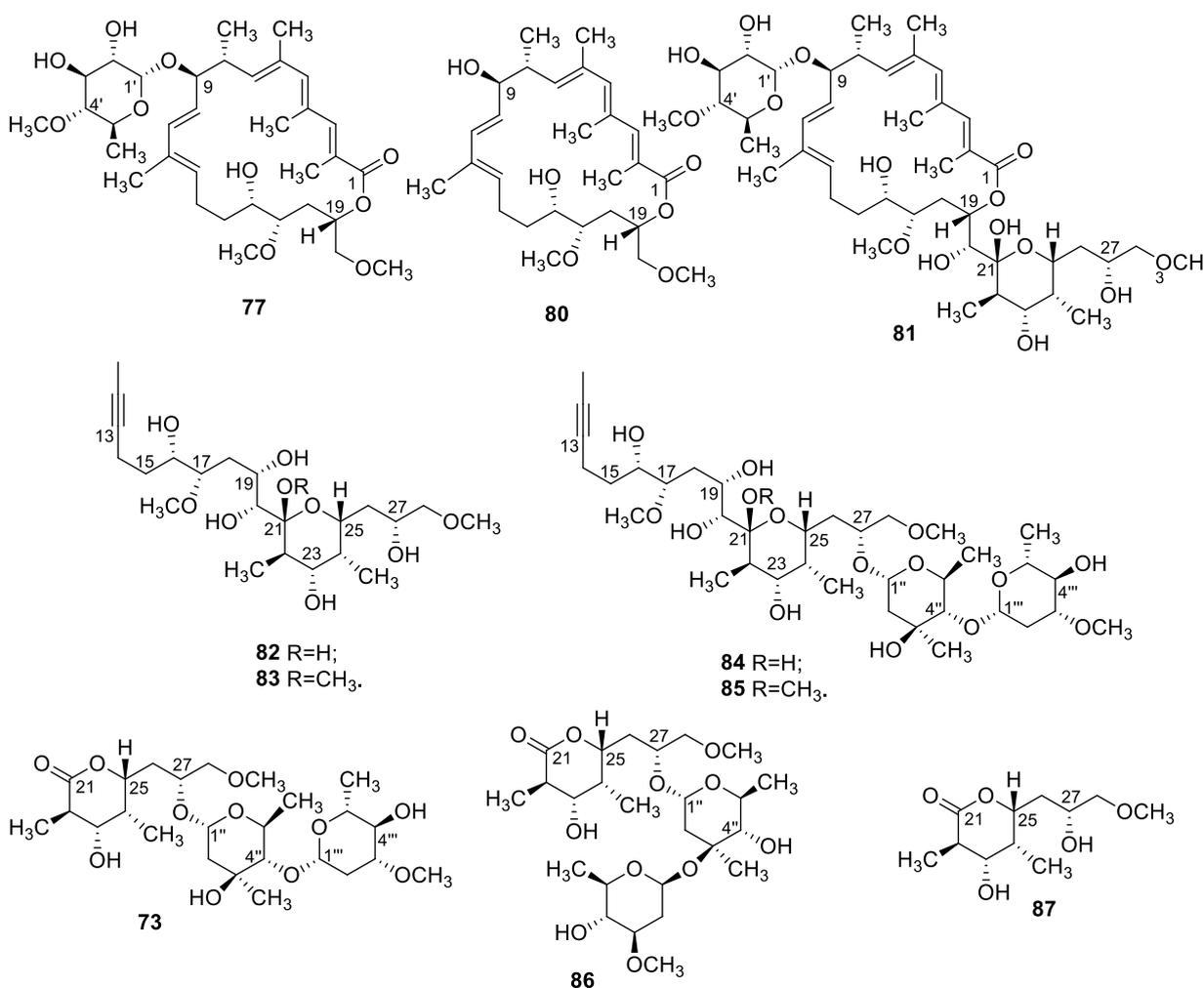
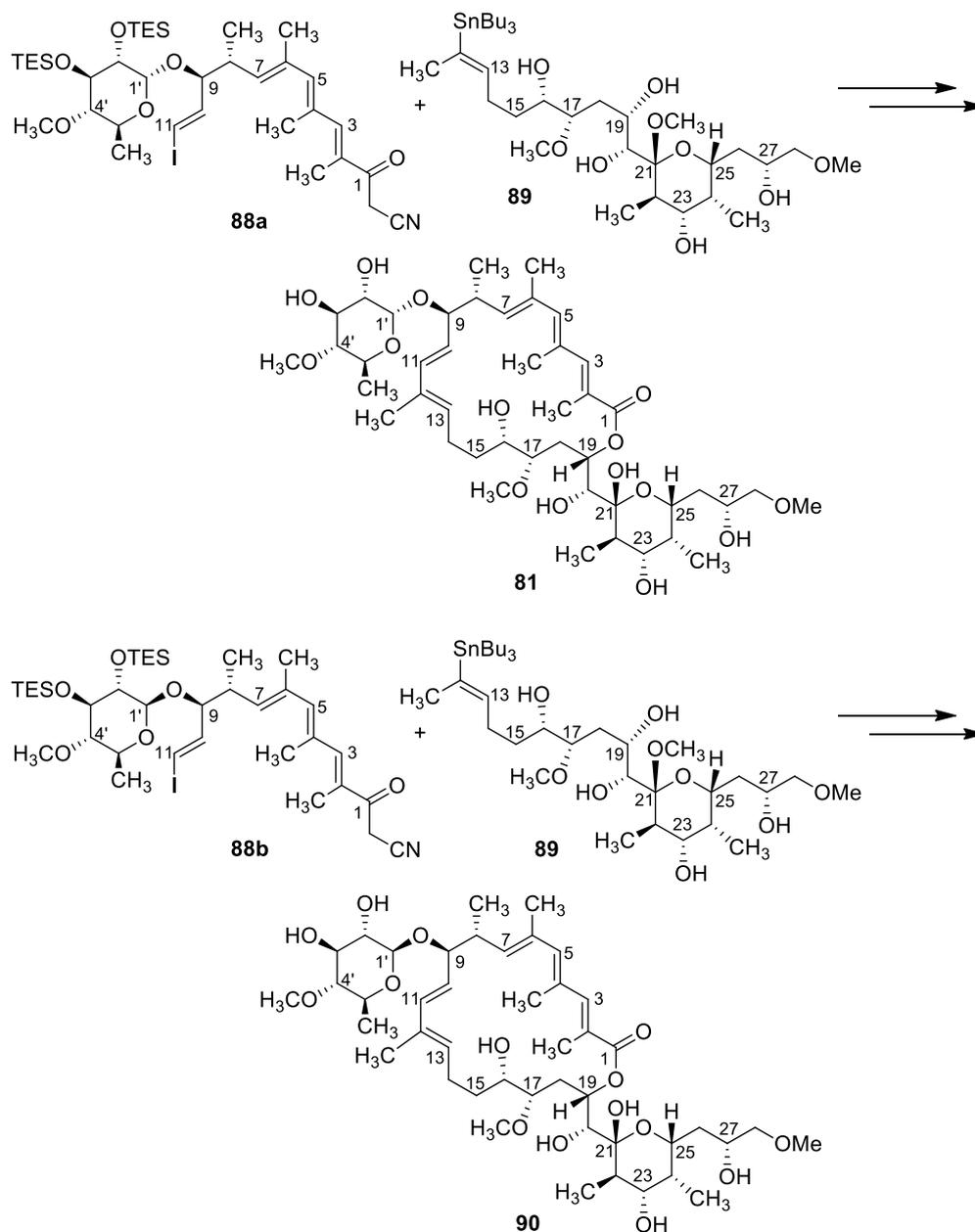


Рисунок 1.13. Структуры аналогов частей молекулы апоптолидина

Методом полного синтеза апоптолидина А, разработанного группой U. Koert [141], был также получен синтетический 27-ОН апоптолидин А **81**, а также ранее неописанный С'1-эпимер этого производного **90** (схема 1.17) [142]. Производное **90** удалось получить благодаря раннему гликозилированию фрагментов апоптолидина (С1-С11 и С12-С27), что отличает данную методику от полного синтеза Nicolau. Производные **81** и **90** были получены путем кросс-сочетания α и β -гликозилированных С1-С11 фрагментов **88a,b** с агликоном С12-С27 **89**, катализируемого тиофен-2-карбоксилатом меди (I), и последующей макролактонизации полученной кислоты по реакции Ямагучи.

Схема 1.17



C'1-эпимер **90** оказался в несколько раз менее активным, чем 27-ОН апоптолидин **А 81**. Следовательно, стереохимия присоединения остатка глюкозы играет заметную роль в биологической активности антибиотика.

Были запатентованы синтетические производные апоптолидина с увеличенным на один или два атома углерода макроциклом [143]. Новые метиленовые звенья добавлялись после C9 и C13 положений оригинального макроцикла апоптолидина **А** путем использования соответствующих интермедиатов в стратегиях разработанных ранее полных синтезов. Всего

синтезировано 3 производных **91-93**, структура которых указана на рисунке 1.14. Все производные проявили высокую активность в отношении клеток лимфомы мышей WENI-231 и клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

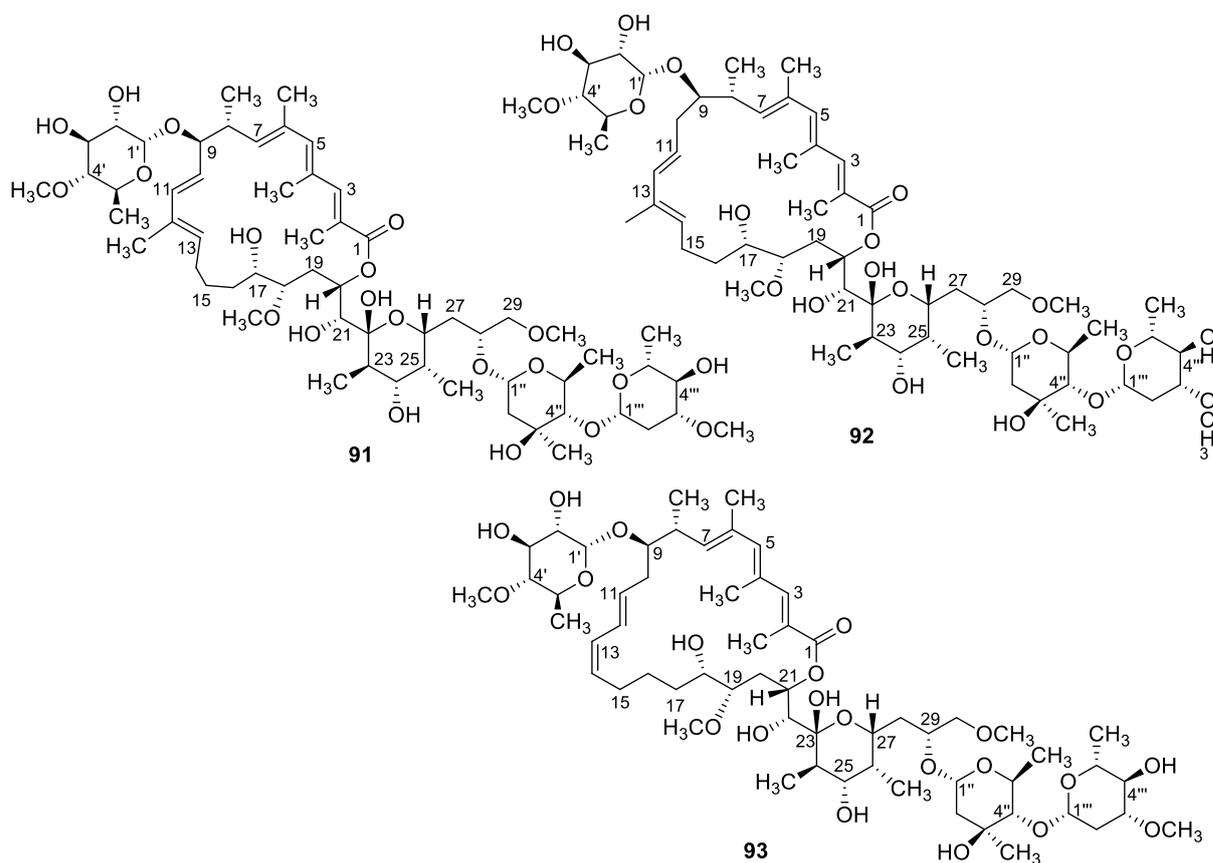
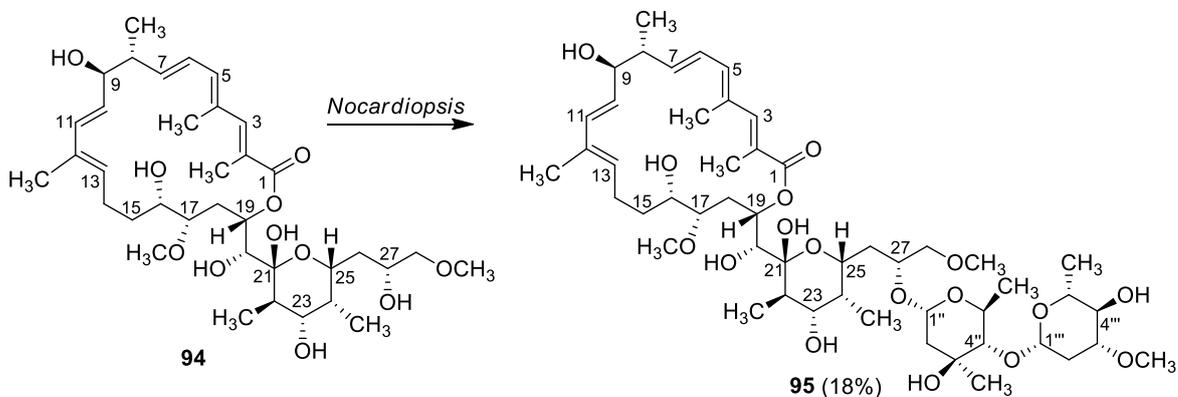


Рисунок 1.14. Структуры 21- и 22-членных апоптолидинов.

Группой Sulikowski был выполнен оригинальный синтез апоптолидинов А и D [144], которые затем были гликозилированы микробиологическим путем [145] (схема 1.18). Комбинированный химико-микробиологический подход был реализован следующим образом. Продуцент *Nocardopsis* культивировали с ингибитором поликетидных синтаз серуленином, выключая таким образом естественный биосинтез антибиотиков. При добавлении к обработанной культуре актиномицетов синтетического апоптолидинона D **94** наблюдалось его гликозилирование только по C27 положению, что позволило выделить и охарактеризовать C9-

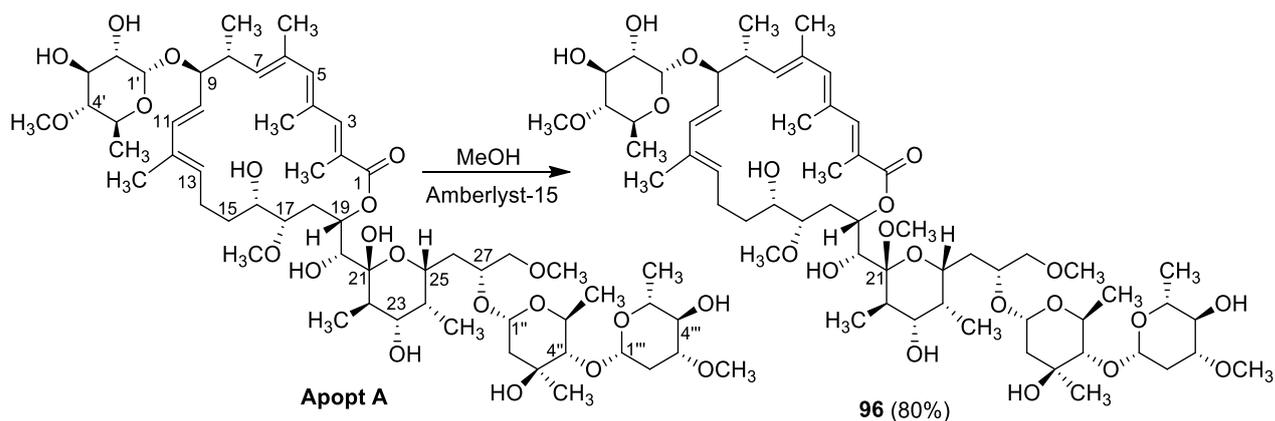
ОН апоптолидин D **95**. Стоит однако отметить низкую эффективность данного метода и проблемы при воспроизводимости (в аналогичных условиях при добавлении апоптолидинона А образования С9-ОН апоптолидина А не наблюдалось). Антипролиферативная активность производного **95** проявлялась при субмикромольных концентрациях, что еще раз свидетельствует о важной роли С27 сахарных остатков в биологическом действии апоптолидинов, более существенной, чем остатка метилглюкозы в положении С9.

Схема 1.18



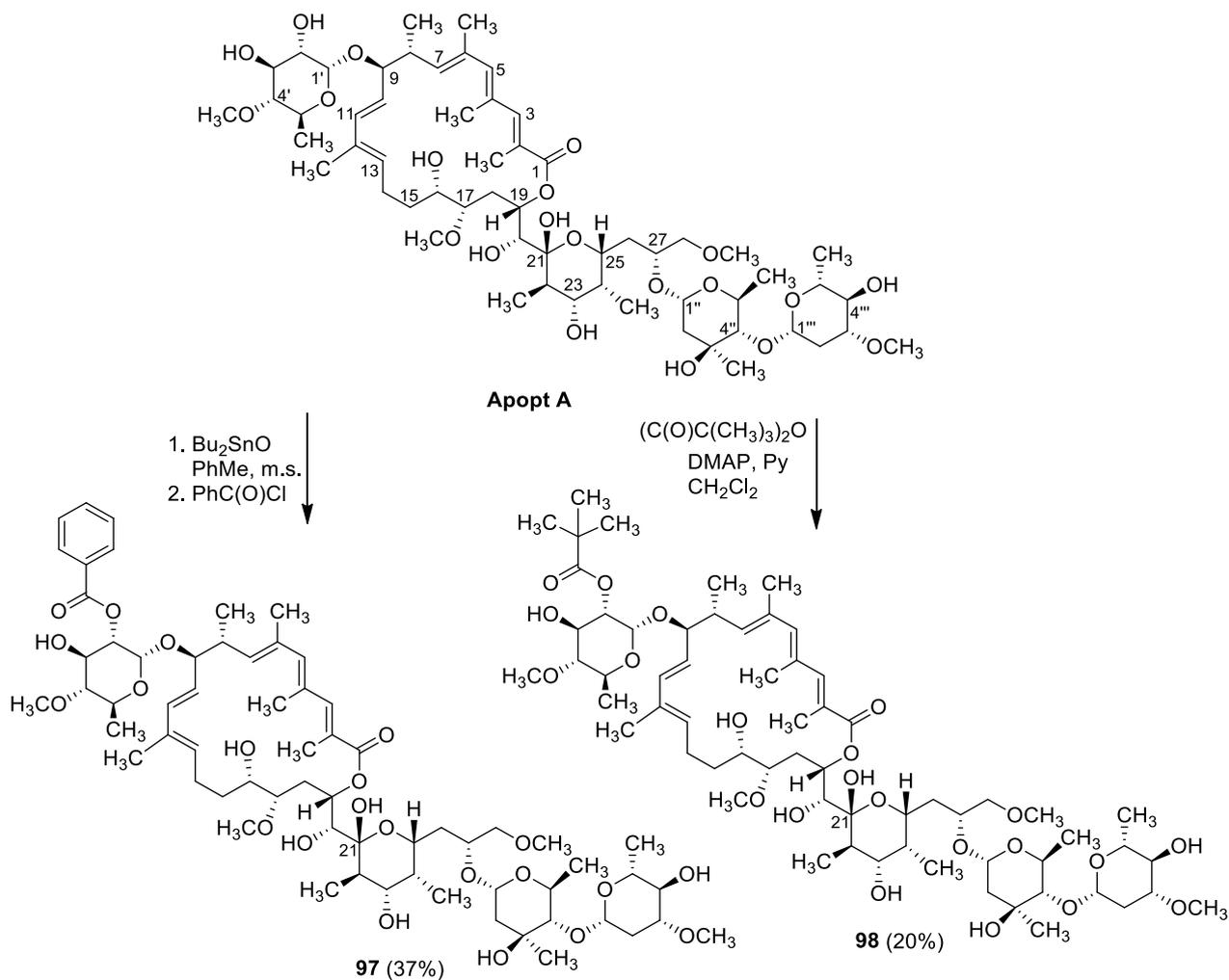
Другим направлением химической модификации апоптолидина А является функционализация гидроксильных групп и изучение их влияния на биологическую активность антибиотика. В структуре апоптолидина А присутствуют 8 гидроксильных групп: 4 в сахарных остатках (вторичные в С2', С3', и С4''' положениях и третичная в С3'' положении), 1 в макроцикле (вторичная в С16 положении) и 3 в боковой цепи (вторичные в С20 и С23 положении и третичная в С21 положении). Тем не менее, несмотря на сложность задачи, были найдены способы избирательного ацилирования и алкилирования ОН-групп [146]. Так, С21-ОН группа является частью циклического полуацетала, что определяет его уникальные химические свойства. Алкилирование антибиотика при катализе Amberlyst 15 в метаноле дает 21-О-метилапоптолидин А **96** с высоким выходом (схема 1.19).

Схема 1.19



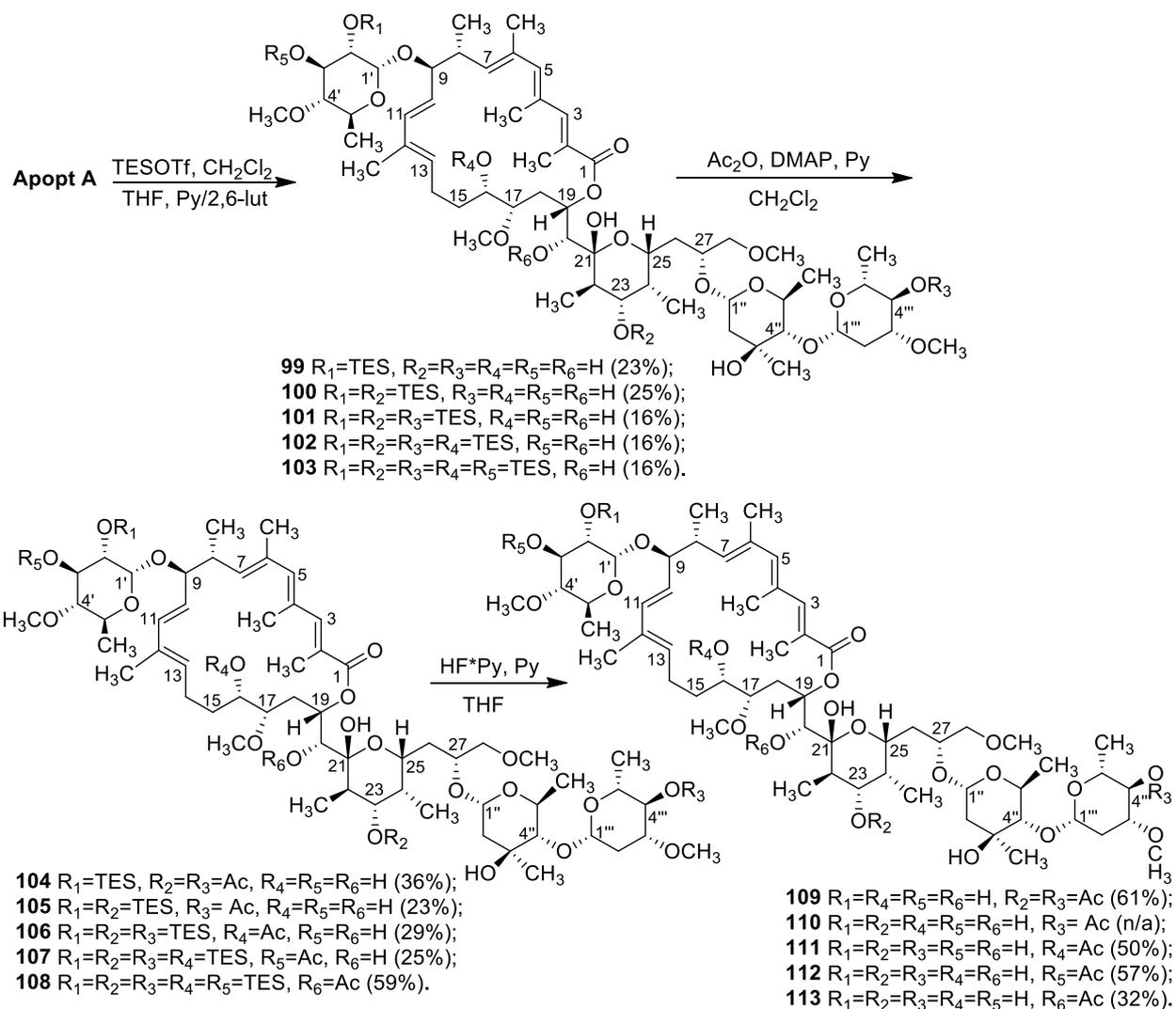
Наиболее реакционноспособной группой в реакциях ацилирования оказалась С2'-ОН группа 6-дезокси-4-*O*-метилглюкозы. Активация С2'-С3' диола апоптолидина дибутилиноксидом олова (IV) и последующая обработка бензоилхлоридом дает в качестве основного продукта С2'-бензоилапоптолидин **97**. Обработка антибиотика пивалоиловым ангидридом в присутствии диметиламинопиридина также приводит к С2'-ацилированному производному **98** (схема 1.20) [146].

Схема 1.20



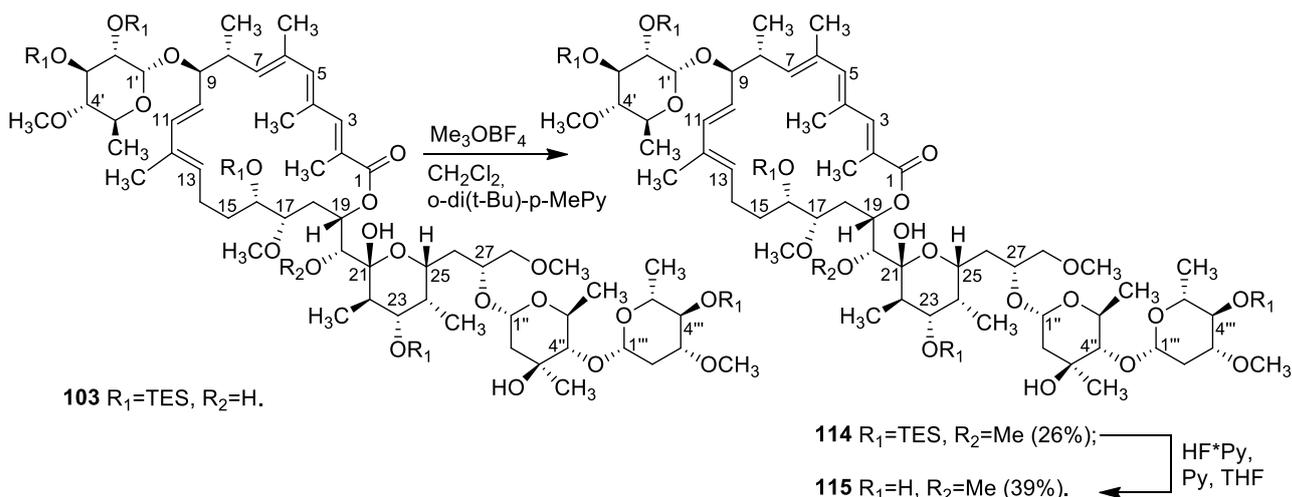
Селективное ацетилирование остальных гидроксильных групп (за исключением C3'' и C21) было реализовано по стратегии поэтапного силилирования, ацетилирования наиболее реакционноспособной OH-группы (или групп) из оставшихся и снятия защитных групп (производные **109-113**) (схема 1.21) [146].

Схема 1.21



Поскольку модификация C20-ОН группы должна приводить к повышению стабильности антибиотика за счет предотвращения изомеризации в менее активную форму, было осуществлено ее селективное алкилирование. Так, реакция пента-триэтилсилил производного апоптолидина **103** с солью Меервейна в присутствии 2,6-дитретбутил-4-метилпиридина и последующее снятие защитных групп позволяет получить 20-*O*-метилапоптолидин **115** (схема 1.22) [146].

Схема 1.22

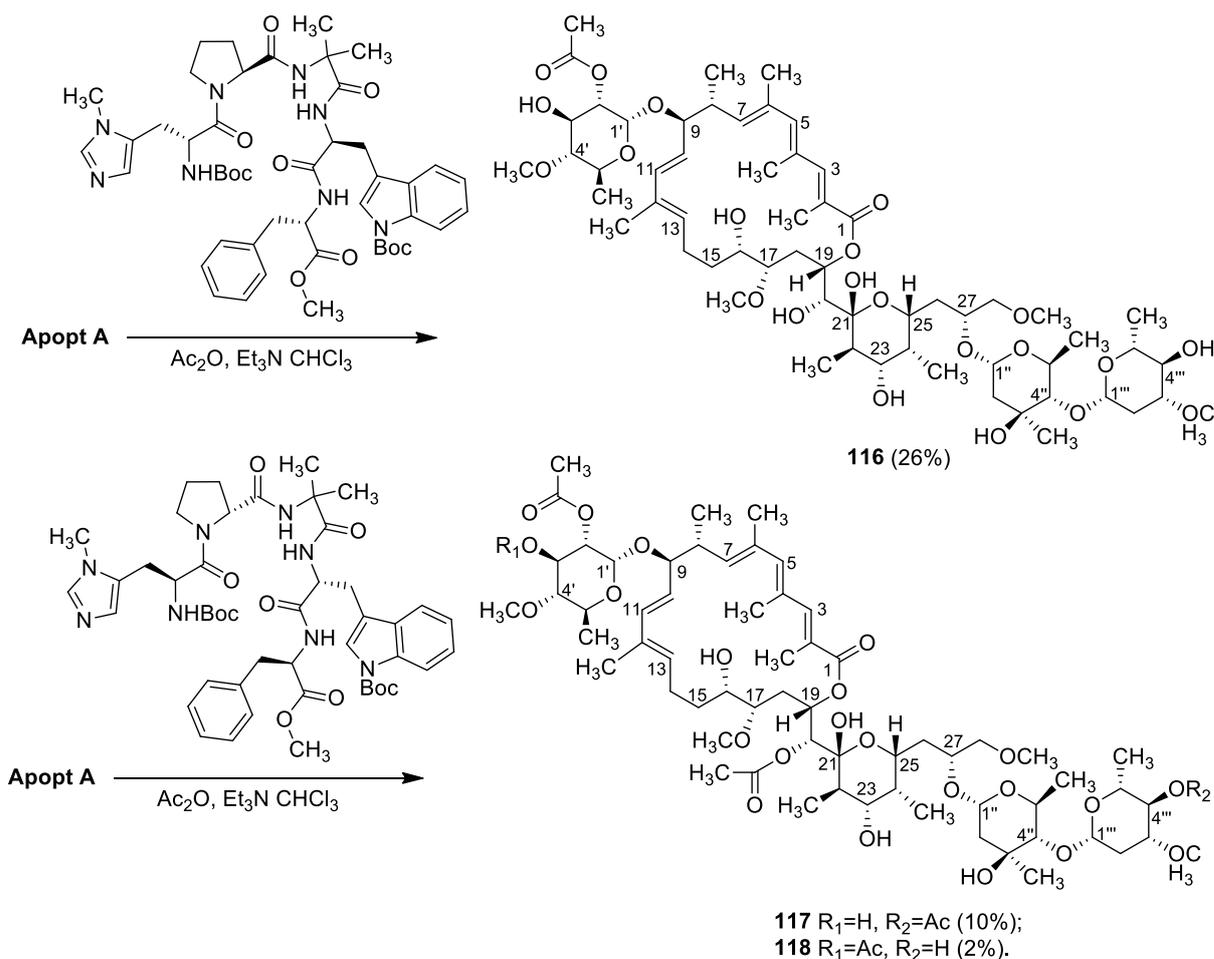


Изучение стабильности 20-*O*-ацетильного **113** и 20-*O*-метильного **115** производных показало, что несмотря на отсутствие процесса изомеризации с увеличением макроцикла, данные производные все равно подвергались превращениям, природа которых изучена не была. Тестирование биологической активности полученных ацильных и метильных производных в отношении АТФ-синтазы показало, что модификация С20 и С21 гидроксильных групп приводит к заметному снижению активности, тогда как эстерификация остальных положений практически не влияет на способность антибиотика подавлять работу АТФазы.

Низкая эффективность и трудоемкость использования защитных групп для получения региоселективных производных апоптолидина А стимулировала поиск иных способов диверсификации антибиотиков. С этой целью группа J. Miller и P. Wender провела поиск пептидных катализаторов, способных модулировать региоселективность реакции за счет изменения нативной реакционной способности функциональных групп [147]. Такой подход к направленной диверсификации соединений с несколькими одинаковыми функциональными группами является альтернативой классическому методу последовательной постановки и снятия защитных групп. Скрининг библиотеки пептидов (150-160 соединений) позволил подобрать условия региоселективного ацетилирования апоптолидина в

условиях пептидного катализа. Стоит отметить, что применимость метода на практике к широкому ряду субстратов ограничена трудоемкостью подбора подходящего катализатора (поиск не имеет теоретической основы и для достижения нужного результата может потребоваться провести сотни экспериментов). Однако, авторы показали, что такой скрининг можно проводить в микромолярных концентрациях, поскольку данные реакции могут быть масштабированы до миллиграммовых количеств. С помощью пептидного катализа в одну стадию из олигомицина были получены 2'-О-ацетилапоптолидин **116**, и смесь полиацелированных производных 2',20,4''-О-трисацетилапоптолидин **117** и 2',3',20-О-трисацетилапоптолидин **118** (схема 1.23).

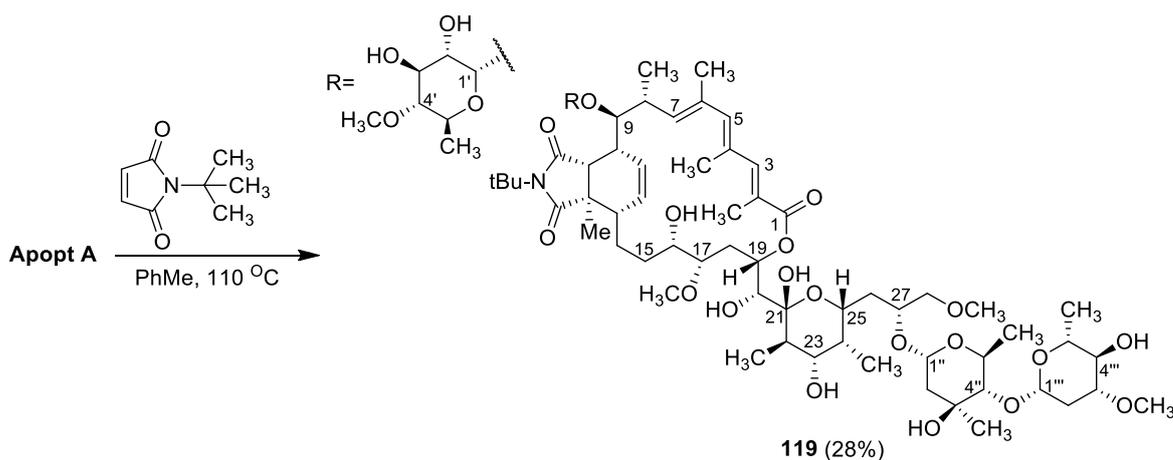
Схема 1.23



Биологическая активность новых производных в отношении клеток карциномы легких человека H292 оказалась несколько ниже, чем у апоптолидина, однако сохранилась на довольно высоком уровне [147].

В качестве единственного примера модификации двойных С-С связей апоптолидина описана реакция Дильса-Альдера, в которой антибиотик выступает в качестве диена С10-С13 участком макроцикла [148]. Циклоприсоединение N-ди(трет-бутил)малеимида к апоптолидину проводилось в толуоле при нагревании до 110 градусов. Реакция протекает стереоселективно, давая в качестве основного продукта аддукт **119** (схема 1.24). Структура циклоаддукта **119** установлена на основании ЯМР-спектроскопии (ROESY).

Схема 1.24

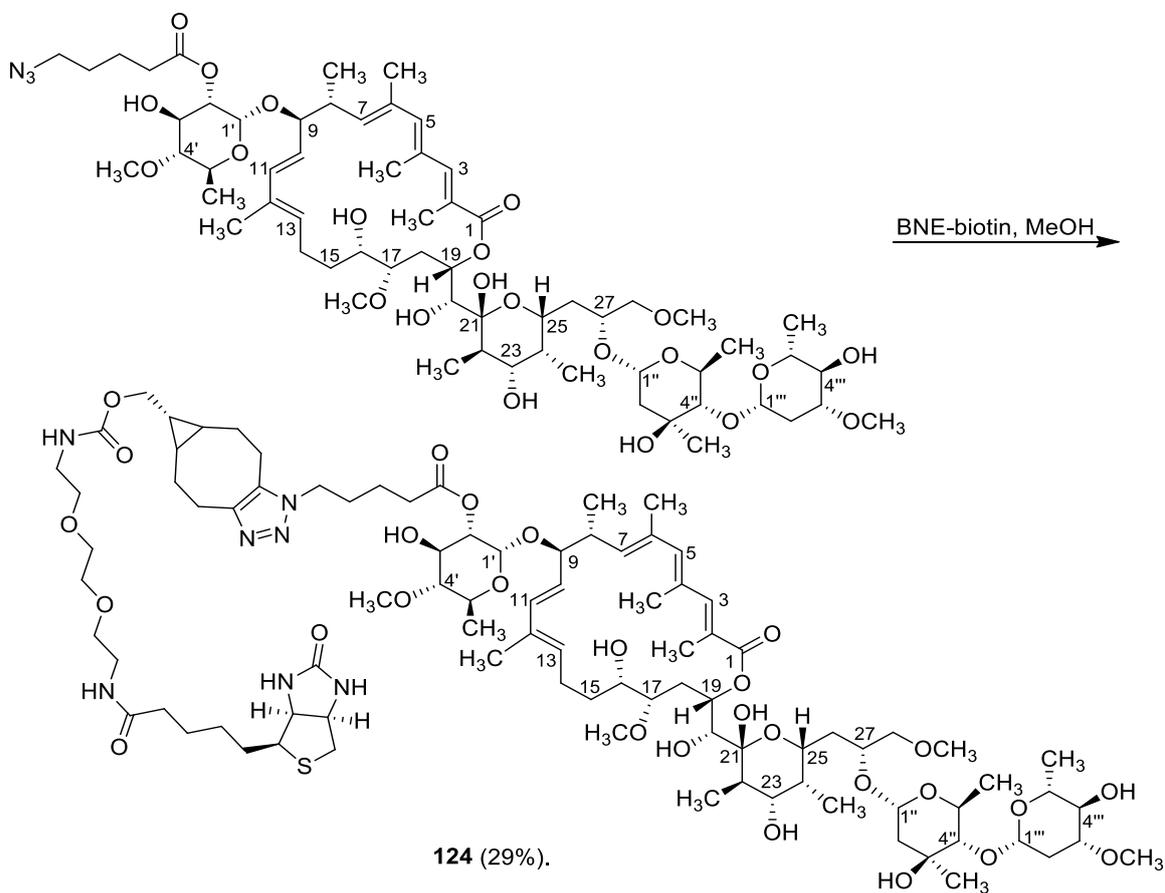
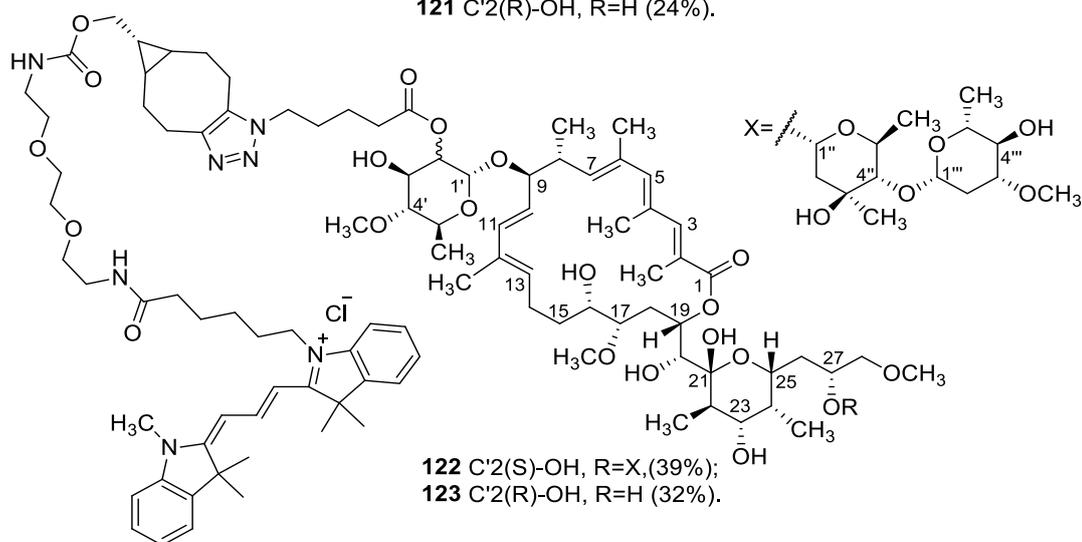
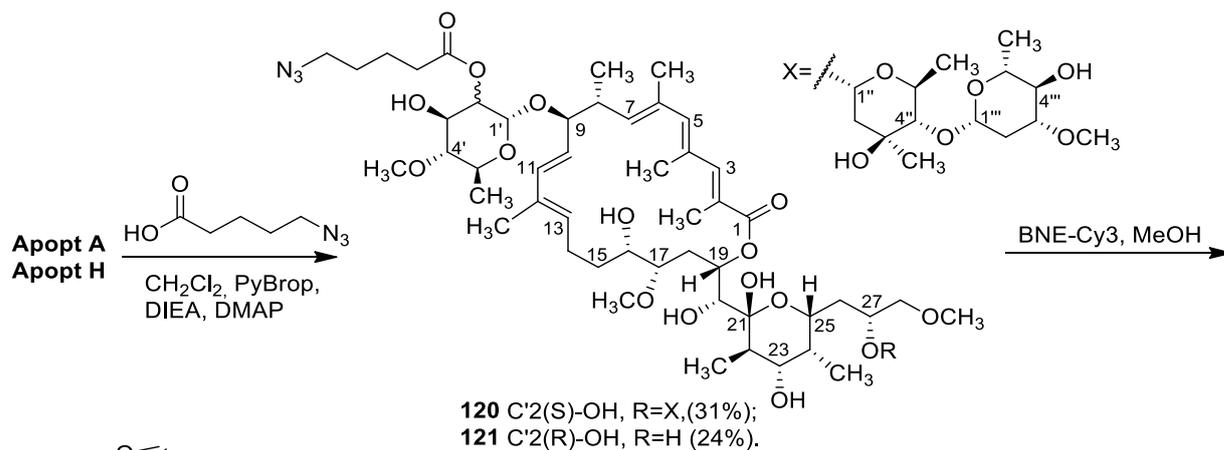


Также в данном исследовании [148] был проведен сравнительный анализ цитотоксической и ингибирующей активности в отношении F₀F₁ АТФ-синтазы изоапоптолидина **65**, частично дегликозильированных производных апоптолидина **75**, **77**, **79**, аналога С20-С27 части антибиотика – лактона **73**, а также ацилированных производных **97**, **109-113** и метилированных производных **96** и **115**. Оказалось, что ингибирующая активность на модели АТФ синтаз не коррелирует с антипролиферативной активностью *in vitro*: практически все производные проявили ингибирующую активность (IC₅₀ 0.4 – 3.0 μM), за исключением изоапоптолидина **65** и

Для исследования его проникновения и локализации в опухолевых клетках, а также изучения роли сахарных остатков в данном процессе был осуществлен синтез меченных флуоресцентными метками производных апоптолидина А и Н [150]. Данные антибиотики были функционализированы флуоресцентными метками по С'2 положению (как по наиболее реакционноспособной гидроксильной группе апоптолидина). Для этого 2'-ОН группа сначала была конденсирована с 5-азидопентановой кислотой, затем полученные азидаапоптолидины **120**, **121** связывались с помощью клик-реакции [1+3] циклоприсоединения с цианиновым красителем (Cy-3), конъюгированным через мостик полиэтиленгликоля с бицикло[6.1.0]нонином, давая соединения **122**, **123** (схема 1.25). Для апоптолидина А также был синтезирован аналогичный конъюгат **124**, вместо Cy-3 содержащий биотин (схема 1.25).

Полученные конъюгаты сохранили антипролиферативную активность, что позволяло их использовать в биологических испытаниях [150]. Проникновение и распределение апоптолидинов А и Н в опухолевых и нормальных культурах клеток было исследовано методами конфокальной микроскопии и проточной цитофлуометрии [151]. Наблюдалась селективность проникновения и накопления апоптолидинов в опухолевых клетках, однако и в нормальных клетках также присутствовало минимальное количество антибиотика. Меченные антибиотики в клетках рака легких человека H292 локализовались в митохондриях.

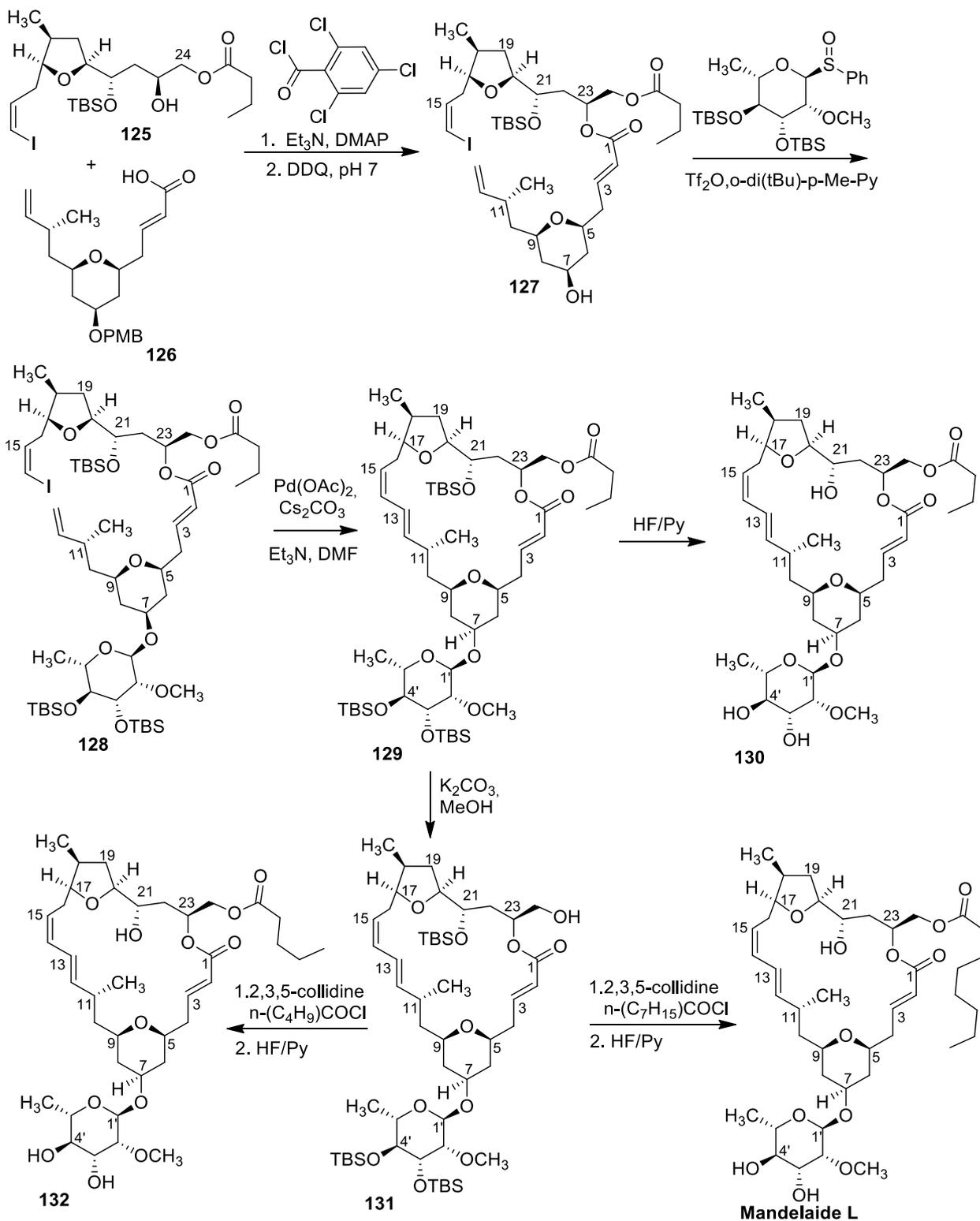
Схема 1.25



1.5.3. Модификация манделаидов

Данная группа макролидных ингибиторов АТФ-синтазы была открыта относительно недавно, и получению их аналогов посвящена работа одной исследовательской группы McPail K.L. и Smith A.B. [152]. Синтетические производные манделаидов, ацилированные остатками масляной и пентановой кислот по C24 положению, были получены по пути полного синтеза. Стратегия синтеза заключалась в использовании многокомпонентных систем, сочетающихся по принципу «перехода анионного заряда» (ARC, Anion Relay Chemistry, концепция сформулирована Smith A.B. в 2006 году). C14-C24 **125** фрагмент был сконструирован по протоколу ARC II типа (когда отрицательный заряд, образующийся при нуклеофильной атаке субстрата, мигрирует в новое место локализации) и кросс-сочетания, и был дополнен ацилированием по C24 гидроксильной группе хлорангидридом бутановой кислоты. Ключевым этапом синтеза фрагмента C1-C13 **126** является четырехкомпонентная ARC-реакции I типа (когда миграция отрицательного заряда, образующийся при нуклеофильной атаке субстрата, происходит в место его изначальной локализации). Фрагменты **125** и **126** соединялись с помощью этерификации C1-кислоты с C23-гидроксильной группой по Ямагучи, давая соединение **127**. Гликозилирование полученного продукта по C7 гидроксигруппе (соединение **128**) и последующее внутримолекулярное кросс-сочетание по Хеку C-11 иодида с терминальной C12 алкеновой группой приводит к трис(трибутисилил)замещенному 24-О-бутаноилманделаиду А **129**. Снятие защитных групп с производного **129** приводит к гомологу манделаида L **130**. Гидролиз защищенного манделаида **129** действием карбоната калия в метаноле с последующим ацилированием пентаноилхлоридом и снятие защитных групп дает производное **132** (схема 1.26).

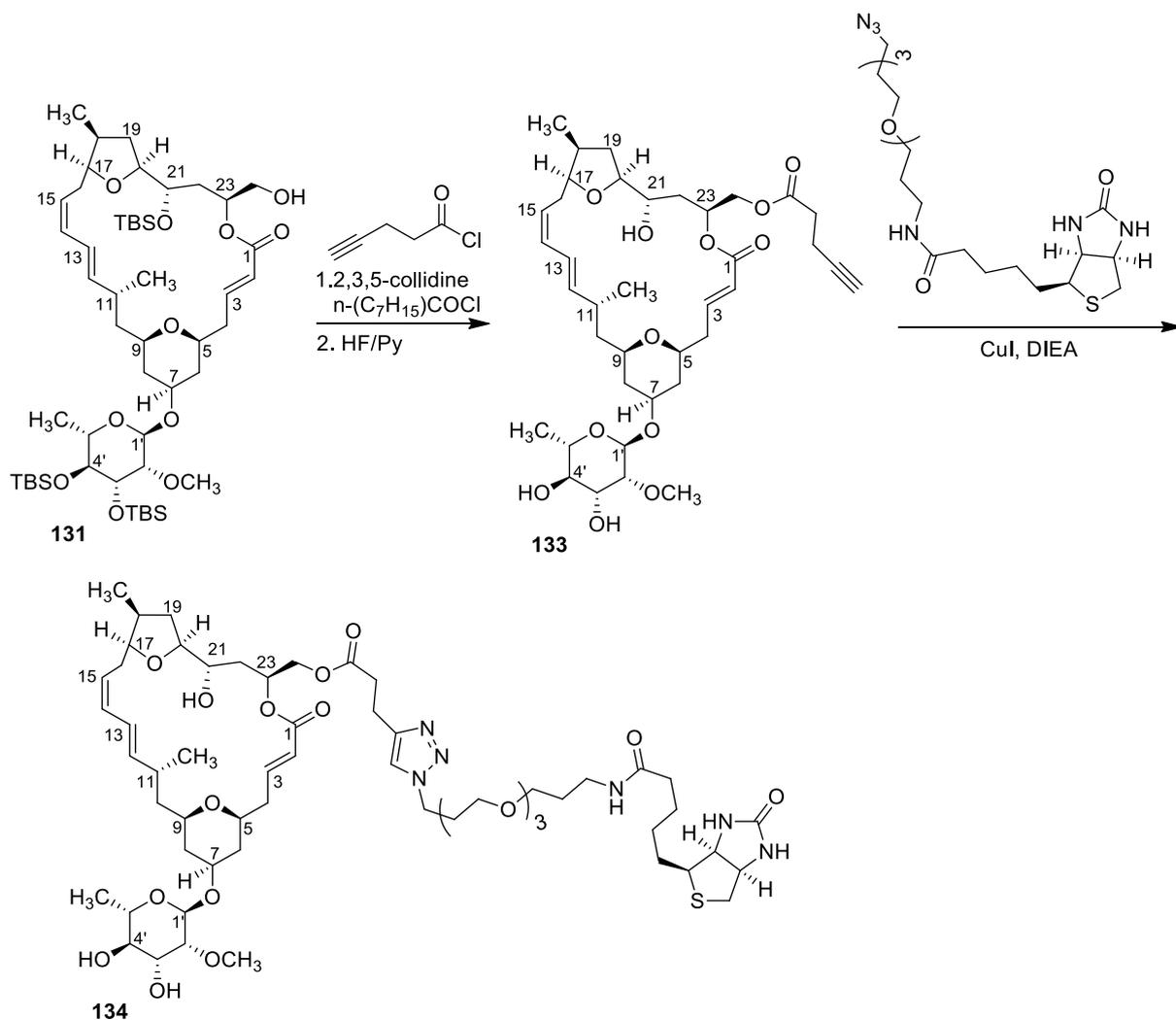
Схема 1.26



Синтетический трис(трибутилсилил)манделаид **131** со свободной гидроксильной группой в 24 положении был использован для синтеза конъюгата манделаида с биотином. Сначала был получен эфир манделаида с бутин-1 карбоновой кислотой **133**, затем по реакции 1,3 диполярного

циклоприсоединения по Хуисгену (Huisgen) присоединен биотин через полиэтиленгликолевый мостик, давая конъюгат **134** (схема 1.27). Как ацетиленовое производное **133**, так и биотин-содержащий манделаид **134** сохранили высокую антипролиферативную активность и способность ингибировать АТФазу, что делает их пригодными для использования в биологических исследованиях механизма действия манделаидов и других процессов, происходящих в живой клетке при действии данных природных макролидов. Бутаноил- и пентаноил- производные манделаида А **130**, **132** также проявили высокую антипролиферативную активность [152].

Схема 1.27



1.6. Заключение

Класс макролидных ингибиторов митохондриальной F_0F_1 АТФ-синтазы представлен природными соединениями довольно разнообразной структуры. Общими чертами структур данных антибиотиков являются поликетидное строение, наличие спирокетальных или циклических полуацетальных фрагментов и ненасыщенных связей (особенно α,β -связь лактона). К настоящему времени описано значительное количество природных антибиотиков семейства олигомицинов, варьирующее структуры которых в основном заключается в строении полиольной цепи, количестве звеньев макроцикла и метильных заместителях. Строение спирокетального фрагмента довольно консервативно, хотя возможно варьирование его гидроксильных и алкильных заместителей. Основными функциональными группами антибиотиков-ингибиторов АТФ-синтаз являются гидроксильные и метильные группы, а также более длинные алкильные цепи. Иногда (например, в структурах апоптолидинов и манделаидов) присутствуют ацильные заместители.

Синтез производных макролидных ингибиторов проводился в основном путем химической модификации природных антибиотиков. Сложная и лабильная структура макролидных антибиотиков обуславливает трудоемкость и низкую эффективность полного синтеза. Микробиологический способ получения новых антибиотиков также не нашел широкого применения, возможно, вследствие ограниченных возможностей введения функциональных групп, а также сложности контролирования направленности процесса.

Анализ литературы показал, что по всем возможным направлениям модификации олигомицина существует несколько примеров, но полусинтетических олигомицинов описано сравнительно мало, и ни одного производного с улучшенными химиотерапевтическими свойствами. Ранние работы характеризуются либо низкой селективностью проводимых

превращений, либо низким выходом целевых соединений вследствие многостадийности процесса. Следовательно, целесообразна разработка новых, селективных методов трансформации двойных С-С связей и карбонильных групп с выделением производных в виде индивидуальных оптически чистых соединений. Кроме того, существенное влияние заместителя в 33 положении на активность олигомицина А обуславливает перспективность продолжения работ по модификации данного положения. Заслуживают внимания также разработка методов эффективного ацилирования олигомицина А.

2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании анализа литературы были намечены три основных направления химической модификации олигомицина А: (I) трансформация двойных С-С и С-О связей макроцикла, (II) трансформация боковой гидроксипропильной цепи и (III) ацилирование гидроксильных групп антибиотика (рис. 2.1). Первое направление включает в себя гидрирование кратных С-С связей, регио- и стереоселективное восстановление карбонильных групп в С7 и С11 положениях, окисление двойной С-С связи и [4+2] присоединение активных диенофилов к С16-С19 диеновой системе. В рамках модификаций боковой гидроксипропильной цепи были запланированы эпимеризация и окисление С33 гидроксильной группы, а также ее замещение на галоген. В качестве третьего направления работ была выбрана разработка методов региоселективного ацилирования наиболее реакционноспособных гидроксильных групп олигомицина в С9 и С33 положениях.

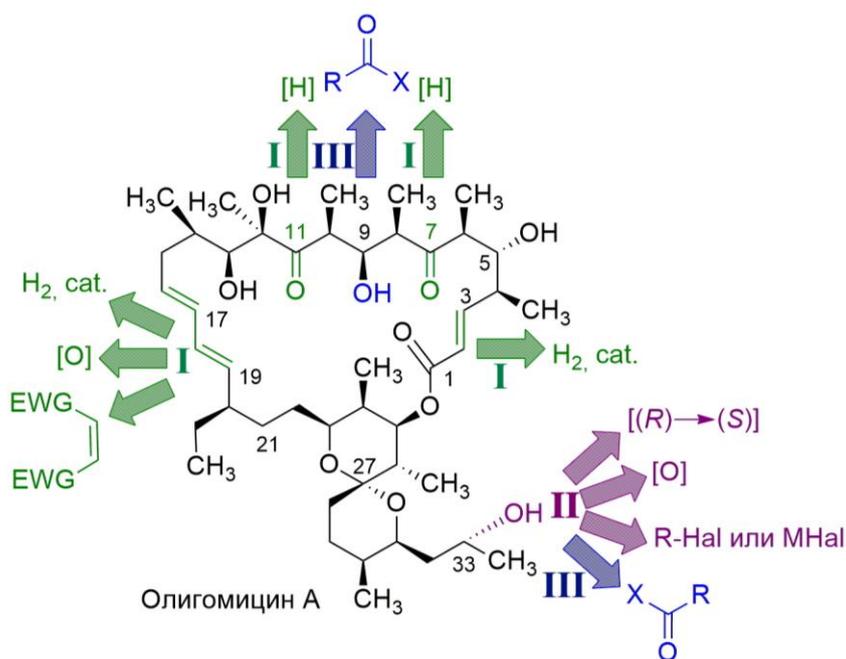


Рисунок 2.1. Направления химических модификаций олигомицина А.

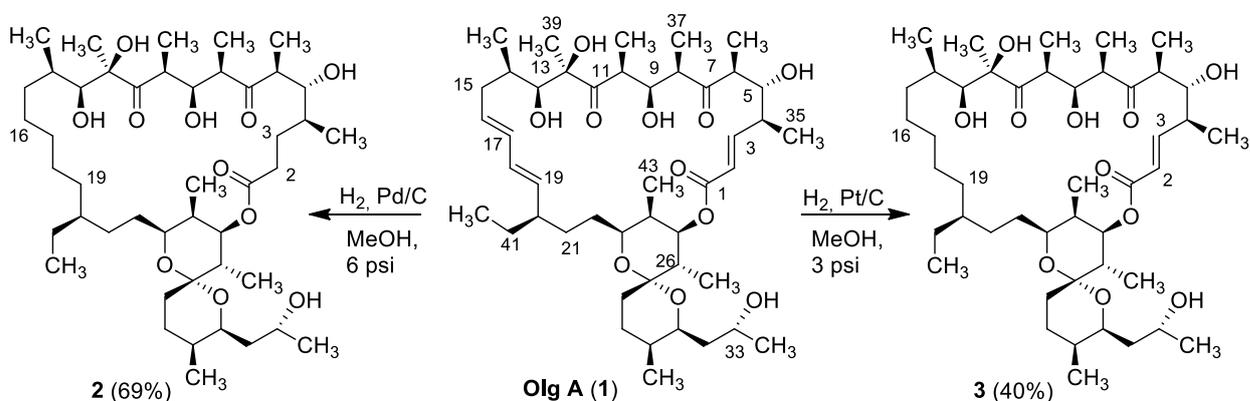
2.1. Восстановление двойных С-С и С-О связей олигомицина

Анализ литературы показал, что восстановление двойной С2-С3 связи олигомицина **А** (**1**) приводит к повышению активности в отношении дрожжей *S. cerevisiae*. Следовательно, целесообразно расширить представления о влиянии двойных С-С связей олигомицина **А** на его биологическую активность. С этой целью был предпринят поиск способов региоселективного восстановления антибиотика по кратным связям углерод-углерод.

Микробиологический способ, предложенный корейскими исследователями [132], позволяет селективно восстановить акриловую С2-С3 связь, не затрагивая сопряженную систему в положениях 16-19. В процессе разработки региоселективного химического гидрирования олигомицина **А** был опробован ряд катализаторов, однако подобрать условия для избирательного восстановления одной С=С связи олигомицина **А** не удалось. Гидрирование антибиотика **1** на катализаторе Роземунда (Pd/BaSO₄, 5%) как в протонных растворителях (метанол, этанол), так и в неполярных (толуол, циклогексан) дает трудноразделимую смесь продуктов гидрирования. В условиях катализа на Pd/C (5%) гидрирование протекает более активно, но неселективно и затрагивает как сопряженные связи в 16-19 положениях, так и α,β -ненасыщенную связь лактона в положениях 2, 3. Так, гидрирование в мягких условиях олигомицина **А** (**1**) на Pd/C в метаноле дает 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицин (**2**) с хорошим выходом (схема 2.1). Следует отметить, что при контроле протекания реакции методом тонкослойной хроматографии (элюент гексан:ацетон 1,7:1) при неполной конверсии олигомицина **А** (**1**) пробы реакционной смеси содержали только исходное соединение **1** ($R_f=0.43$) и продукт реакции **2** ($R_f=0.48$), а образование промежуточных продуктов гидрирования практически не наблюдалось. На платиновом катализаторе гидрирование олигомицина **А** в метаноле протекает преимущественно по диеновым связям, приводя к 16,17,18,19-тетрагидроолигомицину **А** (**3**) с умеренным выходом (схема 2.1). В условиях

гомогенного гидрирования олигомицина А с использованием реагента Уилкинсона ((Ph₃P)₃RhCl, трис(трифенилфосфин)родия (I) хлорид) в качестве катализатора также наблюдается восстановление диеновой системы, однако реакция протекает в более жестких условиях, и конверсия исходного антибиотика составляет не более 50%. Гидрирование на никеле Ренея приводит к трудноразделимой смеси продуктов восстановления как двойных С-С связей, так и карбонильных групп.

Схема 2.1



Структуры пергидроолигомицина (2) и 16,17,18,19-тетрагидроолигомицина (3) установлены методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса¹ и методами масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS ESI)².

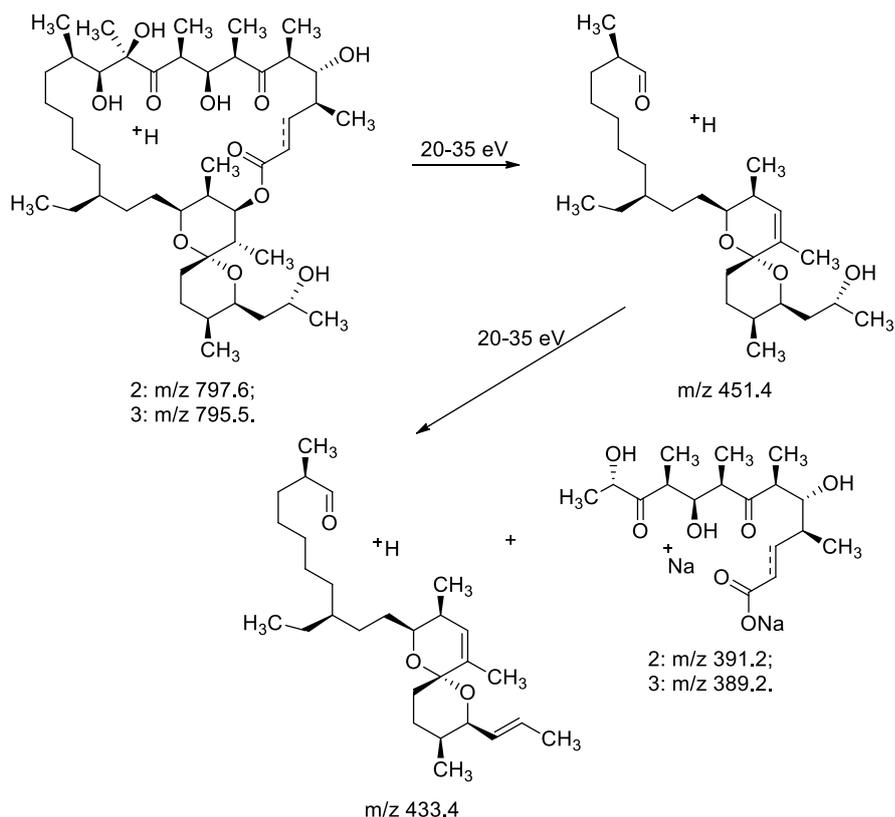
Масс-спектр высокого разрешения производного 2 содержал пик, соответствующий молекулярному иону лактона 2 - 797.5593 [M+H]⁺. В масс-спектре высокого разрешения (HRMS ESI) соединения 3 наблюдался сигнал m/z 829.5215, соответствующий молекулярному иону 16,17,18,19-тетрагидроолигомицина А [M-H+2H₂O]⁻.

¹ За регистрацию спектров ЯМР олигомицинов и помощь в соотнесении сигналов автор выражает глубокую благодарность Белову Никите Михайловичу (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе) и Савельеву Олегу Юрьевичу (МГУ им. М.В. Ломоносова).

² За регистрацию масс-спектров олигомицинов автор выражает глубокую благодарность д.х.н. Королеву Александру Михайловичу (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе).

Структура восстановленных олигомицинов **2**, **3** подтверждена тандемной масс-спектрометрией (МС / МС, CID) при низкой энергии квадруполя (20-90 эВ). При энергии соударений 20-35 эВ в масс-спектрах производных преобладал ион m/z 451, образующийся при раскрытии лактона и ретроальдольного расщепления по положению 13. Дальнейшая фрагментация приводит к элиминированию молекулы воды в положении 33. Так, в спектрах восстановленных олигомицинов наблюдался преимущественно ион m/z 433, а также ионы m/z 391 для соединения **2** и ион с m/z 389 для соединения **3**, соответствующие второй половине молекул. Возможные структуры фрагментации ионов **2**, **3** (m/z 797.6 и m/z 795.5 соответственно) изображены на схеме 2.2. Следует отметить, что гидрирование кратных связей повышает лабильность цикла в условиях тандемной масс-спектрометрии. Так, заметная фрагментация макроцикла производных **2**, **3** наблюдается при энергии соударений 20 эВ, в то время как деструкция аналогов, содержащих присущие олигомицину три двойные связи, происходит лишь при энергии соударений 70 эВ.

Схема 2.2



Для восстановленных олигомицинов **2**, **3** зарегистрированы спектры ЯМР ^1H и ^{13}C , а также корреляционные спектры ЯМР ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC. Спектр ЯМР ^{13}C соединения **2** содержит 45 сигналов, из которых 11 соответствуют CH_3 -группам, 13 – CH_2 -группам, 16 – CH -группам (на основании анализа спектра ^1H - ^{13}C HSQC), 2 – группам $\text{C}=\text{O}$, 1 – группе $\text{O}-\text{C}=\text{O}$, 1 – группе $\text{O}-\text{C}-\text{O}$, 1 – группе $\text{C}-\text{O}$ (на основании анализа спектра ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC). В спектре ЯМР ^{13}C пергидроолигомицина А (**2**) отсутствуют сигналы олефиновых ядер ^1H и ^{13}C в слабом поле, что подтверждает восстановление всех связей $\text{C}=\text{C}$ исходного олигомицина А (**1**). В спектрах ^1H , ^{13}C производного **3** отсутствуют сигналы только диеновой системы (положения 16-19), что подтверждает полное восстановление сопряженной системы исходного антибиотика.

Отнесение химических сдвигов на основании анализа спектров ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, приведены в табл. 2.1.

Таблица 2.1 Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР восстановленных олигомицинов **2, 3** и олигомицина **A**.

П.	Олигомицин A (1)				Пергидроолигомицин 2				Тетрагидроолигомицин 3			
	Тип	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (J в Hz)	ppm, мульт.	Тип	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (J в Hz)	ppm, мульт.	Тип	δ_c , ppm	δ_H , мульт. (J в Hz)	ppm, мульт.
1	O=CO	165.0	–		O=CO	175.1	–		O=CO	167.4	–	
2	CH	122.6	5.80, дд (15.6, 0.7)	дд (15.6, 0.7)	CH ₂	33.1	2.46, дд (15.7, 6.6, 0.8); 2.37, дд (15.7, 6.6, 0.8)		CH	123.4	5.90, (15.6)	д
3	CH	148.3	6.62, дд (15.6, 10.1)	дд (15.6, 10.1)	CH ₂	30.1	1.78, м; 1.49, м		CH	151.4	6.84, дд (15.7, 9.9)	дд
4	CH	40.1	2.36, ткв (10.0, 6.6)	ткв (10.0, 6.6)	CH	36.5	1.53, м		CH	42.7	2.45, ткв (9.9, 6.5)	ткв
5	CH	72.9	3.75, дд (10.1, 1.3)	дд (10.1, 1.3)	CH	75.9	3.65, ткв (6.3, 4.7)	ткв (6.3, 4.7)	CH	74.5	3.83, дд (10.4, 1.0)	дд
6	CH	46.4	2.70, дкв (1.3, 7.4)	дкв (1.3, 7.4)	CH	48.3	3.02, дкв (6.9, 6.7)	дкв (6.9, 6.7)	CH	48.2	2.82, квд (7.3, 0.9)	квд
7	C=O	220.2	–		C=O	218.4	–		C=O	218.6	–	
8	CH	41.9	3.59, дкв (8.6, 6.9)	дкв (8.6, 6.9)	CH	49.9	2.71, дкв (4.0, 7.1)	дкв (4.0, 7.1)	CH	49.2	2.64, квд (7.0, 1.4)	квд
9	CH	72.6	3.94, дд (8.6, 3.1)	дд (8.6, 3.1)	CH	72.9	4.16, дд (7.4, 4.0)	дд (7.4, 4.0)	CH	73.6	4.08, дд (7.5, 1.4)	дд
10	CH	45.6	2.74, дкв (3.0, 7.1)	дкв (3.0, 7.1)	CH	44.1	3.51, дкв (7.1, 6.9)	дкв (7.1, 6.9)	CH	44.7	3.59, квд (7.5, 7.0)	квд
11	C=O	219.9	–		C=O	221.5	–		C=O	221.8	–	
12	C-O	82.9	–		C-O	84.5	–		C-O	84.4	–	
13	CH	72.2	3.89, д (1.9)	д (1.9)	CH	75.8	3.90, д (2.0)	д (2.0)	CH	76.6	3.83, д (1.4)	д
14	CH	33.4	1.88, м		CH	34.8	1.77, м		CH	35.1	1.76, м	
15	CH ₂	38.3	2.17, бд; 1.98 дт	бд; 1.98 дт	CH ₂	28.9	1.43, м; 1.23, м		CH ₂	27.8	1.20, м; 1.48, м	м;
16	CH	129.3	5.42, ддд (14.8, 10.5, 4.1)	ддд (14.8, 10.5, 4.1)	CH ₂	27.0	1.43, м; 1.30, м		CH ₂	29.2	1.28, м; 1.46, м	м;
17	CH	132.3	6.00, ддд (14.7, 10.4, 1.4)	ддд (14.7, 10.4, 1.4)	CH ₂	27.1	1.43, м; 1.30, м		CH ₂	26.5	1.28, м; 1.46, м	м;
18	CH	130.2	5.90, дд (14.9, 10.5)	дд (14.9, 10.5)	CH ₂	27.6	1.43, м; 1.30, м		CH ₂	27.0	1.28, м; 1.46, м	м;
19	CH	137.7	5.21, дд (14.8, 9.6)	дд (14.8, 9.6)	CH ₂	29.2	1.43, м; 1.30, м		CH ₂	29.4	1.28, м; 1.46, м	м;
20	CH	45.9	1.85, м		CH	40.0	1.32, м		CH	31.9	1.59, м	
21	CH ₂	31.4	1.52, м; 1.35, м		CH ₂	36.2	1.44, м; 1.23, м		CH ₂	32.9	1.28, м; 1.46, м	м;
22	CH ₂	30.9	1.59, ддд		CH ₂	30.5	1.43, м; 1.23, м		CH ₂	36.5	1.22, м; 1.49, м	м;
23	CH	68.9	3.78, ддд (9.8, 2.7, 2.4)	ддд (9.8, 2.7, 2.4)	CH	70.6	3.85, ддд (5.9, 0.9, 2.0)	ддд (5.9, 0.9, 2.0)	CH	70.5	3.85, м	
24	CH	35.7	2.11, ддкв (5.0, 2.2, 6.9)	ддкв (5.0, 2.2, 6.9)	CH	36.7	2.11, ддкв (2.0, 0.9, 7.2)	ддкв (2.0, 0.9, 7.2)	CH	36.8	2.14, м	
25	CH	76.1	4.91, дд (11.4, 5.0)	дд (11.4, 5.0)	CH	77.7	4.99, дкв (11.8, 4.5)	дкв (11.8, 4.5)	CH	78.0	5.00, дд (11.4, 4.5)	дд
26	CH	37.6	1.78, дкв (11.4, 6.6)	дкв (11.4, 6.6)	CH	39.3	1.78, м		CH	39.3	1.85, квд (11.4, 6.5)	квд
27	OCO	99.1	–		OCO	100.6	–		OCO	100.6	–	
28	CH ₂	25.9	1.90, м; 1.23, м		CH ₂	27.5	1.93, м; 1.23, м		CH ₂	27.8	1.20, м; 1.96, м	м;
29	CH ₂	26.4	2.07, м; 1.38, м		CH ₂	27.8	2.16, м; 1.41, м		CH ₂	28.3	1.40, м; 2.16, м	м;
30	CH	30.4	1.54, м		CH	31.8	1.56, м		CH	40.0	1.33, м	
31	CH	67.1	3.96, дт (10.3, 2.5)	дт (10.3, 2.5)	CH	68.8	4.03, дт (10.1, 2.8)	дт (10.1, 2.8)	CH	69.0	4.03, м	

П.	Олигомицин А (1)			Пергидроолигомицин 2			Тетрагидроолигомицин 3			
	Тип	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (J в Hz)	Тип	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (J в Hz)	Тип	δ_c , ppm	δ_H , мульт. (J в Hz)	ppm, м;
32	CH ₂	42.4	1.55, м; 1.25 м	CH ₂	43.7	1.54, м; 1.31, м	CH ₂	43.8	1.36, м; 1.55, м	м;
33	CH	64.6	4.00, ддкв (9.2, 3.1, 6.2)	CH	65.4	3.93, ддкв (9.3, 3.7, 6.2)	CH	65.5	3.95, м	
34	CH ₃	24.6	1.21, д (6.2)	CH ₃	25.1	1.19, д (6.2)	CH ₃	25.1	1.20, д (6.4)	
35	CH ₃	17.8	1.16, д (6.6)	CH ₃	13.3	0.94, д (6.6)	CH ₃	18.0	1.17, д (6.5)	
36	CH ₃	8.2	1.05, д (7.3)	CH ₃	11.0	1.13, д (6.9)	CH ₃	9.8	1.06, д (7.3)	
37	CH ₃	9.2	1.01, д (7.0)	CH ₃	14.2	1.14, д (7.1)	CH ₃	10.0	1.05, д (7.0)	
38	CH ₃	14.0	1.09, д (6.9)	CH ₃	14.4	1.14, д (6.9)	CH ₃	14.9	1.16, д (7.0)	
39	CH ₃	20.9	1.11, с	CH ₃	22.4	1.21, с	CH ₃	22.6	1.14, с	
40	CH ₃	14.4	0.98, д (6.6)	CH ₃	14.8	0.97, д (6.9)	CH ₃	14.7	0.98, д (6.6)	
41	CH ₂	28.4	1.35, м; 1.25, м	CH ₂	32.6	1.29, м	CH ₂	30.5	1.28, м; 1.46, м	м;
42	CH ₃	12.0	0.80, т (7.4)	CH ₃	12.3	0.89, т (7.1)	CH ₃	12.3	0.91, т (7.4)	
43	CH ₃	6.0	0.82, д (6.9)	CH ₃	6.4	0.91, д (7.2)	CH ₃	6.8	0.91, д (7.2)	
44	CH ₃	11.7	0.95, д (6.6)	CH ₃	11.9	0.93, д (6.9)	CH ₃	11.8	0.97, д (6.5)	
45	CH ₃	11.1	0.88, д (6.9)	CH ₃	12.1	0.94, д (6.9)	CH ₃	12.3	0.91, д (6.9)	

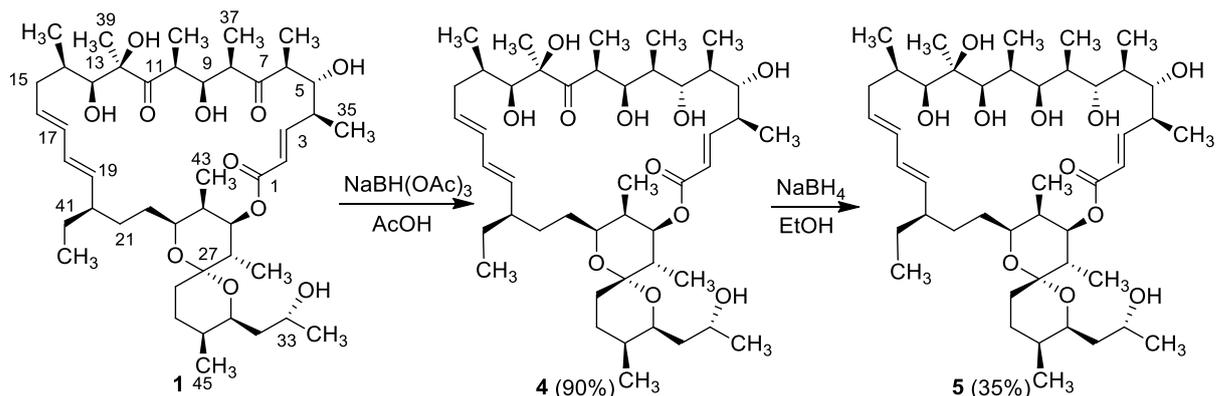
Одной из наиболее ранних работ по химической модификации антибиотиков семейства олигомицинов является восстановление кетогрупп в 7 и 11 положении олигомицина D и смеси олигомицинов А, В и С действием NaBH₄ в спиртовом растворе [123]. Биохимические исследования смеси энантиомеров 7-дигидро- и 7,11-тетрагидроолигомицина D показали, что восстановленные производные сохранили способность к ингибированию работы АТФ-азы, хотя и оказались менее активны, чем исходный олигомицин D. Поскольку восстановленные олигомицины не были выделены в виде индивидуальных оптически чистых соединений, а также не было проведено исследование биологической активности полученных производных, целесообразна разработка методов регио- и стереоселективного восстановления карбонильных групп олигомицина А.

В структуре олигомицина А присутствуют две кето-группы (С7 и С11), способные к восстановлению. Региоселективность может быть достигнута за счет стерического фактора. Так, карбонильный С11 атом экранирован заместителями в С12 положении, и стерически затрудненные боргидридные восстановители будут вступать во взаимодействие только с С7-кето-группой. В β -положениях к С7-карбонильной группе находятся две гидроксильные группы – С5-ОН и С9-ОН, что обуславливает возможность ее

стереоселективного восстановления триацетоксиборгидридом натрия до *анти*-диола [153]. Направление присоединения гидрид-иона, определяемое β -гидроксильными группами, в случае олигомицина А носит согласованный характер, и его восстановление должно приводить к единственному диастереомеру. Действительно, взаимодействие олигомицина А с $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ в уксусной кислоте протекает регио- и стереоселективно, давая 7-(*S*)-дигидроолигомицин А (**4**) с высоким выходом (схема 2.3).

Экранирование С11-карбонильной группы метильным и гидроксильным заместителями в соседнем С12 положении значительно понижают ее реакционную способность к боргидридному восстановлению. В мягких условиях С11-кето группа 7-дигидроолигомицина **4** оставалась инертной, не вступая во взаимодействие ни с триацетоксиборгидридом, ни с цианборгидридом натрия при продолжительном нагревании в уксусной кислоте. Восстановление карбонильной группы в 11 положении 7-дигидроолигомицина **4** было достигнуто действием боргидрида натрия в водном этаноле. Реакция протекает с приемлемой стереоселективностью, давая в качестве основного продукта 7(*S*),11(*R*)-тетрагидроолигомицин А (**5**) (схема 2.3). Низкий выход производного **5** связан с длительным выдерживанием реакционной смеси в слабощелочных условиях, в которых исходный антибиотик довольно лабилен. Образование *син*-аддукта объясняется, вероятно, тем, что переходное состояние соответствует модели Фелкина, в которой положение С12 выполняет роль объемного заместителя, а присоединение гидрид-иона осуществляется со стерически менее затрудненной стороны.

Схема 2.3



Строение 7,11-гидроксильных производных **4**, **5** установлено методами масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. В масс-спектре высокого разрешения (HRMS ESI) соединения **4** наблюдается сигнал m/z 827.5066, соответствующий молекулярному иону 7-(*S*)-дигидроолигомицина А [$\text{M} + 2\text{H}_2\text{O}$]. Наблюдаемый сигнал в масс-спектре (HRMS ESI) соединения **5** (m/z 817.5459) соответствует молекулярному иону 7,11-тетрагидроолигомицина А [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$. В спектре ^1H 7-(*S*)-дигидроолигомицина **4** наблюдается появление нового сигнала от атома водорода в положении 7 ($\delta\text{H}7=3.70$ м.д.), в спектре ^{13}C – значительное смещение сигнала атома углерода в положении 7 в сторону слабого поля ($\delta\text{C}7=80.4$ м.д.) по сравнению с исходным антибиотиком ($\delta\text{C}7=220.2$ м.д.), что свидетельствует о восстановлении карбонильного атома углерода в положении 7. Аналогичные изменения наблюдаются в спектрах ЯМР производного **5**: появление новых ^1H сигналов в положениях 7 и 11 ($\delta\text{H}7=3.66$ м.д., $\delta\text{H}11=3.58$ м.д.) и смещение сигналов ^{13}C в положениях 7 и 11 в сторону слабого поля ($\delta\text{C}7=79.4$ м.д., $\delta\text{C}11=82.2$ м.д.) по сравнению с исходным антибиотиком ($\delta\text{C}7=220.2$ м.д., $\delta\text{C}11=219.9$ м.д.), что говорит о восстановлении обеих карбонильных групп. Соотнесение сигналов для производных **4** и **5** выполнено на основании анализа спектров ЯМР ^1H , ^{13}C , ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY (табл. 2.2).

Таблица 2.2 Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР 7(7,11)-гидроолигомицинов **4** и **5** в сравнении с олигомицином **A (1)**

П.	Олигомицин A (1)			7-дигидроолигомицин (4)			7,11-тетрагидроолигомицин (5)		
	Тип	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (J в Hz)	Тип	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (J в Hz)	Тип	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (J в Hz)
1	O=CO	165.0	–	O=CO	167.5	–	O=CO	167.3	–
2	CH	122.6	5.80, дд (15.6, 0.7)	CH	123.2	5.85, д (15.6)	CH	122.9	5.83, д (15.7)
3	CH	148.3	6.62, дд (15.6, 10.1)	CH	151.8	6.94, дд (15.6, 8.8)	CH	152.5	6.76, дд (15.7, 9.5)
4	CH	40.1	2.36, ткв (10.0, 6.6)	CH	43.8	2.48, ткв (8.8, 7.0)	CH	42.6	2.50, ткв (9.5, 6.5)
5	CH	72.9	3.75, дд (10.1, 1.3)	CH	81.9	3.68, дд (9.0, 1.3)	CH	80.0	3.50, д (9.5)
6	CH	46.4	2.70, дкв (1.3, 7.4)	CH	36.6	1.88, квд (7.0, 1.3)	CH	38.3	1.87, м
7	C=O	220.2	–	CH	80.4	3.70, дд (9.0, 1.3)	CH	79.4	3.66, дд (6.8, 2.4)
8	CH	41.9	3.59, дкв (8.6, 6.9)	CH	40.4	1.40, ддд (7.4, 1.1, 9.3)	CH	41.4	1.78, м
9	CH	72.6	3.94, дд (8.6, 3.1)	CH	74.7	3.66, дд (10.0, 1.1)	CH	73.8	4.00, дд (3.8, 2.0)
10	CH	45.6	2.74, дкв (3.0, 7.1)	CH	43.5	3.75, квд (10.0, 6.9)	CH	37.7	2.07, м
11	C=O	219.	–	C=O	222.7	–	CH	82.2	3.58, д (3.5)
12	C-O	82.9	–	C-O	84.2	–	C-O	78.2	–
13	CH	72.2	3.89, д (1.9)	CH	74.0	3.80, д (1.4)	CH	72.9	3.78 (ушир. с)
14	CH	33.4	1.88, м	CH	35.2	1.82, м	CH	35.4	1.87, м
15	CH ₂	38.3	2.17, бд; 1.98 дт	CH ₂	39.9	2.02, м; 2.11, м	CH ₂	40.2	2.06, м; 2.20, м
16	CH	129.3	5.42, ддд (14.8, 10.5, 4.1)	CH	131.7	5.45, ддд (14.9, 10.4, 4.0)	CH	132.5	5.51, ддд (15.0, 10.4, 4.7)
17	CH	132.3	6.00, ддд (14.7, 10.4, 1.4)	CH	134.1	6.11, ддд (14.9, 10.4, 1.2)	CH	133.5	6.07, ддд (15.0, 10.4, 1.2)
18	CH	130.2	5.90, дд (14.9, 10.5)	CH	132.8	6.01, дд (15.1, 10.4)	CH	133.0	5.99, дд (15.0, 10.4)
19	CH	137.7	5.21, дд (14.8, 9.6)	CH	138.1	5.20, дд (14.9, 9.7)	CH	137.2	5.20, дд (15.0, 9.1)
20	CH	45.9	1.85, м	CH	47.6	1.88, м	CH	45.0	2.04, м
21	CH ₂	31.4	1.52, м; 1.35, м	CH ₂	32.9	1.04, м; 1.63, м	CH ₂	31.3	1.32, м; 1.61, м
22	CH ₂	30.9	1.59, ддд	CH ₂	32.5	1.04, м; 1.63, м	CH ₂	30.9	1.30, м; 1.57, м
23	CH	68.9	3.78, ддд (9.8, 2.7, 2.4)	CH	70.2	3.85, м	CH	69.1	3.87, м
24	CH	35.7	2.11, ддкв (5.0, 2.2, 6.9)	CH	37.8	1.97, м	CH	37.6	1.89, м
25	CH	76.1	4.91, дд (11.4, 5.0)	CH	77.7	5.00, дд (11.4, 4.5)	CH	77.3	5.06, дд (11.5, 5.0)
26	CH	37.6	1.78, дкв	CH	39.3	1.76, дкв	CH	39.5	1.78, м

П.	Олигомицин А (1)			7-дигидроолигомицин (4)			7,11-тетрагидроолигомицин (5)		
	Тип	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (J в Hz)	Тип	δ_c , ppm	δ_H , мульт. ppm, (J в Hz)	Тип	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (J в Hz)
27	OCO	99.1	(11.4, 6.6) –	OCO	100.5	(11.4, 6.5) –	OCO	100.6	–
28	CH ₂	25.9	1.90, м; 1.23, м	CH ₂	27.1	1.20, м; 1.96, м	CH ₂	27.2	1.22, м; 1.96, м
29	CH ₂	26.4	2.07, м; 1.38, м	CH ₂	27.9	1.40, м; 2.16, м	CH ₂	27.8	1.44, м; 2.15, м
30	CH	30.4	1.54, м	CH	40.0	1.33, м	CH	31.8	1.60, м
31	CH	67.1	3.96, дт (10.3, 2.5)	CH	68.7	4.04, дт (10.0, 2.7)	CH	69.6	3.97, дт (9.0, 3.0)
32	CH ₂	42.4	1.55, м; 1.25 м	CH ₂	43.8	1.32, м; 1.55, м	CH ₂	44.0	1.45, м; 1.58, м
33	CH	64.6	4.00, ддкв (9.2, 3.1, 6.2)	CH	65.2	3.97, м	CH	66.0	3.93, м
34	CH ₃	24.6	1.21, д (6.2)	CH ₃	25.2	1.21, д (6.4)	CH ₃	25.1	1.24, д (6.1)
35	CH ₃	17.8	1.16, д (6.6)	CH ₃	18.0	1.15, д (7.0)	CH ₃	17.7	1.14, д (6.6)
36	CH ₃	8.2	1.05, д (7.3)	CH ₃	5.6	0.76, д (7.0)	CH ₃	6.4	0.91, д (7.0)
37	CH ₃	9.2	1.01, д (7.0)	CH ₃	9.4	0.99, д (7.2)	CH ₃	11.4	1.00, д (6.8)
38	CH ₃	14.0	1.09, д (6.9)	CH ₃	15.3	1.12, д (6.9)	CH ₃	15.9	1.06, д (6.9)
39	CH ₃	20.9	1.11, с	CH ₃	22.2	1.07, с	CH ₃	19.5	1.06, с
40	CH ₃	14.4	0.98, д (6.6)	CH ₃	15.6	1.01, д (7.4)	CH ₃	15.7	1.00, д (6.7)
41	CH ₂	28.4	1.35, м; 1.25, м	CH ₂	30.0	1.28, м; 1.44, м	CH ₂	29.4	1.27, м; 1.45, м
42	CH ₃	12.0	0.80, т (7.4)	CH ₃	12.3	0.86, т (7.6)	CH ₃	12.3	0.86, т (7.4)
43	CH ₃	6.0	0.82, д (6.9)	CH ₃	7.4	0.89, д (7.0)	CH ₃	6.7	0.83, д (7.0)
44	CH ₃	11.7	0.95, д (6.6)	CH ₃	12.7	0.97, д (6.5)	CH ₃	12.3	0.94, д (6.6)
45	CH ₃	11.1	0.88, д (6.9)	CH ₃	11.7	0.93, д (6.9)	CH ₃	11.7	0.94, д (7.1)

Относительная конфигурация положений 7 и 11 в синтезированных производных была установлена методами двумерной ЯМР-спектроскопии. Анализ спектра ¹H-¹H ROESY 7-(S)-дигидроолигомицина **4** показал пространственное сближение протонов H38-H7, H37-H7, H36-H7, H8-H6, H6-H4 (рис. 2.1) на основании чего была однозначно установлена относительная конфигурация C7-(S). Аналогично определена конфигурация положения 11 7,11-тетрагидроолигомицина А (**5**): в спектре ¹H-¹H ROESY, наблюдались корреляции между протонами H39-H11, H9-H11 и H11-H13 (рис. 2.2).

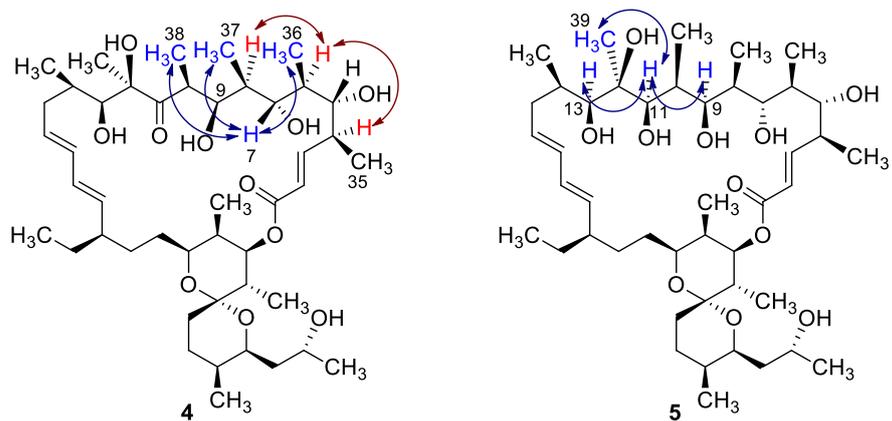


Рисунок 2.2 Корреляции, наблюдаемые в спектрах ^1H - ^1H ROESY производных 4 и 5

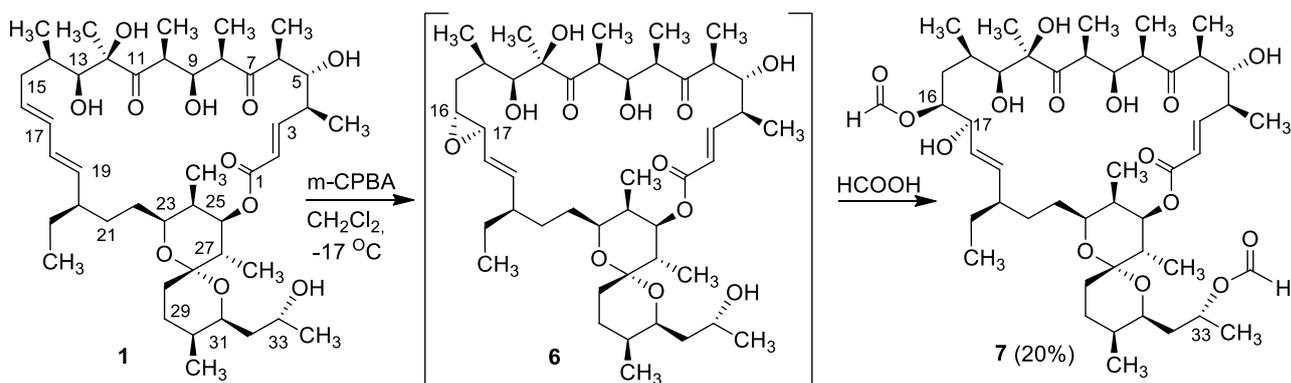
2.2. Окисление двойной С-С связи и формилирование олигомицина

Реакции окисления являются одним из важнейших методов трансформации в медицинской химии [154]. Согласно анализу литературы, данное направление является не исследованной областью для антибиотиков семейства олигомицинов и других макролидных антибиотиков – ингибиторов F_0F_1 АТФ-синтаз. Как было показано в главе 2.3., один из структурных аналогов вентурицидина, ирумамицин, содержит в своей структуре эпоксидный цикл. Химической модификацией олигомицина А было получено его бром-производное, содержащее в своей структуре 6-тетрагидропирановый цикл, тогда как эпоксид-содержащих антибиотиков семейства олигомицинов (ни природных, ни полусинтетических) описано не было. В связи с этим, синтез эпоксиолигомицина А позволит получить новых представителей этого семейства антибиотиков и исследовать влияние наличия эпоксидного цикла на биологическую активность олигомицинов. Кроме того, возможность раскрытия эпоксидного цикла расширяет синтетические возможности для модификации олигомицинов.

Для эпоксидирования двойных С-С связей олигомицина А исследованы возможности реакции Прилежаева. Взаимодействие антибиотика **1** с *m*-хлорпероксибензойной кислотой (*m*-СРВА) в хлористом метиле при комнатной температуре протекает с низкой избирательностью, приводя к трудноразделимой смеси продуктов окисления. Однако, снижение температуры реакции до $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ позволяет провести эпоксидирование олигомицина более селективно по одной из двойных С-С связей (схема 2.4). С учетом стерических препятствий, наиболее вероятно окисление протекает по 16,17 положениям олигомицина А, так как С18-С19 двойная связь экранирована вторичной алкильной группой в положении 20. Кроме того, описанное ранее бромирование олигомицина А также протекает по положениям 16,17, что свидетельствует о большей доступности и реакционной способности С16-С17 двойной связи олигомицина А по

сравнению с сопряженной с ней C18-C19 связью. Контроль протекания реакции методом ТСХ (CHCl_3 -MeOH 10:0.5) показывает, что в реакции образуется преимущественно один продукт окисления **6** (R_f 0.51) с небольшим количеством неидентифицированных примесей.

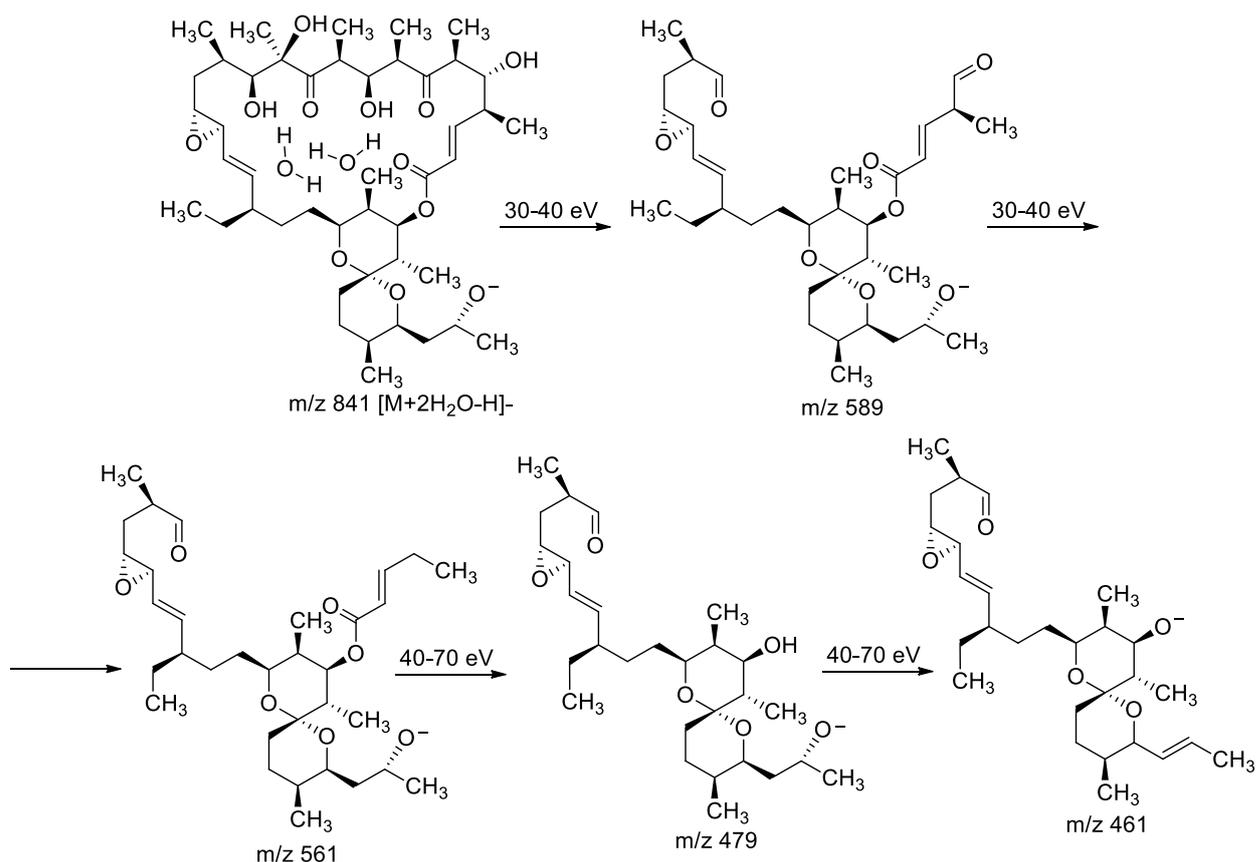
Схема 2.4



При попытке выделения индивидуального 16,17-эпоксиолигомицина А (**6**) было обнаружено, что это соединение неустойчиво, как в условиях нормально-фазовой колоночной хроматографии, так и в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ, и в результате разложения приводит к трудноразделимой смеси продуктов. Соответственно, наработка и выделение соединения **6** в количествах и с чистотой, приемлемыми для проведения анализа структуры методами ЯМР-спектроскопии и изучения биологических свойств оказались невозможными. Наличие эпоксидного фрагмента в структуре **6** доказано методами масс-спектрометрии, в частности, tandemной масс-спектрометрией (МС / МС, CID) при низкой энергии квадруполя (20-90 эВ). Масс-спектр высокого разрешения содержал пик, соответствующий молекулярному иону эпоксидированного лактона **6** – 841.5294 $[\text{M}+2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$. При энергии соударений -30-40 эВ в масс-спектрах производного **6** преобладает ион m/z 589, образующийся при отщеплении C6-C12 поликетидного фрагмента за счет ретроальдольного распада макроцикла. В этих условиях также наблюдается отщепление одной из концевых альдегидных групп (ион m/z 561). При увеличении энергии соударений происходит разрыв

сложноэфирной связи и элиминирование молекулы воды от 33 положения. Так, на масс-спектре наблюдаются ионы m/z 479 и m/z 461, подтверждающие наличие эпоксидной группы в положениях 16-19. Возможные структуры фрагментации иона **6** (m/z 841) методом МС / МС изображены на схеме 2.5.

Схема 2.5



Низкая устойчивость 16,17-эпксиолигомицина А (**6**) обусловлена, по всей видимости, наличием в его структуре эпоксидного цикла. Поэтому, для установления его точного строения были проведены поиски эффективного способа раскрытия эпоксиды и получения его стабильного производного. Учитывая, что макролактон олигомицина А (**1**) легко подвергается ретроальдольному расщеплению в основных условиях, тогда как в кислой среде его макроцикл относительно устойчив, были исследованы возможности раскрытия эпоксидного цикла полученного производного **6** в кислой среде. Обнаружено, что сольволиз эпоксиолигомицина **6** в муравьиной кислоте при комнатной температуре приводит не только к

раскрытию эпоксидного цикла, но и к формилированию гидроксигруппы в положении 33, приводя к 16,17-дигидро-16(*S*),17(*R*)-дигидрокси-16,33-*O,O*-диформилолигомицину **А** (**7**) с умеренным выходом (схема 2.4). Строение производного олигомицина **7** доказано методами ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS ESI).

Для 16,17-дигидро-16(*S*),17(*R*)-дигидрокси-16,33-*O,O*-диформилолигомицина **А** (**7**) зарегистрированы спектры ЯМР ^1H и ^{13}C , а также корреляционные спектры ЯМР ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC. Спектр ЯМР ^{13}C соединения **7** содержит 47 сигналов, из которых 11 соответствуют CH_3 -группам, 7 – CH_2 -группам, 22 – CH -группам (на основании анализа спектра ^1H - ^{13}C HSQC), 2 – группам $\text{C}=\text{O}$, 1 – группе $\text{O}-\text{C}=\text{O}$, 1 – группе $\text{O}-\text{C}-\text{O}$, 1 – группе $\text{C}-\text{O}$, 2-группе HCOO (на основании анализа спектра ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC). В спектрах ^1H , ^{13}C соединения **7** в 16,17 положениях наблюдается смещение сигналов в сильное поле ($\delta\text{C}16=71.2$, $\delta\text{H}16=4.85$ м.д.; $\delta\text{C}17=78.3$, $\delta\text{H}17=4.38$ м.д.) по сравнению с исходным антибиотиком ($\delta\text{C}16=129.3$, $\delta\text{H}16=5.42$ м.д.; $\delta\text{C}17=132.3$, $\delta\text{H}17=6.0$ м.д.), а также появление сигналов в области слабого поля, соответствующих двум формильным группам ($\delta\text{C}46=160.6$, $\delta\text{H}46=8.11$ м.д. – HCOO в положении 16; $\delta\text{C}47=160.4$, $\delta\text{H}47=8.04$ м.д. – HCOO в положении 33). Отнесение химических сдвигов на основании анализа спектров ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, приведены в табл. 2.3.

Таблица 2.3 Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР производного **7** в сравнении с олигомицином **А** (**1**).

Поз.	Олигомицин А (1)			Производное 7	
	Тип	$\delta_{\text{с}}$, ppm	δ_{H} , ppm, мульт. (<i>J</i> в Hz)	$\delta_{\text{с}}$, ppm	δ_{H} , ppm, мульт. (<i>J</i> в Hz)
1	$\text{O}=\text{CO}$	165.0	–	165.1	–
2	CH	122.6	5.80, дд (15.6, 0.7)	122.9	5.86, дд (15.5, 0.6)
3	CH	148.3	6.62, дд (15.6, 10.1)	148.9	6.63, дд (15.6, 10.2)
4	CH	40.1	2.36, ткв (10.0, 6.6)	40.0	2.42, ткв (10.0, 6.4)
5	CH	72.9	3.75, дд (10.1, 1.3)	72.9	3.79, дд (10.2, 1.0)
6	CH	46.4	2.70, дкв (1.3, 7.4)	46.4	2.69, дкв (7.6, 0.9)
7	$\text{C}=\text{O}$	220.2 ^{а)}	–	219.9	–
8	CH	41.9 ^{б)}	3.59, дкв (8.6, 6.9)	45.6	2.72, дкв (7.0, 2.4)
9	CH	72.6	3.94, дд (8.6, 3.1)	72.6	3.88, дд (9.3, 2.4)
10	CH	45.6 ^{б)}	2.74, дкв (3.0, 7.1)	41.7	3.66, дкв (9.3, 6.9)

Поз.	Олигомицин А (1)			Производное 7	
	Тип	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (<i>J</i> в Hz)	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (<i>J</i> в Hz)
11	C=O	219.9 ^{a)}	–	219.0	–
12	C-O	82.9	–	82.9	–
13	CH	72.2	3.89, д (1.9)	73.0	3.80, д (1.4)
14	CH	33.4	1.88, м	27.0	2.0, м
15	CH ₂	38.3	2.17, бд; 1.98 дт	31.3	2.20, м; 1.83, м
16	CH	129.3	5.42, ддд (14.8, 10.5, 4.1)	71.2	4.85, ддд (3.5, 2.9, 1.3)
17	CH	132.3	6.00, ддд (14.7, 10.4, 1.4)	78.3	4.38, дд (7.4, 1.3)
18	CH	130.2	5.90, дд (14.9, 10.5)	124.8	5.60, дд (15.4, 7.4)
19	CH	137.7	5.21, дд (14.8, 9.6)	139.8	5.43, дд (15.4, 8.1)
20	CH	45.9	1.85, м	43.6	1.94, м
21	CH ₂	31.4	1.52, м; 1.35, м	29.7	1.40, м; 1.25, м
22	CH ₂	30.9	1.59, ддд	29.2	1.44, м; 1.32, м
23	CH	68.9	3.78, ддд (9.8, 2.7, 2.4)	69.3	3.64, м
24	CH	35.7	2.11, ддкв (5.0, 2.2, 6.9)	35.2	2.16, м
25	CH	76.1	4.91, дд (11.4, 5.0)	75.3	5.13, дд (11.4, 5.0)
26	CH	37.6	1.78, дкв (11.4, 6.6)	38.0	1.81, м
27	OCO	99.1	–	99.4	–
28	CH ₂	25.9	1.90, м; 1.23, м	25.9	1.93, м; 1.22, м
29	CH ₂	26.4	2.07, м; 1.38, м	28.0	2.08, м; 1.44, м
30	CH	30.4	1.54, м	30.3	1.60, м
31	CH	67.1	3.96, дт (10.3, 2.5)	67.7	3.78, м
32	CH ₂	42.4	1.55, м; 1.25 м	39.9	1.71, м; 1.64, м
33	CH	64.6	4.00, ддкв (9.2, 3.1, 6.2)	69.3	5.14, м
34	CH ₃	24.6	1.21, д (6.2)	21.0	1.35, д (6.4)
35	CH ₃	17.8	1.16, д (6.6)	17.6	1.20, д (6.2)
36	CH ₃	8.2	1.05, д (7.3)	8.3	1.10, д (7.3)
37	CH ₃	9.2	1.01, д (7.0)	8.7	1.05, д (6.9)
38	CH ₃	14.0	1.09, д (6.9)	14.0	1.07, д (6.9)
39	CH ₃	20.9	1.11, с	20.1	1.15, с
40	CH ₃	14.4	0.98, д (6.6)	15.9	1.26, д (6.6)
41	CH ₂	28.4	1.35, м; 1.25, м	26.4	1.27, м; 1.43, м
42	CH ₃	12.0	0.80, т (7.4)	11.6	0.82, т (7.4)
43	CH ₃	6.0	0.82, д (6.9)	6.5	0.91, д (7.0)
44	CH ₃	11.7	0.95, д (6.6)	11.7	0.99, д (6.6)
45	CH ₃	11.1	0.88, д (6.9)	11.0	0.93, д (6.9)
46	HCOO(16)	-	-	160.6	8.11, с
47	HCOO(33)	-	-	160.4	8.04, с

Анализ спектра ¹H-¹H ROESY показал пространственное сближение протонов H18-H16, H19-H17, H17-CH₃40, ОСОН16-CH₃40, на основании чего было установлено расположение функциональных групп в положениях 16 и 17 продукта **7** и стереохимия его новых асимметрических центров – 16(*S*),17(*R*) (рис. 2.3).

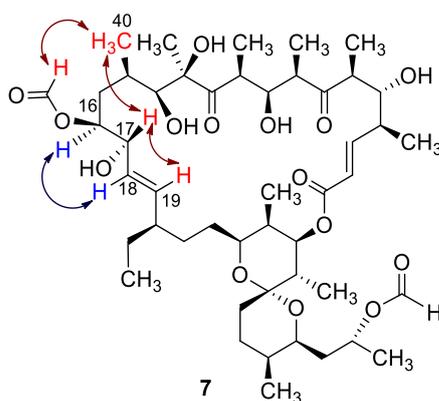


Рисунок 2.3 Корреляционные пики, наблюдаемые в спектре ¹H-¹H ROESY 16,17-дигидро-16(*S*),17(*R*)-дигидрокси-16,33-*O,O*-диформилолигомицина А (**7**).

Определение строения производного **7** позволило подтвердить сделанное ранее предположение о локализации эпоксидного цикла в 16,17-положениях, а также установить его конфигурацию. Согласно общему стереохимическому правилу раскрытия эпоксидного цикла в кислой среде [155], протекающему как *анти*-присоединение, при взаимодействии 16,17-эпксиолигомицина **6** с муравьиной кислотой происходит обращение конфигурации у C16 атома и, таким образом, эпоксидный цикл в промежуточном производном **6** имеет 16(*R*),17(*R*)-конфигурацию. Это согласуется с данными рентгеноструктурного анализа олигомицинов (см. главу 2.1), в соответствии с которыми в предпочтительной конформации олигомицина плоскость диеновой системы располагается практически перпендикулярно плоскости макроцикла. Таким образом, с учетом наименьших стерических препятствий, атака диенового фрагмента реагентами происходит предпочтительно с внешней стороны макроцикла по двойной связи в положениях 16, 17 и, например, в случае реакции Прилежаева, преимущественно образуется эпоксид с *R,R*-конфигурацией.

2.3. Реакции [4+2]циклоприсоединения олигомицина А с активными диенофилами

Реакция Дильса-Альдера нашла широкое применение в медицинской химии благодаря простоте ее проведения, практически бесконечным набором возможных трансформаций, стереоспецифичности и «атомной экономии» [156]. Ранее группа Р.А. Wender описала циклоприсоединение *трет*-бутилмалеимида к макролактону макролидного антибиотика апоптолидина А, и обнаружила, что данная модификация не приводит к потере ингибирующей активности в отношении АТФ-синтазы. (*E,E*)-Конфигурация С16-С19 диеновой системы олигомицина А также позволяет ему вступать в реакции с активными диенофилами, однако, подобных реакций [4+2] циклоприсоединения к настоящему времени описано не было.

Диеновая система олигомицина А может существовать в двух конформациях, *s-цис* и *s-транс* (рис. 2.4). Согласно рентгеноструктурному анализу олигомицина А [49, 50], двойные сопряженные С-С связи имеют *s-транс* конформацию, тогда как для вступления в реакции [4+2] циклоприсоединения олигомицин должен принять *s-цис* конформацию. Оценка перехода данного антибиотика из одной конформации в другую, а также определение соотношений этих двух конформаций в толуоле при комнатной температуре было выполнено с помощью конформационного поиска³ с использованием МакроМодели (MacroModel [157], Mixed Monte-Carlo/Low-Mode Molecular Dynamics [158]). Согласно результатам расчетов, разница между наименьшей энергией *s-цис* конформации и наименьшей энергией *s-транс* конформации составила 8.42 ккал/моль. С учетом всех уникальных конформаций олигомицина, соотношение *s-цис/s-транс* составило $1:3.4 \times 10^5$, что в целом указывает на возможность образования *s-цис* конформации олигомицина А в растворе и его вступления в реакции Дильса-Альдера.

³ За проведение квантово-химических расчетов автор выражает глубокую благодарность к.ф.-м. н. Медведеву Михаилу Геннадьевичу и Малышеву Вадиму Игоревичу (ИОХ им. Зелинского РАН).

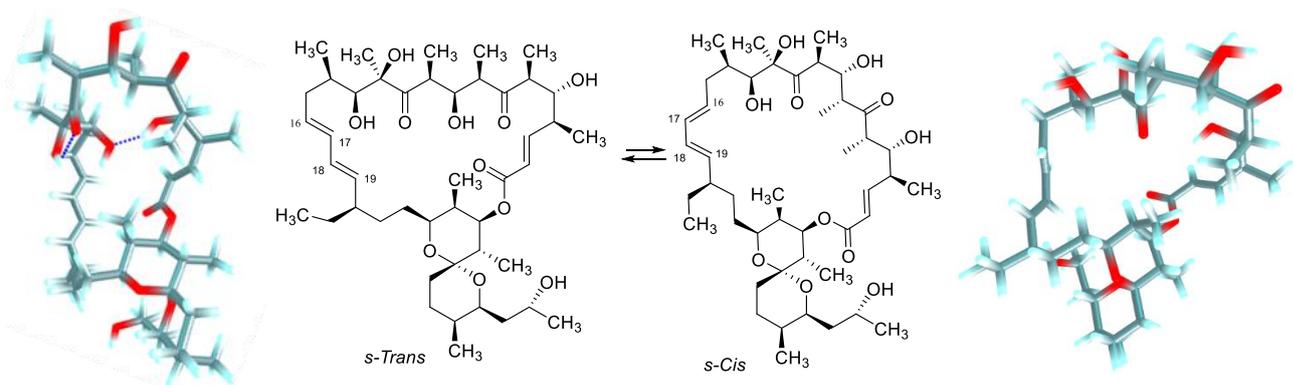
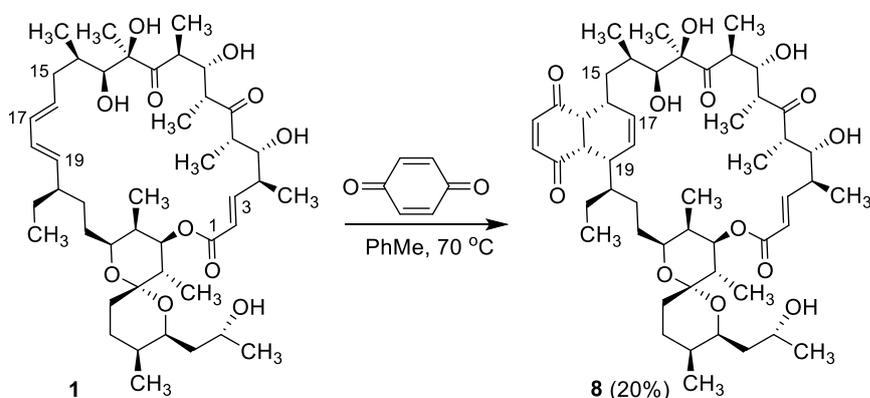


Рисунок 2.4. Две возможные конформации C16-C19 диеновых связей олигомицина А.

Практическое исследование возможностей циклоприсоединения к олигомицину А было начато с изучения взаимодействия антибиотика с бензохиноном вследствие того, что хиноны обладают высокой реакционной способностью и стереоселективностью в реакции Дильса-Альдера. При взаимодействии антибиотика **1** с бензохиноном образуется единственный аддукт циклоприсоединения **8** (схема 2.6), однако его выход составляет около 15% вследствие неполной конверсии исходного антибиотика, высокого числа неидентифицированных побочных продуктов и потерь при хроматографической очистке. Побочные продукты, по всей видимости, являются продуктами окислительной деградации антибиотика при действии бензохинона. В масс-спектре циклоаддукта **8** наблюдался сигнал m/z 933.5565, соответствующий молекулярному иону аддукта олигомицина А с бензохиноном ($[M+2H_2O-H]^-$).

Схема 2.6



В рамках поиска более подходящих диенофилов для модификации олигомицина А были выбраны производные пиррол-2,5-диона (малеимида), поскольку они обладают высокой реакционной способностью, не приводят к образованию побочных продуктов, а также представляют интерес как фармакофорная группа [159, 160]. Синтез *N*-бензилмалеимида был осуществлен за две стадии (схема 2.7) по методу [161]. Взаимодействием малеинового ангидрида с бензиламином был получен моноамид малеиновой кислоты, последующая внутримолекулярная циклодегидратация которого при нагревании в ледяной уксусной кислоте привела к *N*-бензилмалеимиду. Структура полученного продукта была подтверждена методом ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии. Спектральные характеристики и температура плавления синтезированного *N*-бензилмалеимида соответствовали литературным данным. Реакция циклоприсоединения *N*-бензилмалеимида к С16-С19 диеновой системе олигомицина А протекает в сравнительно мягких условиях. Так, взаимодействие олигомицина А с пятикратным избытком *N*-бензилмалеимида в толуоле при нагревании до 70 °С дает два изомерных аддукта в соотношении ~1.75:1 (схема 2.8). Полученная смесь продуктов была разделена методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе гексан:ацетон; выход основного изомера (**12a**) составил 47%, минорного изомера (**12b**) – 27%. В масс-спектрах производных **12a** и **12b** наблюдались сигналы m/z 1012.5998 и 1012.5985 соответственно, соответствующие молекулярному иону аддукта олигомицина А с *N*-бензилмалеимидом $[\text{C}_{56}\text{H}_{83}\text{NO}_{13}+2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^+$.

Схема 2.7

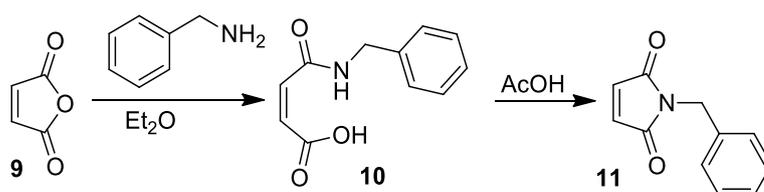
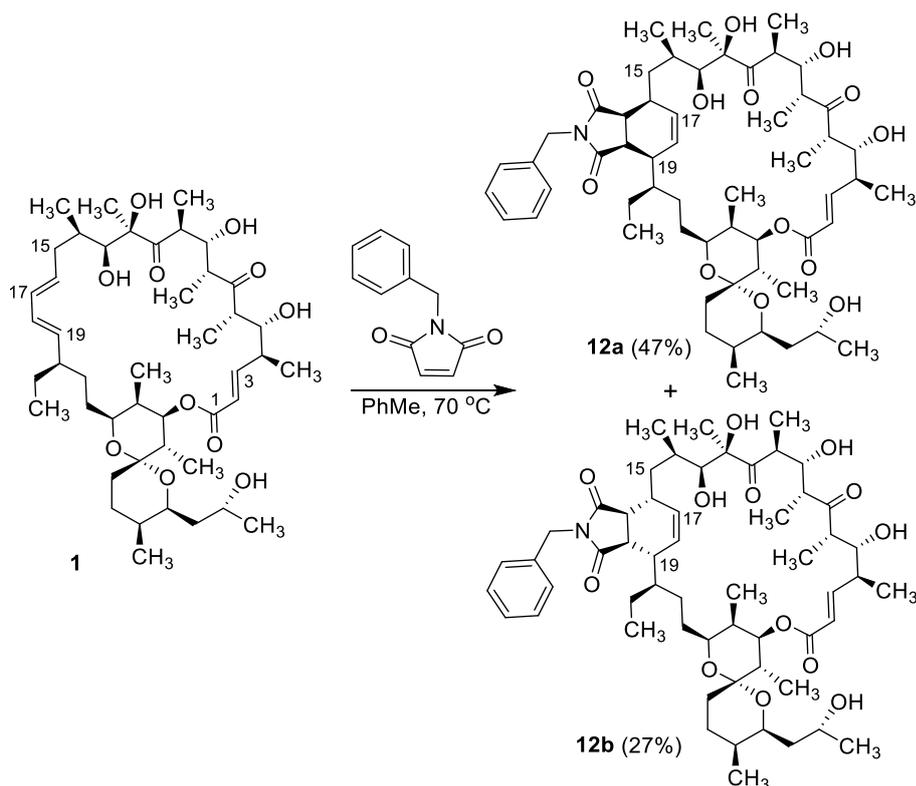
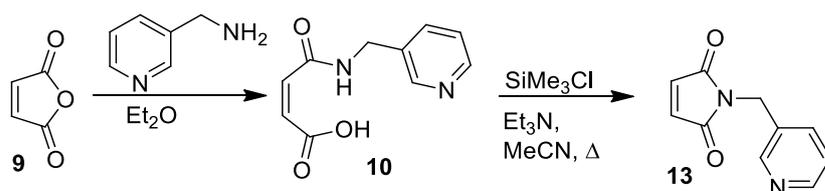


Схема 2.8



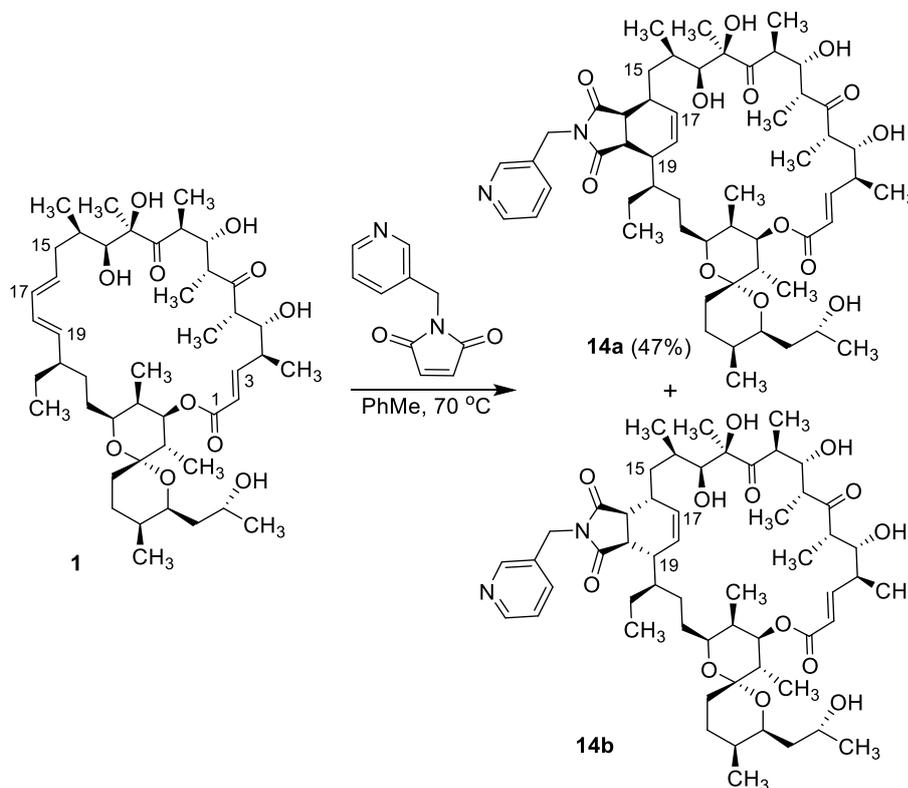
Синтез *N*-(3-пиколил)малеимида был осуществлен за две стадии (схема 2.9) по методу [162]. Взаимодействием малеинового ангидрида с 3-пиколиламином в хлористом метиле был получен моноамид малеиновой кислоты. Внутримолекулярная циклизация моноамида проводилась действием триметилсиллилхлорида в присутствии триэтиламина при кипячении в ацетонитриле. Структура полученного малеимида была подтверждена методом ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, спектральные характеристики соответствовали литературным данным.

Схема 2.9



Реакция олигомицина А с *N*-(3-пиколил)малеимидом (**13**) при нагревании в толуоле протекает с умеренной стереоселективностью, давая два изомера **14a** и **14b** с соотношением ~ 1.75:1 (схема 2.10).

Схема 2.10



В масс-спектрах образцов **14a** и **14b** наблюдались молекулярные пики с m/z 979.5869 и 979.5907 соответственно, соответствующие молекулярному иону аддукта олигомицина с *N*-пиколилмалеимидом $[M+H]^+$. Смесь продуктов была разделена методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе гексан:ацетон. Однако, очистить до приемлемого уровня для дальнейших исследований удалось только основной изомер **14a**. В образце минорного продукта на спектре ВЭЖХ наблюдалась неидентифицированная примесь (14%) с временем удержания (R_t), близким к R_t пика соединения **14b**, отделить которую оказалось затруднительно.

Установление структуры аддуктов олигомицина с бензохиноном **8**, бензилмалеимидом **12a,b** и пиколилмалеимидом **14a** проводилось методами

ЯМР-спектроскопии. В спектрах ^1H и ^{13}C исследуемых соединений наблюдалось смещение сигналов атомов водорода и углерода в положениях 16 и 19 в сторону сильного поля по сравнению с исходным антибиотиком, что свидетельствует о разрывах π -связей и образовании новых σ -связей. Кроме того, в спектрах наблюдались новые сигналы, соответствующие фрагментам диенофилов, присоединенным к молекуле олигомицина. Так, в сильном поле ^1H и ^{13}C ЯМР спектров производного **8** наблюдались новые сигналы, соответствующие двум третичным СН-группам [$\delta\text{C}41=53.9$, $\delta\text{H}41=3.35$ м.д., дд (6.5, 6.0 Гц); $\delta\text{C}46=48.5$, $\delta\text{H}46=3.54$ м.д., дд (6.0, 5.5 Гц)], а в слабом поле спектров были зарегистрированы сигналы, соответствующие двум новым карбонильным группам [$\delta\text{C}42=203.6$, $\delta\text{C}45=201.6$ м.д.] и новой двойной С-С связи (СН=СН группе) [$\delta\text{C}43=141.8$, $\delta\text{H}43=6.64$ м.д., д (10.3 Гц); $\delta\text{C}44=145.1$, $\delta\text{H}44=6.68$ м.д., д (10.3 Гц)]. В сильном поле ^1H и ^{13}C ЯМР спектров аддуктов с малеимидами (**12a**, **12b**, **14a**) наблюдались сигналы двух новых СН-групп [**12a**: $\delta\text{C}41=43.4$, $\delta\text{H}41=3.23$ м.д., дд (8.0, 6.6 Гц); $\delta\text{C}51=43.9$, $\delta\text{H}51=3.39$ м.д., дд (8.2, 4.9 Гц); **12b**: $\delta\text{C}41=47.4$, $\delta\text{H}41=3.04$ м.д., дд (7.8, 6.5 Гц); $\delta\text{C}51=43.4$, $\delta\text{H}51=3.42$ м.д., дд (8.1, 4.4 Гц); **14a**: $\delta\text{C}41=43.5$, $\delta\text{H}41=3.25$ м.д., дд (8.6, 6.3 Гц); $\delta\text{C}50=43.9$, $\delta\text{H}50=3.40$ м.д., дд (8.1, 4.6 Гц)] и новой CH_2 группы [**12a**: $\delta\text{C}43=42.9$, $\delta\text{H}43=4.53$ м.д., с; **12b**: $\delta\text{C}43=43.0$, $\delta\text{H}43=4.52$ м.д., с; **14a**: $\delta\text{C}43=40.4$, $\delta\text{H}43=4.59$ м.д., с], а в слабом поле – сигналы, соответствующие двум карбонильным группам [**12a**: $\delta\text{C}42=179.3$ м.д.; $\delta\text{C}50=179.8$ м.д.; **12b**: $\delta\text{C}42=179.8$ м.д.; $\delta\text{C}50=179.6$ м.д.; **14a**: $\delta\text{C}42=179.5$ м.д.; $\delta\text{C}49=179.0$ м.д.] и ароматическому кольцу [**12a**: $\delta\text{C}44=137.7$ м.д.; $\delta\text{C}45,49=129.0$, $\delta\text{H}45,49=7.21$ м.д., д (7.4 Гц); $\delta\text{C}46,48=129.6$, $\delta\text{H}46,48=7.27$ м.д., д (7.5, 7.4 Гц); $\delta\text{C}47=128.6$, $\delta\text{H}47=7.23$ м.д., м; **12b**: $\delta\text{C}44=137.7$ м.д.; $\delta\text{C}45,49=129.0$, $\delta\text{H}45,49=7.20$ м.д., д (7.4 Гц); $\delta\text{C}46,48=129.6$, $\delta\text{H}46,48=7.27$ м.д., д (7.5, 7.4 Гц); $\delta\text{C}47=128.7$, $\delta\text{H}47=7.23$ м.д., м; **14a**: $\delta\text{C}44=134.4$ м.д.; $\delta\text{C}45=149.9$, $\delta\text{H}45=8.43$ м.д., дд (4.8, 1.8 Гц); $\delta\text{C}46=149.3$, $\delta\text{H}46=8.43$ м.д., дд (4.8, 1.8 Гц); $\delta\text{C}47=125.3$, $\delta\text{H}47=7.38$ м.д., дд (8.0, 4.8 Гц); $\delta\text{C}48=138.2$, $\delta\text{H}48=7.71$ м.д., дт (8.0, 1.8 Гц)]. Отнесение химических сдвигов на

основании анализа спектров ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, приведены в табл. 2.4., 2.5. Первоначально вероятная относительная конфигурация 16 и 19 положений определялась, исходя из наблюдаемых корреляций пространственно сближенных протонов в ROESY спектре. В ^1H - ^1H ROESY спектре аддукта **8** наблюдались корреляции Н16-Н40, Н13-Н41, Н19-Н48, в спектре производного **12a** – Н13-Н41, Н19-Н52, в спектре производного **12b** – Н13-Н16, Н51-Н53, а в спектре **14a** – Н13-Н41, Н14-Н41 (рис. 2.5).

Таблица 2.4 . Спектры ^1H и ^{13}C аддуктов олигомицина А **8** и **14a**

Аддукт с бензохиноном 8				Аддукт с пиколилмалеимидом (14a)			
Поз.	Тип	δ_{H} , мульт.(J в Hz)	δ_{C}	Поз.	Тип	δ_{H} , мульт.(J в Hz)	δ_{C}
1	O=CO	-	168.1	1	O=CO	-	167.6
2	CH	5.98, д (15.6)	123.1	2	CH	5.90, д (15.7)	123.1
3	CH	6.84, дд (15.6, 8.6)	151.7	3	CH	6.89, дд (15.7, 8.7)	151.4
4	CH	2.51, ддкв (8.9, 8.6, 6.6)	42.3	4	CH	2.48, м	42.3
5	CH	3.83, дд (8.9, 2.1)	74.9	5	CH	3.86, (9.0, 1.7)	74.7
6	CH	2.78, дкв (6.8, 2.2)	50.1	6	CH	2.71, квд (7.2, 1.4)	47.5
7	C=O	-	218.2	7	O=C	-	218.6
8	CH	2.68, дкв (7.2, 2.8)	48.3	8	CH	2.48, квд (6.8, 1.8)	48.7
9	CH	4.01, дд (8.5, 2.8)	73.1	9	CH	4.01, дд (9.5, 2.0)	73.6
10	CH	3.46 дкв (8.5, 6.8)	43.8	10	CH	3.70, дкв (9.5, 6.8)	44.0
11	C=O	-	221.6	11	O=C	-	223.8
12	C-O	-	84.8	12	C-OH	-	84.3
13	CH	3.51, д (3.7)	77.6	13	CH	3.92, д (1.8)	73.4
14	CH	2.06, м	31.1	14	CH	2.36, м	31.5
15	CH ₂	1.12, м; 1.29, м	41.4	15	CH ₂	1.76, м; 1.86 м	35.9
16	CH	2.65, м	35.5	16	CH	2.50, м	34.9
17	CH	5.82, м	128.7	17	CH	5.58, ддд (9.0, 3.9, 2.3)	135.1
18	CH	5.88, м	131.1	18	CH	5.82, ддд (9.0, 3.3, 3.3)	133.3
19	CH	2.29, м	40.0	19	CH	2.17, м	41.4
20	CH	2.11, м	37.1	20	CH	2.20, м	38.0
21	CH ₂	1.33, м; 1.44, м	24.8	21	CH ₂	1.23, м; 1.98, м	27.0
22	CH ₂	1/46, м; 1.61, м	28.3	22	CH ₂	1,31, м; 1.49, м	27.1
23	CH	3.96, м	69.5	23	CH	3.89, ддд (7.2, 5.1, 2.3)	71.2
24	CH	2.28, м	34.8	24	CH	2.14, квдд (6.4, 4.8, 2.3)	37.5
25	CH	5.12, дд (11.4, 4.6)	77.6	25	CH	5.12, дд (11.4, 4.8)	77.6
26	CH	1.80, дкв (11.4, 6.8)	39.3	26	CH	1.84, м	39.2
27	OCO	-	100.9	27	O-CO	-	100.8
28	CH ₂	1.19, м; 1.95, м	27.1	28	CH ₂	1.84, м; 1.95, м	25.7
29	CH ₂	1.42, м; 2.15, м	27.7	29	CH ₂	1.45, м; 2.21, м	27.9
30	CH	1.61, м	31.6	30	CH	1.59, м	31.9
31	CH	3.94, м	69.4	31	CH	4.11, дт (10.3, 2.6)	68.8
32	CH ₂	1.46, м; 1.57, м	43.9	32	CH ₂	1.34, м; 1.58, м	43.7
33	CH	3.95, м	66.0	33	CH	3.99, м	65.3
34	CH ₃	1.23, д (6.2)	24.9	34	CH ₃	1.20, д (6.4)	22.3
35	CH ₃	1.20, д (6.6)	17.6	35	CH ₃	1.18, д (6.6)	17.5
36	CH ₃	1.03, д (6.8)	9.1	36	CH ₃	1.09, д (7.2)	10.0
37	CH ₃	1.11, д (7.2)	10.8	37	CH ₃	1.08, д (6.8)	9.2
38	CH ₃	1.13, д (6.8)	14.5	38	CH ₃	1.14, д (6.8)	15.3
39	CH ₃	1.14, с	22.6	39	CH ₃	1.19, с	25.2
40	CH ₃	0.90, м	13.9	40	CH ₃	1.05, д (6.8)	15.6

Аддукт с бензохиноном 8				Аддукт с пиколилмалеимидом (14a)			
Поз.	Тип	δ_{H} , мульт.(J в Hz)	δ_{C}	Поз.	Тип	δ_{H} , мульт.(J в Hz)	δ_{C}
41	CH	3.35, дд (6.5, 6.0)	53.9	41	CH	3.25, дд (8.6, 6.3)	43.5
42	O=C	-	203.6	42	O=CN	-	179.5
43	CH	6.64, д (10.3)	141.8	43	CH ₂	4.59, с	40.4
44	CH	6.68, д (10.3)	145.1	44	C	-	134.4
45	O=C	-	201.6	45	CH	8.43, дд (4.8, 1.8)	149.9
46	CH	3.54, дд (6.0, 5.5)	48.5	46	CH	8.43, дд (4.8, 1.8)	149.3
47	CH ₂	1.61, м; 1.65, м	22.1	47	CH	7.38, дд (8.0, 4.8)	125.3
48	CH ₃	0.85, т (7.4)	8.7	48	CH	7.71, дт (8.0, 1.8)	138.2
49	CH ₃	0.81, д (6.8)	5.9	49	O=CN	-	179.0
50	CH ₃	0.96, д (6.8)	12.2	50	CH	3.40, дд (8.1, 4.6)	43.9
51	CH ₃	0.95, д (6.8)	11.8	51	CH ₂	1.33, м; 1.55, м	24.4
-	-	-	-	52	CH ₃	0.96, м	12.2
-	-	-	-	53	CH ₃	0.95, д (6.4)	6.5
-	-	-	-	54	CH ₃	0.97, м	12.2
-	-	-	-	55	CH ₃	0.95, м	11.8

Таблица 2.5 Спектры ¹H и ¹³C аддуктов олигомицина А **12a** и **12b**

Поз.	Тип	Аддукт олигомицина с <i>N</i> -бензилмалеимидом 12a		Аддукт олигомицина с <i>N</i> -бензилмалеимидом 12b	
		δ_{H} , мульт.(J в Hz)	δ_{C}	δ_{H} , мульт. (J в Hz)	δ_{C}
1	O=CO	-	167.6	-	167.3
2	CH	5.91, д (15.7)	123.1	5.85, д (15.7)	123.1
3	CH	6.89, дд (15.7, 8.9)	151.4	6.89, дд (15.7, 9.4)	151.5
4	CH	2.47, м	42.3	2.41, м	42.9
5	CH	3.86, дд (9.0, 1.8)	74.7	3.69, м	75.2
6	CH	2.71, дкв (7.4, 1.6)	47.5	2.79, дкв (7.0, 3.3)	47.5
7	C=O	-	218.6	-	218.9
8	CH	2.61, дкв (6.9, 2.0)	48.7	2.48, дкв (6.9, 2.2)	50.0
9	CH	4.01, дд (9.5, 1.7)	73.6	3.94, дд (8.9, 2.1)	74.3
10	CH	3.73 дкв (9.4, 6.8)	44.0	3.70, м	44.2
11	C=O	-	223.8	-	222.8
12	C-O	-	84.3	-	84.4
13	CH	3.93, д (1.0)	73.4	3.64, д (1.2)	74.2
14	CH	2.37, м	31.5	1.94, м	32.5
15	CH ₂	1.76, ддд (14.0, 11.7, 3.6); 1.88 ддд (14.0, 11.7, 3.6)	36.0	1.76, ддд (14.0, 13.0, 3.0); 1.86 ддд (14.0, 13.0, 3.0)	36.1
16	CH	2.50, м	34.9	2.46, м	35.4
17	CH	5.58, ддд (8.8, 4.4, 2.5)	135.1	5.76, дд (8.7, 2.8)	133.0
18	CH	5.83, ддд (8.8, 4.4, 3.0)	133.2	5.97, м	134.7
19	CH	2.17, м	41.4	2.20, м	41.4
20	CH	2.21, м	38.0	2.21, м	37.9
21	CH ₂	1.82, м; 1.93, м	25.8	1.63, м; 1.93, м	26.2
22	CH ₂	1.30, м; 1.48, м	27.0	1.13, м; 1.43, м	26.8
23	CH	3.89, м	71.2	3.81, м	71.3
24	CH	2.14, м	37.5	1.99, м	37.8
25	CH	5.12, дд (11.4, 4.8)	77.6	5.08, дд (11.4, 4.8)	77.4
26	CH	1.83, м	39.3	1.81, дкв (11.5, 6.5)	39.3
27	OCO	-	100.8	-	100.6
28	CH ₂	1.23, м; 1.96, м	27.1	1.23, м; 1.96, м	27.1
29	CH ₂	1.44, м; 2.19, м	27.9	1.45, м; 2.21, м	27.9
30	CH	1.58, м	31.9	1.58, м	32.0
31	CH	4.11, дт (10.1, 2.3)	68.8	4.11, дт (10.5, 2.7)	68.6
32	CH ₂	1.33, м; 1.58, м	43.7	1.32, м; 1.58, ддд (13.8, 10.6, 3.0)	43.7
33	CH	3.99, дквд (9.3, 6.1, 2.9)	65.3	3.99, дквд (9.3, 6.1, 2.9)	65.1
34	CH ₃	1.2, м	22.3	1.2, д (6.1)	25.3
35	CH ₃	1.18, д (6.6)	17.5	1.16, д (6.6)	17.8
36	CH ₃	1.09, д (7.4)	10.0	1.08, д (7.0)	10.8
37	CH ₃	1.08, д (6.9)	9.2	1.11, д (6.9)	9.4
38	CH ₃	1.14, д (6.8)	15.3	1.08, м	14.9
39	CH ₃	1.19, с	25.2	1.05, с	22.5

Поз.	Тип	Аддукт олигомицина с <i>N</i> -бензилмалеимидом 12a		Аддукт олигомицина с <i>N</i> -бензилмалеимидом 12b	
		δ_{H} , мульт.(J в Hz)	δ_{C}	δ_{H} , мульт. (J в Hz)	δ_{C}
40	CH ₃	1.06, д (6.8)	15.6	1.08, м	16.3
41	CH	3.23, дд (8.0, 6.6)	47.4	3.04, дд (7.8, 6.5)	47.4
42	O=CN	-	179.8	-	179.8
43	CH ₂	4.53, с	43.0	4.52, с	43.0
44	C	-	137.7	-	137.7
45, 49	CH	7.21, д (7.4)	129.0	7.20, д (7.4)	129.0
46, 48	CH	7.27, д (7.5, 7.4)	129.6	7.27, д (7.5, 7.4)	129.6
47	CH	7.23, м	128.7	7.23, м	128.7
50	O=CN	-	179.6	-	179.6
51	CH	3.39, дд (8.2, 4.9)	43.4	3.42, дд (8.1, 4.4)	43.4
52	CH ₂	1.22, м; 1.56, м	23.2	1.33, м; 1.98, м	23.2
53	CH ₃	0.96, м	11.9	1.02, т (7.2)	11.9
54	CH ₃	0.96, м	6.6	0.91, д (6.4)	6.6
55	CH ₃	0.97, м	12.2	0.93, д (6.5)	12.2
56	CH ₃	0.96, м	11.8	0.94, д (7.0)	11.8

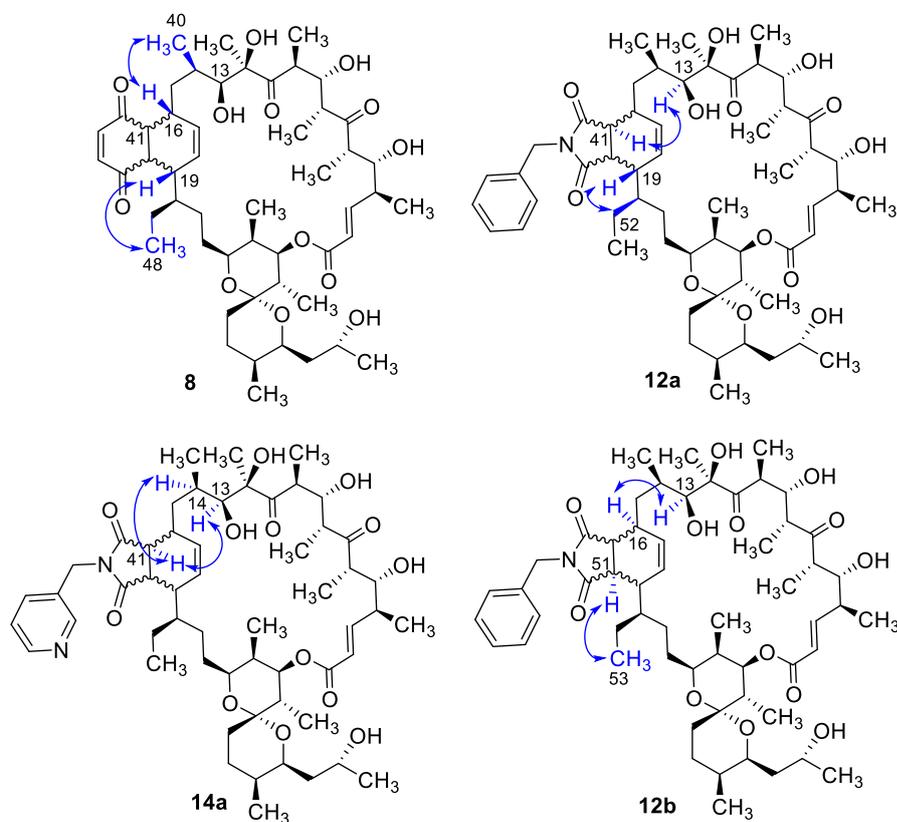


Рисунок 2.5 Корреляции, наблюдаемые на спектрах ^1H - ^1H ROESY аддуктов **8**, **12a**, **12b**, **14a** олигомицина А.

Как видно из рисунка 2.5, данных ЯМР-спектроскопии оказалось недостаточно для однозначного установления стереохимии полученных аддуктов. В связи с этим, возникла необходимость применения других физико-химических методов анализа строения соединений, в первую

очередь, рентгеноструктурного анализа (РСА). Однако получить кристаллы аддуктов **8**, **12a,b** и **14a**, пригодных для анализа методом РСА, не удалось ни одним из опробованных способов, в том числе описанных в литературе для кристаллизации природных антибиотиков семейства олигомицинов. Поэтому, дальнейшее установление строения производных **8**, **12a,b** и **14a** было осуществлено с помощью квантово-химических расчетов.

На первом этапе расчетов был проведен конформационный поиск методом МакроМодели (MacroModel [157], Mixed Monte-Carlo/Low-Mode Molecular Dynamics [158]) всех возможных структур аддуктов, в результате которого были найдены конформации с наименьшей энергией. Установление строения аддуктов проводилось сравнением значений торсионных углов и расстояний между пространственно сближенными атомами водорода, наблюдаемых по данным ЯМР спектроскопии, со значениями, предсказанными по Макромоделю для конформаций с наименьшей энергией. В случае малеимидов наблюдалось однозначное коррелирование только одной конформации с данными ЯМР спектроскопии (рис. 2.6), а в случае аддукта с бензохиноном **8** данным ЯМР соответствовали две расчетные конформации. Поэтому на втором этапе расчетов было проведено моделирование протекания реакций по модели Куртина-Хэммета (Curtin-Hammett model [163-166]). Моделирование реакции олигомицина с бензохиноном показало, что наименьшей энергией обладает одно переходное состояние, ведущее к продукту **8** (рис. 2.6) с теоретическим выходом 96%. Моделирование реакции олигомицина с бензилмалеимидом подтвердило наблюдаемое экспериментально образование только двух изомеров из четырех возможных, расчетное соотношение изомеров составило 4:1. Согласно моделям, переходные состояния для основных изомеров отвечают *эндо*-типу с сильными вторичными взаимодействиями π -систем диена и диенофила. Также во всех случаях наблюдается стабилизация переходных состояний за счет образования водородных связей между карбонильной группой диенофила и 33-гидроксильной группой боковой цепи олигомицина

(рис. 2.7). Эти два фактора определяют стереохимический результат реакции [4+2] присоединения диенофилов к олигомицину А.

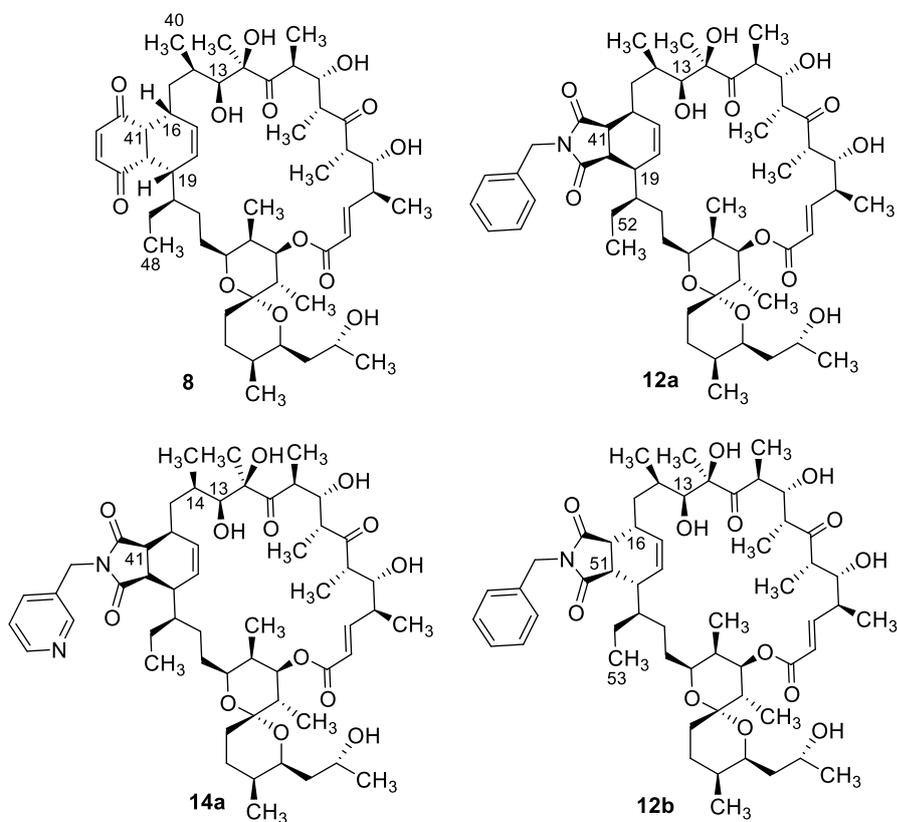


Рисунок 2.6 Структура производных олигомицина **8**, **12a,b**, **14a**

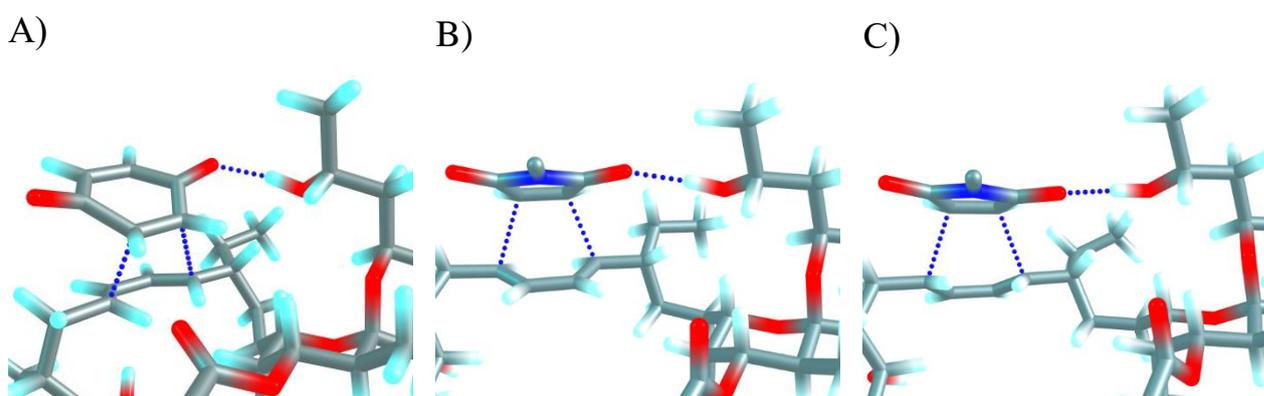


Рисунок 2.7 А) переходное состояние циклоприсоединения бензохинона, ведущее к продукту **8** В) переходное состояние циклоприсоединения малеимида, ведущее к основному изомеру **12a** С) переходное состояние циклоприсоединения малеимида, ведущее ко второму изомеру **12b**

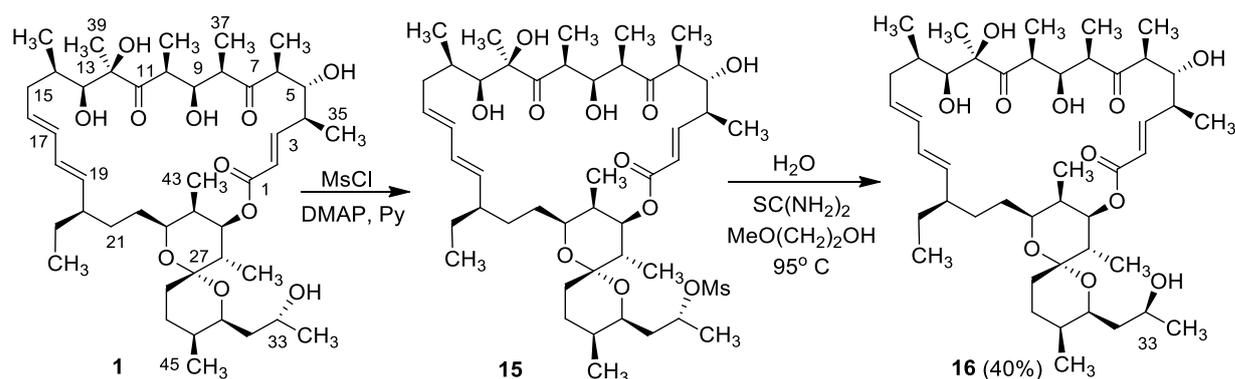
2.4. Модификация боковой гидроксипропильной цепи олигомицина А

Как известно, спирокетальный фрагмент и боковая гидроксипропильная цепь олигомицина играют важную роль в связывании антибиотика с с-субъединицей АТФ-синтазы [92, 93]. Соответственно, модификация 33-положения целесообразна для исследования связи структура-активность этого семейства антибиотиков. Кроме того, существуют противоречивые данные рентгеноструктурного анализа олигомицина А, свидетельствующие о наличии двойной связи в С32-С33 положении антибиотика [49, 50]. Анализ литературы показал, что 33 положение может быть региоселективно трансформировано с помощью активированного мезильного производного и без использования дополнительных стадий постановки и снятия защитных групп. Этот подход целесообразен для получения новых производных олигомицина с модифицированной гидроксипропильной цепью.

Ранее было описано получение производных олигомицина А, синтезированных нуклеофильным замещением мезильной группы на азидную и тиоцианатую группы, при этом происходило обращение конфигурации. Поскольку конфигурация хиральных центров может оказывать значительное влияние на биологическую активность соединений, интерес представляет изучение влияния конфигурации 33 положения олигомицина на его биологическую активность. С этой целью был найден способ синтеза (33*S*)-олигомицина А (**16**) с использованием в качестве исходного субстрата 33-*O*-мезилолигомицина А (**15**). Метод предполагает замещение активированную метансульфонатом гидроксильной группы производного олигомицина А **15** на гидроксильную с обращением конфигурации, при этом в качестве нуклеофила может выступать гидроксид-ион или вода в присутствии оснований. Олигомицин А довольно лабилен в основных условиях (см. гл. 2.5., п. 2.5.1.), поэтому такие способы, как нагревание в смеси воды и органического растворителя (этанол или

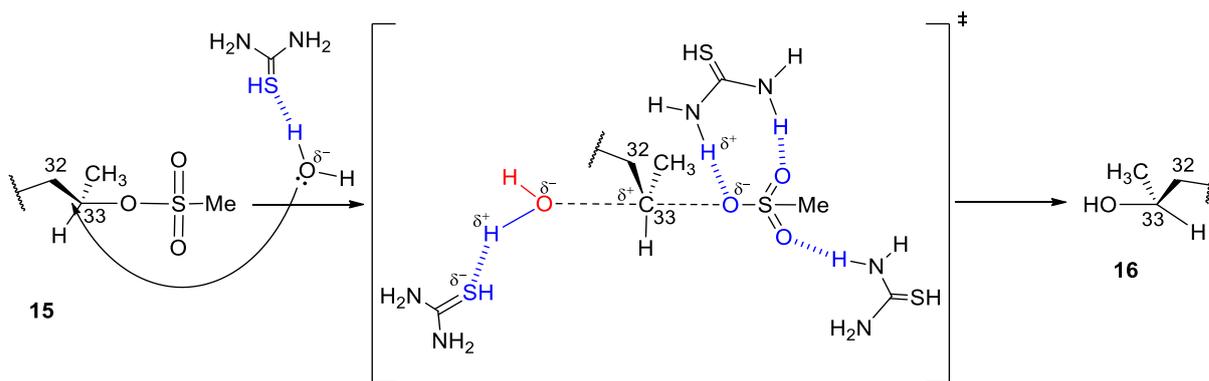
метилцеллозольв) с гидроксидом или карбонатом натрия, не пригодны для получения его эпимера, так как в этом случае образуется значительное количество побочных продуктов ретроальдольного распада макроцикла. В результате подбора подходящих условий было установлено, что карбамиды являются подходящими мягкими основаниями для катализа S_N2 замещения мезильной группы на ОН-группу. Так, нагревание 33-*O*-мезилолигомицина А в смеси вода-метилцеллозольв (1:1) при 95-100°C в присутствии тиомочевины или мочевины приводит к образованию (33*S*)-олигомицина А (**16**) (схема 2.11). Стоит отметить, что в отсутствие оснований при нагревании мезилолигомицина в смеси вода-метилцеллозольв происходит гидролиз метансульфогруппы, что дает исходный олигомицин А.

Схема 2.11



Замещение мезилата на гидроксил происходит по механизму S_N2 с вальденевским обращением конфигурации 33 углеродного атома. Вероятно, такое замещение становится возможным в результате активации уходящей группы ($-OMs$) тиокарбамидом или карбамидом, а также повышении нуклеофильности молекулы воды (схема 2.12).

Схема 2.12



Строение эпимера олигомицина А установлено при помощи методов масс-спектрометрии, элементного анализа и ЯМР-спектроскопии. По данным масс спектрометрии и элементного анализа молекулярная масса и брутто-формула (33*S*)-олигомицина А совпадают с данными для олигомицина. Однако, хроматографическая подвижность, как в методе тонкослойной хроматографии, так и ВЭЖХ, двух эпимеров заметно отличалась. Отличия в ^1H и ^{13}C ЯМР спектров между олигомицином А и его 33-стереоизомером заключались в смещении сигналов протона 33-гидроксильной группы и метинового протона 33СН, а также соседних атомов С30-С32. Соотнесения сигналов в ЯМР-спектрах (33*S*)-олигомицина А в сравнении с исходным антибиотиком представлены в таблице 2.6.

Таблица 2.6. Спектры ^1H и ^{13}C (33*S*)-олигомицина А (**16**) в сравнении с олигомицином А (**1**)

Поз.	Тип	(33 <i>S</i>)-Олигомицин А (16)		Олигомицин А (1)	
		δ_{H} , мульт.(J в Hz)	δ_{C}	δ_{H} , мульт. (J в Hz)	δ_{C}
1	O=CO	-	164.48	-	164.51
2	CH	5.864 дд (15.6, 0.4)	121.46	5.864 д (15.6, <0.4)	121.54
3	CH	6.740 дд (15.6, 9.5)	149.92	6.743 дд (15.6, 9.5)	149.80
4	CH	2.378 м	41.44	2.381 м	41.40
5	CH	3.780 ддд (8.3, 3.4, 2.4)	71.52	3.792 ддд (8.3, 3.3, 2.3)	71.49
6	CH	2.611 дкв (2.4, 7.2)	43.54	2.608 дкв (2.3, 7.2)	43.39
7	C=O	-	215.57	-	215.62
8	CH	2.378 м	47.54	2.381 м	47.50
9	CH	3.921 ддд (2.4, 7.4, 9.7)	72.08	3.930 м	72.09
10	CH	3.532 м	41.90	3.538 м	41.87
11	C=O	-	221.54	-	221.66
12	C-O	-	82.57	-	82.55
13	CH	3.532 дд (7.9, 1.0)	72.46	3.530 дд (7.8, 1.0)	72.44
14	CH	1.720 м	33.31	1.720 м	33.34

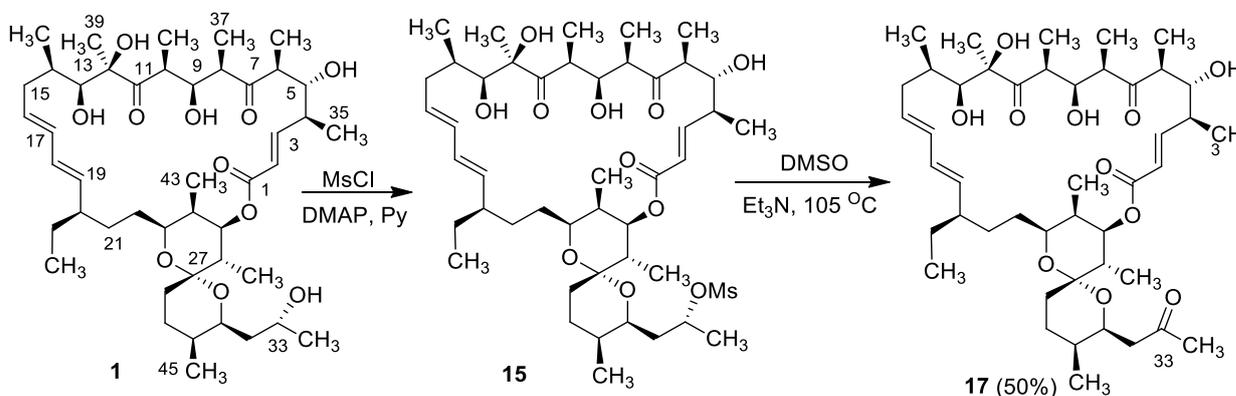
Поз.	Тип	(33S)-Олигомицин А (16)		Олигомицин А (1)	
		δ_{H} , мульт.(J в Hz)	δ_{C}	δ_{H} , мульт. (J в Hz)	δ_{C}
15	CH ₂	1.907, 2.033 м	38.03	1.907, 2.035 м	38.01
16	CH	5.393 ддд (10.9, 4.0, 14.8)	130.84	5.382 ддд (10.9, 4.0, 14.8)	130.655
17	CH	6.028 ддд (14.8, 1.0, 10.6)	131.885	6.029 ддд (14.8, 1.0, 10.5)	131.96
18	CH	5.934 дд (10.6, 15.0)	130.92	5.932 дд (10.5, 15.0)	130.80
19	CH	5.165 дд (15.0, 9.7)	135.915	5.153 дд (15.0, 9.7)	136.195
20	CH	1.870 м	44.92	1.840 м	45.24
21	CH ₂	1.330, 1.450 м	30.95	1.300, 1.600 м	30.59
22	CH ₂	1.059, 1.522 м	30.02	0.977, 1.510 м	30.47
23	CH	3.615 дт (10.0, 2.3)	68.06	3.765 м	67.72
24	CH	1.915 м	35.51	1.907 м	35.595
25	CH	4.835 дд (4.9, 11.3)	74.88	4.851 дд (5.0, 11.3)	75.13
26	CH	1.703 дкв (11.3, 6.7)	37.18	1.700 дкв (11.3, 6.6)	37.21
27	OCO	-	98.56	-	98.30
28	CH ₂	1.157 м, 1.824 дт (4.5, 13.6)	25.46	1.141 м, 1.811 дт (4.5, 13.7)	25.46
29	CH ₂	1.348, 1.957 м	25.97	1.355, 1.977 м	26.17
30	CH	1.608 м	29.00	1.510 м	29.705
31	CH	3.756 ддд (7.9, 5.4, 2.2)	68.11	3.917 м	66.85
32	CH₂	1.285, 1.540 м	42.565	1.232, 1.383 ддд (13.4, 9.8, 3.4)	42.53
33	CH	3.708 м	63.25	3.740 м	62.51
34	CH ₃	1.092 д (6.1)	23.70	1.084 д (6.2)	24.93
35	CH ₃	1.005 д (6.8)	17.38	1.006 д (6.7)	17.40
36	CH ₃	0.896 д (7.2)	9.995	0.893 д (7.2)	9.893
37	CH ₃	0.917 д (7.0)	8.023	0.911 д (6.8)	7.975
38	CH ₃	0.991 д (6.8)	14.83	0.994 д (6.9)	14.865
39	CH ₃	0.922 с	22.055	0.923 с	22.065
40	CH ₃	0.912 д (6.9)	14.81	0.911 д (6.8)	14.79
41	CH ₂	1.230, 1.330 м	28.10	1.223, 1.320 м	28.24
42	CH ₃	0.793 т (7.4)	11.915	0.794 т (7.4)	11.97
43	CH ₃	0.822 д (7.0)	6.043	0.822 д (7.0)	6.138
44	CH ₃	0.875 д (6.6)	11.525	0.870 д (6.6)	11.54
45	CH ₃	0.837 д (7.0)	10.81	0.837 д (7.0)	11.02
ОН-группы, δ_{H}					
5C	ОН	4.412 д (3.4)	-	4.400 д (3.3)	-
9C	ОН	4.804 д (7.4)	-	4.818 д (7.4)	-
12C	ОН	4.965 с	-	4.965 с	-
13C	ОН	4.189 д (7.9)	-	4.192 д (7.8)	-
33C	ОН	4.337 д (4.4)	-	4.291 д (5.3)	-

Кроме того, в спектрах NOESY наблюдались отличия в корреляции пространственно сближенных протонов: в случае (33S)-олигомицина А в спектре наблюдались корреляционные пики 31-СН с С34-метильной группой, тогда как в спектре природного антибиотика данного кросс-пика не наблюдалось.

Другим актуальным направлением модификации 33 положения антибиотика, намеченного в результате анализа литературы для подтверждения его общепринятой структуры, подвергнутой пересмотру работами R. Palmer [49, 50], является получение 33-дегидроолигомицина А. Исследование одностадийного окисления олигомицина А под действием ряда

окислителей (триоксида хрома (CrO_3) и его производных, реагента Десс-Мартина, окисление по Сверну (под действием ДМСО и оксалилхлорида в присутствии оснований) показало, что данные способы малоэффективны и приводят к трудно разделяемой смеси продуктов окисления и деградации антибиотика. Поэтому, для направленного окисления 33-гидроксильной группы олигомицина А был снова использован 33-*O*-мезилолигомицин А. Окисление по Корнблюму 33-*O*-мезилолигомицина А (**15**) действием диметилсульфоксида в присутствии триэтиламина при нагревании дает 33-дегидроолигомицин А (**17**) с хорошим выходом (50%) (схема 2.13).

Схема 2.13



Полученное производное было более гидрофобно, чем исходный антибиотик по результатам ТСХ и ВЭЖХ анализов. В масс-спектре дегидроолигомицина А **17** зарегистрирован положительный ион m/z 811.4988 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, соответствующий молекулярной формуле $\text{C}_{45}\text{H}_{72}\text{O}_{11}$. В ^{13}C ЯМР спектре 33-дегидроолигомицина зарегистрирован новый сигнал кето-группы в С33 положении ($\delta_{\text{C}}=207.70$ м.д.) (таблица 2.7).

Таблица 2.7. Спектры ^1H и ^{13}C 33-дегидроолигомицина А (**17**) в сравнении с олигомицином А (**1**)

Поз.	Тип	Олигомицин А (1)		33-дегидроолигомицин А (17)	
		δ_{C}	δ_{H} , мулт. (J в Hz)	δ_{C}	δ_{H} , мулт. (J в Hz)
1	O=CO	165.0	—	165.10	—
2	CH	122.6	5.80, дд (15.6, 0.7)	122.72	5.800 д (15.6, <0.4)
3	CH	148.3	6.62, дд (15.6, 10.1)	148.40	6.617 дд (15.6, 10.1)

Поз.	Тип	Олигомицин А (1)		33-дегидроолигомицин А (17)	
		δ_C	δ_H , мульт. (J в Hz)	δ_C	δ_H , мульт. (J в Hz)
4	CH	40.1	2.36, ткв (10.0, 6.6)	40.08	2.372 ткв (6.6, 10.1)
5	CH	72.9	3.75, дд (10.1, 1.3)	73.00	3.761 дд (10.1, 0.95)
6	CH	46.4	2.70, дкв (1.3, 7.4)	46.74	2.697 дкв (7.3, 0.95)
7	C=O	219.9	–	219.81	–
8	CH	45.6	2.74, дкв (3.0, 7.1)	45.71	2.749 дкв (7.0, 3.0)
9	CH	72.6	3.94, дд (8.6, 3.1)	72.58	3.930 дд (8.5, 3.0)
10	CH	41.9	3.59, дкв (8.6, 6.9)	41.88	3.577 дкв (8.5, 6.9)
11	C=O	220.2	–	220.39	–
12	C-O	82.9	–	83.02	–
13	CH	72.2	3.89, д (1.9)	72.22	3.948 д (~1.5)
14	CH	33.4	1.88, м	33.50	1.90, м
15	CH ₂	38.3	2.17, дд; 1.98дт	38.49	2.188, м; 1.977, м
16	CH	129.3	5.42, ддд (14.8, 10.5, 4.1)	129.26	5.447 ддд (14.7, 10.7, 3.9)
17	CH	132.3	6.00, ддд (14.7, 10.4, 1.4)	132.50	6.015 ддд (14.7, 10.5, 1.5)
18	CH	130.2	5.90, дд (14.9, 10.5)	130.35	5.943 дд (14.9, 10.5)
19	CH	137.7	5.21, дд (14.8, 9.6)	137.97	5.232 дд (14.9, 9.7)
20	CH	45.9	1.85, м	45.73	1.91, м
21	CH ₂	31.4	1.52, м; 1.35, м	31.22	1.615, м; 1.38, м
22	CH ₂	30.9	1.59, ддд	30.83	1.58, м; 1.055, м
23	CH	68.9	3.78, ддд (9.8, 2.7, 2.4)	68.85	3.707 ддд (9.3, 2.7, 2.0)
24	CH	35.7	2.11, ддкв (5.0, 2.2, 6.9)	35.87	2.040 ддкв (7.0, 5.0, 2.0)
25	CH	76.1	4.91, дд (11.4, 5.0)	75.94	4.890 дд (11.4, 5.0)
26	CH	37.6	1.78, дкв (11.4, 6.6)	37.65	1.766 дкв (11.4, 6.7)
27	OSO	99.1	–	99.33	–
28	CH ₂	25.9	1.90, м; 1.23, м	25.70	1.90, м; 1.23, м
29	CH ₂	26.4	2.07, м; 1.38, м	26.26	2.11 дт (13.3, 4.4); 1.40, м
30	CH	30.4	1.54, м	29.74	1.63, м
31	CH	67.1	3.96, дт (10.3, 2.5)	68.10	4.212 ддд (9.15, 4.0, 2.6)
32	CH ₂	42.4	1.55, м; 1.25, м	46.63	2.684 дд (15.0, 9.15); 2.207 дд (15.0, 4.0)
33	CH	64.6	4.00, ддкв (9.2, 3.1, 6.2)	-	-
33	C=O	-	-	207.70	-
34	CH₃	24.6	1.21, д (6.2)	31.97	2.200 с
35	CH ₃	17.8	1.16, д (6.6)	17.87	1.164 д (6.6)
36	CH ₃	8.2	1.05, д (7.3)	8.28	1.054 д (7.3)
37	CH ₃	9.2	1.01, д (7.0)	9.39	1.022 д (7.0)
38	CH ₃	14.0	1.09, д (6.9)	13.99	1.088 д (6.9)
39	CH ₃	20.9	1.11, с	20.95	1.12, с
40	CH ₃	14.4	0.98, д (6.6)	14.48	0.985 д (6.7)
41	CH ₂	28.4	1.35, м; 1.25, м	28.60	1.455, м; 1.282, м
42	CH ₃	12.0	0.80, т (7.4)	12.06	0.839 т (7.4)
43	CH ₃	6.0	0.82, д (6.9)	6.03	0.813 д (7.0)
44	CH ₃	11.7	0.95, д (6.6)	11.81	0.948 д (6.7)
45	CH ₃	11.1	0.88, д (6.9)	11.35	0.908 д (7.0)

Мультиплетность сигналов протонов соседней метильной группы 34-CH₃ в ¹H спектре представлена синглетным пиком ($\delta_H=2.20$, $\delta_C=31.97$ м.д.), в отличие от исходного олигомицина А (дублет). Данные ЯМР-спектроскопии свидетельствуют о том, что 33-дегидроолигомицин А в растворе CDCl₃ имеет

В масс-спектре соединения **18** наблюдался молекулярный ион с m/z 875.4254 $[M+Na]^+$, соответствующий расчетному значению 875.4279 ($C_{45}H_{73}O_{10}BrNa^+$). В спектрах 1H и ^{13}C ЯМР 33-бромо-33-дезоксиполимицина А (**18**) наблюдается удвоение многих сигналов, что свидетельствует о том, что полученный продукт представляет собой смесь двух соединений близкого строения. При этом в спектре 1H ЯМР сигналы в каждой паре имеют одинаковые мультиплетность и интенсивность, а в спектре ^{13}C ЯМР дублируются все линии, кроме одной, соответствующей C33 углероду. Для большей части диастереомерной смеси оказалось возможным провести отнесение 1H и ^{13}C ЯМР углеродных сигналов для обоих изомеров соединения. Отнесение сигналов в ЯМР-спектрах 33-бромо-33-дезоксиполимицина А (**18**) выполнено на основании анализа двумерных спектров COSY (1H , 1H), HSQC (1H , ^{13}C), HMBC (1H , ^{13}C) и ROESY (1H , 1H) и представлено в таблице 2.8 для двух диастереомеров 33-бромо-33-дезоксиполимицина А (**18**). Некоторые сигналы не были отнесены к определенному изомеру вследствие низкого разрешения между сигналами (менее 1 Гц), в таблице 2.8 они приведены для двух изомеров в одном объединенном столбце.

Таблица 2.8. Спектры 1H и ^{13}C 33-дезоксиполимицина А (**18**)

Поз.	Тип	33-дезоксиполимицин А (18), смесь изомеров			
		δ_H , мульт. (J в Hz)		δ_C	
1	O=CO	-		165.118; 165.138	
2	CH	5.812, д		122.711; 122.734	
3	CH	6.626, дд		148.45	
4	CH	2.382, м; 2.388, м		40.153; 40.168	
5	CH	3.764, дд; 3.770, дд		72.964; 72.982	
6	CH	2.711, дкв; 2.720, дкв		46.545; 46.612	
7	C=O	-		220.231; 220.250	
8	CH	2.762, дкв		45.713; 45.755	
9	CH	3.945, дд; 3.951, дд		72.646; 72.670	
10	CH	3.587, дкв; 3.592, дкв		41.945; 41.950	
11	C=O	-		219.883; 219.957	
12	C-O	-		82.994; 83.021	
13	CH	3.928, д	3.936 д	72.398	72.268
14	CH	1.893, м		33.511; 33.568	
15	CH ₂	1.982, м; 2.181 м	1.977, м; 2.176, м	38.444; 38.483	
16	CH	5.445 ддд	5.433 ддд	129.389	129.183

Поз.	Тип	33-дезоксиг-33-бромоолигомицин А (18), смесь изомеров			
		δ_H , мульт. (J в Hz)		δ_C	
17	CH	6.015 ддд	6.007 ддд	132.433	132.582
18	CH	5.922 дд	5.930 дд	130.346	130.036
19	CH	5.231 дд	5.288 дд	137.737	138.150
20	CH	1.847, м	1.892, м	46.058	45.570
21	CH ₂	1.408, м; 1.51, м	1.408, м; 1.66, м	31.80	30.98
22	CH ₂	1.058, м; 1.60, м	1.100, м; 1.62, м	30.897	30.010
23	CH	3.71 дт	3.83 ддд	69.247	69.128
24	CH	2.115, м	2.143, м	35.785	35.297
25	CH	4.948 дд	4.915 дд	76.043	76.212
26	CH	1.785, м	1.80, м	37.640	37.759
27	OSO	-	-	99.137	99.436
28	CH ₂	1.24, м; 1.895, м	1.23, м; 1.895 м	26.037	26.000
29	CH ₂	1.41, м; 2.09, м	1.39, м; 2.13, м	26.26	26.31
30	CH	1.682, м	1.594, м	28.190	30.273
31	CH	3.915 дт	3.965 дт	69.200	69.084
32	CH ₂	1.76, м; 2.000, м	1.67, м; 1.83, м	43.83	45.58
33	CH	4.09 ддкв	4.32 ддкв	46.98	49.45
34	C=O	1.743 д	1.746 д	26.973	27.685
35	CH ₃	1.165 д		17.933; 17.960	
36	CH ₃	1.054 д; 1.056 д		8.296; 8.320	
37	CH ₃	1.019 д		9.224; 9.343	
38	CH ₃	1.090 д; 1.097 д		14.018; 14.195	
39	CH ₃	1.119 с		20.982; 21.045	
40	CH ₃	0.983 д		14.482; 14.487	
41	CH ₂	1.248, м; 1.356, м	1.277, м; 1.363, м	28.466	28.027
42	CH ₃	0.803 т	0.807 т	12.091	12.204
43	CH ₃	0.826 д	0.813 д	6.055	5.835
44	CH ₃	0.951 д	0.939 д	11.816	11.727
45	CH ₃	0.870 д	0.883 д	10.794	11.503

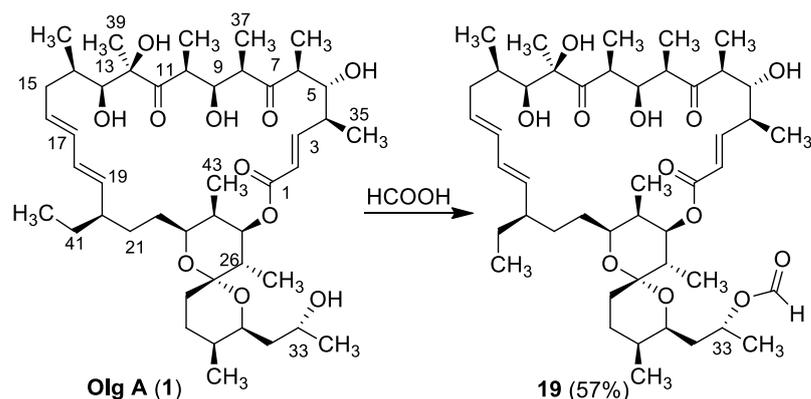
Данные ЯМР свидетельствуют о том, что образец бромоолигомицина **18** не является смесью геометрических изомеров, т.к. основные различия химических сдвигов наблюдаются в положении 33, что объясняется различной конфигурацией соответствующего хирального центра.

2.5. Разработка методов селективного ацилирования гидроксильных групп олигомицина А

Согласно проведенному анализу литературы, методам ацилирования олигомицинов посвящено только две работы, выполненные в конце прошлого века. Так, в статье L. Szilágyi с соавт. описаны два полиацетильных производных олигомицина, полученных обработкой антибиотика уксусным ангидридом в пиридине [125]. Группой японских исследователей были запатентованы 12 ацильных производных 44-гомоолигомицина В [124]. Недостатками описанных методов являются низкая региоселективность и использование многостадийной стратегии защитных групп, что определяет низкую эффективность синтеза целевых соединений.

O-Ацильные производные биологически активных соединений зачастую рассматриваются в качестве пролекарств с улучшенными фармакологическими свойствами [167]. Вследствие того, что раскрытие эпоксидного цикла 16,17-эпксиолигомицина (**2**) в муравьиной кислоте сопровождается формилированием гидроксигруппы в 33 положении, в первую очередь было исследовано взаимодействие олигомицина **1** с НСООН. Установлено, что при обработке антибиотика **1** муравьиной кислотой (98%) при комнатной температуре в течение 2 ч происходит преимущественно формилирование ОН-группы в 33 положении и основным продуктом в этих условиях является ранее неизвестное производное олигомицина – 33-*O*-формилолигомицин А (**19**, схема 2.15). Следует отметить, что контроль протекания реакции методом ТСХ показывает образование в этих условиях незначительного количества примесей продуктов полиформилирования.

Схема 2.15



Строение соединения **19** подтверждено методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

Для 33-*O*-формилолигомицина **19** зарегистрированы спектры ЯМР ^1H и ^{13}C , а также корреляционные спектры ЯМР ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC. В спектрах ^1H , ^{13}C производного **19** в 33 положении наблюдается смещение сигналов в сторону слабого поля ($\delta_{\text{C}33}=69.0$, $\delta_{\text{H}33}=5.10$ м.д.) по сравнению с исходным антибиотиком ($\delta_{\text{C}33}=64.6$, $\delta_{\text{H}33}=4.00$ м.д.), а также появление сигналов в области слабого поля, соответствующих формильной группе ($\delta_{\text{C}46}=160.7$, $\delta_{\text{H}46}=8.05$ м.д.). Отнесение химических сдвигов на основании анализа спектров ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, приведены в табл. 2.9.

Таблица 2.9. Спектры ^1H и ^{13}C 33-*O*-формилолигомицина А (**19**)

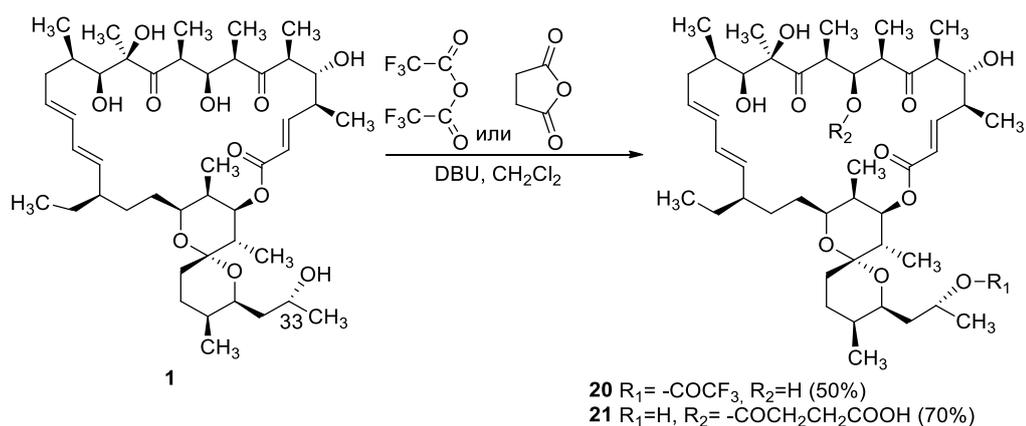
Поз.	Олигомицин А (1)			33- <i>O</i> -формилолигомицин (19)		
	Тип	δ_{C} , ppm	δ_{H} , ppm, мульт. (J в Hz)	δ_{C} , ppm	δ_{H} , ppm, мульт. (J в Hz)	
1	O=CO	165.0	—	165.0	-	
2	CH	122.6	5.80, дд (15.6, 0.7)	122.8	5.85, д (15.6)	
3	CH	148.3	6.62, дд (15.6, 10.1)	148.3	6.65, дд (15.7, 9.9)	
4	CH	40.1	2.36, ткв (10.0, 6.6)	40.0	2.41, ткв (9.9, 6.5)	
5	CH	72.9	3.75, дд (10.1, 1.3)	72.6	3.80, дд (10.4, 1.0)	
6	CH	46.4	2.70, дкв (1.3, 7.4)	46.7	2.75, дкв (7.3, 0.9)	
7	C=O	220.2 ^{a)}	—	220.4	—	
8	CH	41.9 ^{b)}	3.59, дкв (8.6, 6.9)	45.7	2.80, дкв (7.0, 3.0)	
9	CH	72.6	3.94, дд (8.6, 3.1)	72.2	3.97, дд (3.0, 1.4)	
10	CH	45.6 ^{b)}	2.74, дкв (3.0, 7.1)	41.8	3.62, дкв (7.0, 1.4)	
11	C=O	219.9 ^{a)}	—	219.8	—	
12	C-O	82.9	—	83.0	—	
13	CH	72.2	3.89, д (1.9)	73.0	3.79, м	

Поз.	Олигомицин А (1)			33- <i>O</i> -формилолигомицин (19)	
	Тип	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (<i>J</i> в Hz)	δ_c , ppm	δ_H , ppm, мульт. (<i>J</i> в Hz)
14	CH	33.4	1.88, м	33.5	1.92, м
15	CH ₂	38.3	2.17, бд; 1.98 дт	38.5	2.21, м; 2.01, м
16	CH	129.3	5.42, ддд (14.8, 10.5, 4.1)	129.5	5.48, ддд (15.2, 10.7, 4.0)
17	CH	132.3	6.00, ддд (14.7, 10.4, 1.4)	132.4	6.04, ддд (14.6, 10.5, 1.6)
18	CH	130.2	5.90, дд (14.9, 10.5)	130.5	5.96, дд (14.8, 10.5)
19	CH	137.7	5.21, дд (14.8, 9.6)	137.5	5.60, дд (15.0, 9.7)
20	CH	45.9	1.85, м	45.8	1.89, м
21	CH ₂	31.4	1.52, м; 1.35, м	31.6	1.40, м; 1.25, м
22	CH ₂	30.9	1.59, ддд	30.6	1.40, м; 1.25, м
23	CH	68.9	3.78, ддд (9.8, 2.7, 2.4)	69.1	3.66, ддд (10.0, 3.7, 2.1)
24	CH	35.7	2.11, ддкв (5.0, 2.2, 6.9)	35.7	2.13, м
25	CH	76.1	4.91, дд (11.4, 5.0)	75.9	4.98, дд (11.4, 5.0)
26	CH	37.6	1.78, дкв (11.4, 6.6)	37.8	1.81, дкв (11.4, 6.5)
27	OSO	99.1	–	99.3	–
28	CH ₂	25.9	1.90, м; 1.23, м	26.0	1.91, м; 1.24, м
29	CH ₂	26.4	2.07, м; 1.38, м	26.4	2.09, м; 1.41, м
30	CH	30.4	1.54, м	30.2	1.59, м
31	CH	67.1	3.96, дт (10.3, 2.5)	67.6	3.78, м
32	CH ₂	42.4	1.55, м; 1.25 м	39.8	1.67, м; 1.60, м
33	CH	64.6	4.00, ддкв (9.2, 3.1, 6.2)	69.0	5.10, квд (6.4, 1.4)
34	CH ₃	24.6	1.21, д (6.2)	21.0	1.35, д (6.4)
35	CH ₃	17.8	1.16, д (6.6)	17.9	1.20, д (6.5)
36	CH ₃	8.2	1.05, д (7.3)	8.3	1.09, д (7.3)
37	CH ₃	9.2	1.01, д (7.0)	9.4	1.05, д (7.0)
38	CH ₃	14.0	1.09, д (6.9)	14.0	1.12, д (7.0)
39	CH ₃	20.9	1.11, с	21.0	1.15, с
40	CH ₃	14.4	0.98, д (6.6)	14.5	1.02, д (6.6)
41	CH ₂	28.4	1.35, м; 1.25, м	28.4	1.32, м; 1.25, м
42	CH ₃	12.0	0.80, т (7.4)	11.8	0.83, т (7.4)
43	CH ₃	6.0	0.82, д (6.9)	6.0	0.94, д (7.2)
44	CH ₃	11.7	0.95, д (6.6)	11.8	0.98, д (6.5)
45	CH ₃	11.1	0.88, д (6.9)	11.0	0.91, д (6.9)
46	HCOO(33)	-	-	160.7	8.05, с

Апробация описанных методов [125, 128] ацилирования макролидных антибиотиков показала, что для олигомицина А ни один из методов не является универсальным и эффективным: в большинстве случаев выход целевого продукта очень низок в следствие либо низкой конверсии олигомицина, либо полиацилирования. Так, например, взаимодействие олигомицина А с трифторуксусным ангидридом в дихлорметане или пиридине при катализе диметиламинопиридином протекает при комнатной температуре с очень низкой скоростью (реакция продолжается около 14 дней), а конверсия исходного вещества составляет приблизительно 60% (анализ методом ТСХ хлороформ:метанол 10:0.5). Взаимодействие

олигомицина А с янтарным ангидридом в аналогичных условиях протекает неселективно – образуются различные изомеры моноацилирования, а также продукты полиацилирования. Стратегия с использованием защитных групп также малоприменима для олигомицина А в связи с большой потерей выхода целевого продукта за несколько стадий. В связи с этим, был предпринят поиск иных условий проведения реакций. Оказалось, что использование диазобициклоундецена (DBU) в качестве основания позволяет всего за несколько часов при комнатной температуре провести региоселективное ацилирование олигомицина А ангидридами органических кислот. Так, взаимодействие антибиотика с трифторуксусным ангидридом в этих условиях приводит к 33-*O*-трифторацетилолигомицину А (**20**) (схема 2.16); при этом происходит полная конверсия исходного антибиотика. Реакция олигомицина с янтарным ангидридом в присутствии DBU также протекает с высокой региоселективностью, однако в этом случае основным продуктом (70%) реакции является 9-*O*-сукцинилолигомицин А (**21**) (схема 2.16). В обоих случаях индивидуальные доли примесей, присутствующих в реакционных массах, не превышают 5-8% (анализ методом ВЭЖХ).

Схема 2.16



Строение производных **20** и **21** доказано методами масс-спектрометрии высокого разрешения и ЯМР-спектроскопии (ЯМР ¹H, ¹³C, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-

^{13}C НМВС, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY). Отнесение химических сдвигов на основании анализа спектров приведены в табл. 2.10.

Таблица 2.10. Спектры ^1H и ^{13}C 33-*O*-трифторацетилолигомицина А (**20**) и 9-*O*-сукцинилолигомицина А (**21**)

Поз.	33- <i>O</i> -трифторацетилолигомицин А (20)			9- <i>O</i> -сукцинилолигомицин А (21)		
	Тип	δ_{C}	δ_{H} , мульт (<i>J</i> в Hz)	Тип	δ_{C}	δ_{H} , мульт (<i>J</i> в Hz)
1	O=CO	166.9	–	O=CO	167.3	–
2	CH	123.6	5.88, д (15.6)	CH	123.6	5.86, д (15.6)
3	CH	150.9	6.80, дд (15.6, 9.9)	CH	151.1	6.87, дд (15.6, 9.9)
4	CH	42.8	2.44, ддкв (9.9, 9.5, 7.0)	CH	42.5	2.37, ддкв (9.9, 9.5, 6.6)
5	CH	74.3	3.85, м	CH	74.3	3.74, дд (9.5, 1.3)
6	CH	46.0	2.79, дкв (7.2, 1.7)	CH	46.7	2.8, квд (7.3, 1.2)
7	O=C	218.9	–	O=C	217.7	–
8	CH	49.2	2.60, квд (6.8, 2.8)	CH	46.5	2.77, квд (6.8, 2.1)
9	CH	74.4	4.06, дд (9.5, 2.8)	CH	75.7	5.41, дд (10.3, 2.0)
10	CH	43.9	3.73, дкв (9.6, 7.0)	CH	41.7	3.95, м
11	O=C	223.1	–	O=C	221.8	–
12	C-O	84.4	–	C-O	84.4	–
13	CH	74.6	3.75, д (1.3)	CH	74.3	3.74, д (1.7)
14	CH	35.3	1.86, м	CH	35.4	1.86, м
15	CH ₂	39.8	2.12, м; 2.05, м	CH ₂	39.7	2.12, м; 2.05, м
16	CH	131.8	5.46, ддд (14.9, 10.8, 4.0)	CH	131.4	5.46, ддд (15.0, 10.9, 4.0)
17	CH	134.0	6.13, ддд (14.9, 10.8, 0.8)	CH	134.2	6.12, ддд (15.0, 10.5, 1.7)
18	CH	133.1	6.01, дд (15.0, 10.5)	CH	132.7	6.01, дд (14.9, 10.5)
19	CH	137.7	5.19, дд (15.0, 9.7)	CH	138.3	5.20, дд (14.9, 9.8)
20	CH	47.4	1.88, м	CH	47.7	1.89, м
21	CH ₂	33.0	1.42, м; 1.65, м	CH ₂	32.9	1.42, м; 1.65, м
22	CH ₂	32.1	1.06, м; 1.65, м	CH ₂	32.6	1.04, м; 1.66, м
23	CH	70.3	3.61, дт (10.5, 2.7)	CH	70.1	3.86, ддд (10.0, 2.6, 2.3)
24	CH	37.5	2.06, м	CH	37.7	2.04, м
25	CH	77.4	4.98, дд (11.4, 5.0)	CH	78.0	4.96, дд (11.3, 4.9)
26	CH	39.1	1.80, м	CH	39.0	1.83, м
27	OCO	100.7	–	OCO	100.6	–
28	CH ₂	27.1	1.20, м; 1.96, тд (13.7, 4.4)	CH ₂	27.1	1.19, м; 1.95, тд (13.6, 4.2)
29	CH ₂	27.5	1.46, м; 2.13, м	CH ₂	27.8	1.44, м; 2.13, м
30	CH	31.6	1.64, м	CH	31.9	1.56, м
31	CH	69.3	3.84, м	CH	68.7	4.04, дт (10.0, 2.7)
32	CH ₂	40.7	1.81, м	CH ₂	43.8	1.34, м; 1.56, м
33	CH	76.3	5.29, дкв (12.2, 6.2)	CH	65.3	3.97, м
34	CH ₃	21.1	1.43, д (6.2)	CH ₃	25.2	1.21, д (6.2)
35	CH ₃	18.5	1.16, д (7.0)	CH ₃	18.8	1.15, д (6.6)
36	CH ₃	9.7	1.03, д (7.2)	CH ₃	9.1	1.01, д (7.2)
37	CH ₃	9.0	1.05, д (6.8)	CH ₃	9.5	1.08, д (6.8)
38	CH ₃	15.4	1.15, д (7.0)	CH ₃	15.0	1.04, д (6.8)
39	CH ₃	22.7	1.09, с	CH ₃	22.6	1.11, с
40	CH ₃	15.3	1.02, д (6.6)	CH ₃	15.3	1.02, д (6.6)
41	CH ₂	29.8	1.25, м; 1.41, м	CH ₂	30.0	1.28, м; 1.43, м
42	CH ₃	12.6	0.85, т (7.4)	CH ₃	12.7	0.87, т (7.4)
43	CH ₃	7.4	0.91, д (7.0)	CH ₃	7.3	0.92, д (7.2)
44	CH ₃	12.3	0.97, д (6.6)	CH ₃	12.4	0.98, д (6.6)

Поз.	33- <i>O</i> -трифторацетилолигомицин А (20)			9- <i>O</i> -сукцинилолигомицин А (21)		
	Тип	δ_C	δ_H , мульт (<i>J</i> в Hz)	Тип	δ_C	δ_H , мульт (<i>J</i> в Hz)
45	CH ₃	11.7	0.97, д (7.0)	CH ₃	11.7	0.94, д (7.2)
46	O=CO	158.4, кв (39.3)	–	O=CO	173.9	–
47	CF ₃	116.2, кв (285.5)	–	CH ₂	29.8	2.58, т (2.1)
48	-	-	-	CH ₂	30.3	2.58, т (2.1)
49	-	-	-	O=CO	175.8	–

В ¹H спектре трифторацетилолигомицина **20** наблюдается смещение сигнала протона в 33 положении в слабое поле (5.29 м.д.) относительно H-33 олигомицина А (3.96 м.д.), что вызвано взаимодействием со сложноэфирной группой C46 трифторацетильного остатка. В случае сукцинилолигомицина А **21**, сигнал 33-Н не изменяется, тогда как сигнал протона в положении 9 оказался смещен в слабое поле (5.41 м.д.) относительно H-9 олигомицина А (4.06 м.д.). Кроме того, наличие корреляционных кросс-пиков в спектре ЯМР ¹H-¹H ROESY соединения **21** между протонами H38-H47, H37-H47 (рис. 2.8) позволяет однозначно установить структуру соединения **21** как 9-*O*-сукцинилолигомицин А.

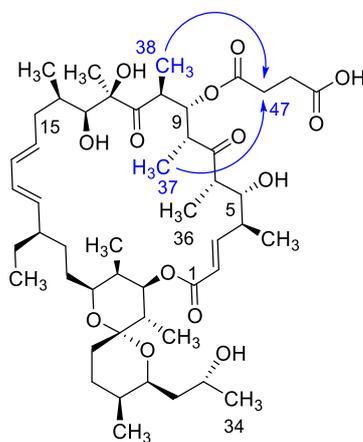
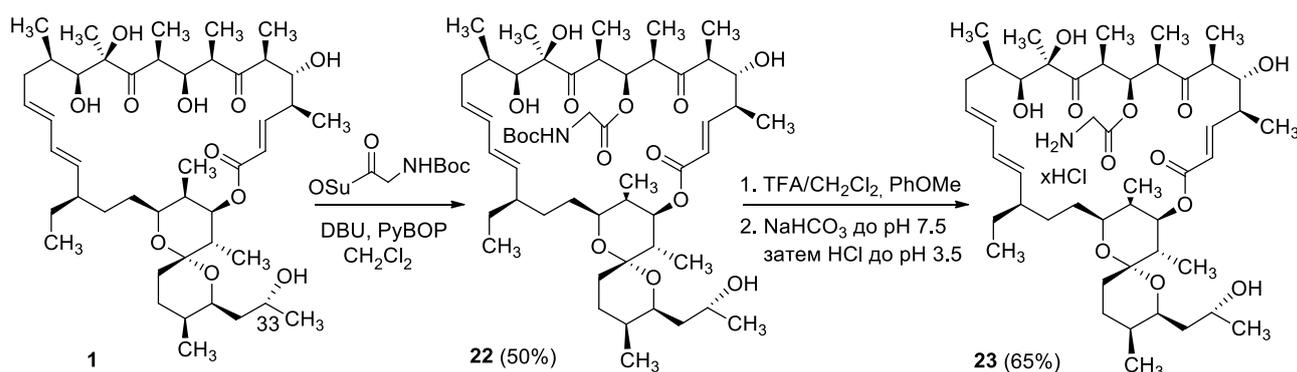


Рисунок 2.8 Корреляции, наблюдаемые в ¹H-¹H ROESY спектре сукцинилолигомицина А **21**.

Для введения в молекулу олигомицина А остатков аминокислот разработан другой метод ацилирования. Оказалось, что олигомицин А не вступает в реакцию с Вос-аминокислотами со свободной карбоксильной группой в присутствии бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфония

гексафторфосфата (PyBOP) и оснований. Целевую конденсацию удалось провести в безводном хлористом метиле при использовании активированных сукцинимидным эфиром аминокислот и DBU в качестве катализатора. Однако в данных условиях конверсия исходного антибиотика составляет не более 70%; его можно выделить из реакционной смеси методом колоночной хроматографии и использовать повторно. Конверсию олигомицина также возможно повысить добавлением в реакционную смесь конденсирующего агента PyBOP. Как и в случае ацилирования янтарным ангидридом, конденсация протекает преимущественно по С-9 гидроксильной группе макроцикла. Этим способом синтезировано производное, содержащее остаток аминокислоты - 9-*O*-(*N*-Boc)-глицилолигомицин А (**22**). Снятие защитной Boc-группы возможно действием трифторуксусной кислоты в присутствии анизола; остальные методы (действие муравьиной кислоты, соляной кислоты в метаноле) приводят к смеси трудноразделимых продуктов деградации, полиацилирования и алкилирования. Глицилолигомицин А оказался нестабилен в виде основания, и был выделен и очищен в виде гидрохлорида **23** (схема 2.17).

Схема 2.17



Строение производного **23** доказано методами масс-спектрометрии высокого разрешения и ЯМР-спектроскопии (ЯМР ¹H, ¹³C, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H ROESY). Отнесение химических сдвигов на основании анализа спектров приведены в табл. 2.11.

Таблица 2.11. Спектры ^1H и ^{13}C 9-О-глицилолигомицина А (23)

Поз.	9-О-глицилолигомицин А (23)		
	Тип	δ_{C}	δ_{H} , мульт (<i>J</i> в Hz)
1	O=CO	167.0	–
2	CH	123.8	5.90, d (15.6)
3	CH	150.7	6.80, dd (15.6, 9.6)
4	CH	42.2	2.42, ddq (9.6, 9.6, 6.4)
5	CH	74.2	3.79, dd (9.6, 1.2)
6	CH	48.0	2.74, qd (7.4, 1.2)
7	O=C	217.5	–
8	CH	46.0	2.84, qd (6.8, 2.2)
9	CH	77.9	5.39, dd (10.1, 1.8)
10	CH	41.5	4.03, m
11	O=C	221.4	–
12	C-O	84.6	–
13	CH	74.5	3.73, d (1.5)
14	CH	35.3	1.86, m
15	CH ₂	39.7	2.12, m; 2.05, m
16	CH	131.6	5.47, ddd (14.9, 10.8, 3.9)
17	CH	134.1	6.12, ddd (14.9, 10.8, 1.5)
18	CH	132.8	6.01, dd (15.0, 10.4)
19	CH	138.1	5.20, dd (15.0, 9.8)
20	CH	47.4	1.93, m
21	CH ₂	32.7	1.40, m; 1.65, m
22	CH ₂	32.4	1.06, m; 1.65, m
23	CH	70.0	3.87, m
24	CH	37.6	2.06, m
25	CH	77.9	4.98, dd (11.4, 5.0)
26	CH	39.2	1.76, dq (11.4, 6.6)
27	OCO	100.5	–
28	CH ₂	27.2	1.16, m; 1.95, m
29	CH ₂	27.8	1.44, m; 2.13, m
30	CH	31.9	1.57, m
31	CH	68.8	4.04, m
32	CH ₂	43.8	1.35, m; 1.56, m
33	CH	65.3	3.96, dqd (9.5, 6.1, 3.5)
34	CH ₃	25.2	1.21, d (6.1)
35	CH ₃	18.7	1.17, d (6.4)
36	CH ₃	8.8	1.07, d (7.4)
37	CH ₃	9.8	1.11, d (6.8)
38	CH ₃	15.0	1.08, d (6.5)
39	CH ₃	22.7	1.13, s
40	CH ₃	15.4	1.03, d (6.8)
41	CH ₂	30.0	1.28, m; 1.43, m
42	CH ₃	12.7	0.87, t (7.4)
43	CH ₃	7.2	0.91, d (7.0)
44	CH ₃	12.4	0.96, d (6.6)
45	CH ₃	11.7	0.93, d (7.0)
46	O=CO	168.9	–
47	CH ₂	41.1	3.84, d (17.3); 3.93, d (17.3)

В спектре соединения **23** протоны в положениях 8, 9 и 10 оказались смещены в слабое поле ($\delta_{\text{H}8}=2.84$ м.д.; $\delta_{\text{H}9}=5.39$ м.д.; $\delta_{\text{H}10}=4.03$ м.д.) относительно H-8, 9 и 10 олигомицина А ($\delta_{\text{H}8}=2.6$ м.д.; $\delta_{\text{H}9}=4.06$ м.д.; $\delta_{\text{H}10}=3.72$ м.д.), что позволяет однозначно установить структуру соединения **23** как 9-О-глицилолигомицин А.

2.6. Биологические исследования

Для новых производных олигомицина проводилось исследование противогрибковых, антиактиномикозных и антипролиферативных свойств в сравнении с исходным антибиотиком **1**. Антифунгальная активность изучена⁴ в отношении штаммов дрожжевых культур *Candida albicans* ATCC 24433, *C. parapsilosis* ATCC 22019, филаментозных грибов *Aspergillus niger* 137a, дерматофитов *Microsporum canis* В-200, *Trichophyton rubrum* 2002 (табл. 2.12). Активность некоторых производных в отношении клинических изолятов *Candida spp.* представлена в табл. 2.13. Штамм *C. krusei* обладает природной устойчивостью к флуконазолу, применяемого для системного и местного лечения грибковых инфекций.

Таблица 2.12 Противогрибковая активность олигомицина А (1) и его производных.

Соединение	МИК, мкг/мл				
	<i>C. albicans</i> ATCC 24433	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>A. niger</i> 137a	<i>M. canis</i> В 200	<i>T. rubrum</i> 2002
Олигомицин А (1)	2-4	1-2	0.5	2-4	2-4
Пергидроолигомицин 2	16	1	32	>32	>32
16,17,18,19- Тетрагидроолигомицин 3	4	4-8	>32	32	32
7-(<i>S</i>)-дигидро-олигомицин А (4)	>32	>32	2-4	8	8
7(<i>S</i>),11(<i>R</i>)-тетрагидро- олигомицин А (5)	>32	>32	4-8	8	8
16,17-дигидро-16(<i>S</i>),17(<i>R</i>)- дигидрокси-16,33- <i>O,O</i> - диформил-олигомицин А (7)	0.5-1	4-8	>32	>32	>32
Аддукт олигомицина с бензохиноном (8)	>32	>32	>32	>32	>32
Аддукт олигомицина с <i>N</i> - бензилмалеимидом (12a)	>32	>32	>32	>32	>32
Аддукт олигомицина с <i>N</i> - бензилмалеимидом (12b)	>32	>32	>32	>32	>32
Аддукт олигомицина с <i>N</i> -(3- пиколил)малеимидом (14a)	>32	>32	>32	>32	>32
(3 <i>S</i>)-олигомицин А (16)	4	1	2	>32	32
33-дегидроолигомицин А (17)	4	4	2	2	2

⁴ За определение антифунгальной активности олигомицинов автор выражает глубокую благодарность к.б.н. Грамматиковой Наталье Эдуардовне (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе).

Соединение	МИК, мкг/мл				
	<i>C. albicans</i> ATCC 24433	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>A. niger</i> 137a	<i>M. canis</i> B 200	<i>T. rubrum</i> 2002
33-О-формилолигомицин А (19)	>32	16	>32	32	>32
33-О-трифторацетил- олигомицин А (20)	>32	>32	1	0.25	0.5
9-О-сукцинилолигомицин А (21)	16	>32	32	16	16
9-О-глицилолигомицина А гидрохлорид (23)	8	>32	4	1	1
Флуконазол	4	4	32	>32	>32

Таблица 2.13 Активность олигомицина А (1) и производных в отношении клинических изолятов *Candida spp*

Производное	МИК, мкг/мл				
	<i>C. utilis</i> 84	<i>C. tropicalis</i> 3019	<i>C. krusei</i> 432M	<i>C. albicans</i> 604M (R)	<i>C. albicans</i> 80 (R)
Олигомицин А (1)	1	1	2	32	16-32
Гексагидроолигомицин 2	1-2	2	4-8	>32	>32
16,17,18,19- Тетрагидроолигомицин 3	-	2-4	4	-	-
7-(S)-дигидро- олигомицин А (4)	-	>32	4-8	-	-
7(S),11(R)-тетрагидро- олигомицин А (5)	-	>32	4-8	-	-
(33S)-олигомицин А (16)	2	1	4	>32	>32
33-дегидроолигомицин А (17)	2	2	4	>32	>32
Флуконазол	2	2	>32	>32	>32

Результаты исследования противогрибкового спектра выявили потерю активности 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицина (2) и 16,17,18,19-тетрагидроолигомицина (3) в отношении *A. niger* и других микромицетов, в то время как активность в отношении некоторых штаммов *Candida spp.* сохраняется. Стоит отметить, что как олигомицин А, так и его полусинтетические производные проявили активность в отношении резистентного штамма *C. krusei*. Устойчивые к действию флуконазола клинические изоляты *C. albicans* обладают перекрестной резистентностью как к исходному олигомицину А (1), так и к его производным. Спектр противогрибковой активности 16,17-дигидро-16(S),17(R)-дигидрокси-16,33-О,О-диформилолигомицина А (7) оказался близок к спектру олигомицинов с

восстановленной диеновой связью: активность также была снижена в отношении *A. niger* и других микромицетов, в то время как активность в отношении некоторых штаммов *Candida spp.* сохранилась.

Восстановление как одной C7 карбонильной группы, так и обеих кето-групп олигомицина А приводит к потере действия производных **4**, **5** в отношении модельных штаммов дрожжеподобных грибов рода *Candida*. В сравнении с исходным антибиотиком 7(S)-дигидроолигомицин **4** и 7(S),11(R)-тетрагидроолигомицин А **5** оказались менее активны в отношении микромицетов.

Все полученные аддукты по реакции Дильса-Альдера (**8**, **12a,b**, **14**) оказались практически неактивны в отношении как дрожжеподобных грибов рода *Candida*, так и филаментозных грибов.

Изменение конфигурации 33 положения (производное **16**) и окисление 33-гидроксильной группы (производное **17**) не оказало существенного влияния на антифунгальную активность олигомицина. Для 33-О-формилолигомицина (**19**) наблюдалось значительное снижение активности, как в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*, так и в отношении филаментозных грибов; аналогичная закономерность прослеживалась и для 9-О-сукцинилолигомицина А (**21**). Наконец, 33-О-трифторацетилолигомицин А (**20**) и 9-О-глицилолигомицин А (**23**) сохранили высокую активность в отношении филаментозных грибов, однако оказались менее активны в отношении штаммов *Candida spp.*

Первичный скрининг антипролиферативных свойств новых производных олигомицина А в сравнении с исходным антибиотиком проводился в отношении линии опухолевых клеток хронического миелоидного лейкоза человека К-562 (Табл. 2.14), чувствительной к олигомицину А [6]. Для некоторых производных была определена активность в отношении клеток аденокарциномы кишечника НСТ-116, клеток аденокарциномы молочной железы и в отношении сублинии клеток миелоидной лейкемии с множественной лекарственной устойчивостью К-

562/4. Для наиболее активных соединений была исследована их цитотоксичность в отношении неопухолевых клеток (постнатальных фибробластов человека или фибробластов эмбриона человека).⁵

Таблица 2.14. Антипролиферативная активность олигомицина А и его производных.

Соединение	IC ₅₀ , мкМ				
	К-562	К-562/4	МСF-7	НСТ-116	ПФЧ/ФЭЧ
Олигомицин А (1)	0.20±0.04	0.25±0.1	0.44±0.06	0.90±0.20	3.00±0.20/ 2.30±0.16
Пергидроолигомицин 2	1.70±0.2	-	-	3.30±0.20	-
16,17,18,19-тетрагидроолигомицин (3)	0.25±0.05	-	-	-	-
(7S)-дигидроолигомицин А (4)	0.15±0.02	6.00±0.72	-	5.50±0.77	-
(7S,11R)-тетрагидроолигомицин А (5)	0.25±0.04	5.80±0.81	-	4.00±0.56	-
16,17-дигидро-16(S),17(R)-дигидрокси-16,33-О,О-диформил-олигомицин А (7)	0.80±0.1	-	-	-	-
Аддукт олигомицина с бензохиноном (8)	3.00±0.40	2.80±0.30	3.00±0.40	-	-
Аддукт олигомицина с N-бензилмалеимидом (12a)	2.30±0.30	2.30±0.34	2.10±0.35	-	-
Аддукт олигомицина с N-бензилмалеимидом (12b)	4.40±0.60	4.40±0.50	2.40±0.55	-	-
Аддукт олигомицина с N-(3-пиколил)-малеимидом (14a)	3.80±0.50	4.00±0.60	2.10±0.40	-	-
(33S)-олигомицин А (16)	0.20±0.02	2.50±0.3	0.24±0.04	-	7.80±0.90
33-дегидроолигомицин А (17)	0.12±0.01	-	0.50±0.05	3.40±0.30	7.80±0.20
33-О-формилолигомицин А (19)	0.20±0.05	0.25±0.1	0.25±0.05	1.00±0.10	8.00±0.30
33-О-трифторацетилолигомицин А (20)	0.10±0.02	0.10±0.02	-	-	>50
9-О-сукцинилолигомицин А (21)	0.10±0.01	0.20±0.03	-	-	>50
9-О-глицилолигомицина гидрохлорид (23)	А 0.1±0.02	0.1±0.02	-	-	>50

Сравнение ингибирующих концентраций (IC₅₀) олигомицина А (1) и гидрированных производных 2, 3 показывает, что восстановление трех двойных связей приводит к снижению цитотоксичности практически на

⁵ За определение антипролиферативной активности олигомицинов автор выражает глубокую благодарность к.х.н. Деженковой Любови Георгиевне (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе) и к.б.н. Щербакову Алексею Михайловичу (РОНЦ им. Блохина).

порядок, тогда как восстановление только диеновой системы не оказывает существенного влияния на антипролиферативную активность.

Восстановление карбонильных групп в C7 и C11 приводит к снижению активности в отношении клеток аденокарциномы кишечника HCT-116, тогда как активность в отношении линий клеток миелодной лейкемии человека K562 и ее сублинии с множественной лекарственной устойчивостью K562/4 практически не изменилась. Стоит отметить, что биологические свойства 7(S),11(R)-тетрагидроолигомицина А (5) незначительно отличаются от свойств 7(S)-олигомицина А (4), что говорит о большем влиянии кето-группы в положении 7, нежели в положении 11 на биологическую активность олигомицина А.

Окисление и последующее замещение C16,C17-положений привело к 4-х кратному снижению активности соединения 7 по сравнению с исходным антибиотиком.

Все полученные аддукты по реакции Дильса-Альдера (8, 12a,b, 14) проявили на несколько порядков сниженную антипролиферативную активность в сравнении с исходным антибиотиком.

Наиболее высокую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток, в том числе резистентных, проявили производные, трансформированные по C33 положению. В сравнении с олигомицином А, (33S)-олигомицин А (16), 33-дегидроолигомицин А (17), 33-О-формилолигомицин (19) и 33-О-трифторацетилолигомицин (20) проявили антипролиферативную активность равную или даже несколько выше, при относительно меньшей токсичности на нормальные клетки. Аналогичная закономерность прослеживается и при ацилировании гидроксильной группы в положении 9 остатком янтарной кислоты (производное 21) и глицином (производное 23). Результаты исследования показывают, что проведенные модификации гидроксипропильной цепи приводит к увеличению терапевтического индекса полусинтетических олигомицинов *in vitro*. Кроме того, как сам олигомицин А, так и его активные производные способны

эффективно преодолевать множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток, обусловленную экспрессией трансмембранного транспортера p-gp на их поверхности.

Стоит также отметить, что в результате формилирования гидроксильной группы в 33 положении и ацилирования остатком янтарной кислоты гидроксильной группы в 9 положении антибиотика сохраняется только специфическая антипролиферативная активность, в то время как большинство других тест-культур становятся нечувствительными к действию формилолигомицина А и сукцинилолигомицина А. Следовательно, 33-*O*-формилолигомицин и 9-*O*-сукцинилолигомицин являются перспективными кандидатами для дальнейшего исследования противоопухолевой активности. Трифторацетильное производное **20**, гидрохлорид 9-*O*-глицилолигомицина А **23**, 33S-эпимер олигомицина **16** и 33-дегидроолигомицин **17** представляют интерес для дальнейших биологических исследований не только как противоопухолевые агенты, но и как соединения с высокой противогрибковой активностью и сниженной токсичностью.

2.7. Заключение

В рамках диссертационного исследования было реализовано несколько направлений химической модификации олигомицина А, ингибитора F₀F₁ АТФ-синтазы. При разработке методов синтеза новых производных олигомицина А главной задачей было осуществление направленных превращений отдельных функциональных групп антибиотика с минимальным количеством стадий. Успешное решение этих задач позволило получить 16 полусинтетических производных олигомицина, выделенных в виде индивидуальных соединений с чистотой 93-98%. Все описанные способы химической модификации олигомицина А включают в себя не более 2 стадий, а также проведены с использованием коммерчески доступных реагентов и растворителей, что обуславливает их эффективность и практичность. В работе было реализовано регио- и стереоселективное восстановление кратных С-С связей и карбонильных групп олигомицина А, эпексидирование одной С16-С17 кратной связи с раскрытием эпексидного цикла действием муравьиной кислоты, [4+2] циклоприсоединение к диеновой системе, а также модификация гидроксильных групп в положении С33 и С9.

Синтезированные производные с модифицированным макроциклом продемонстрировали сохранение какого-либо специфического вида активности на фоне снижения активности к остальным тест-культурам. Так, для пергидроолигомицина (2) выявлена специфическая активность в отношении штаммов дрожжевых грибов рода *Candida*, которая в отдельных случаях превосходит препарат сравнения флуконазол. Несмотря на то, что антифунгальная активность производного 2 несколько снижена в отношении *Candida spp.* по сравнению с исходным антибиотиком, восстановление всех двойных связей повышает избирательность действия на *Candida spp.* при одновременном снижении высокой цитотоксичности, характерной для олигомицина А. Для 16,17,18,19-тетрагидроолигомицина А (3) и 16,17-дигидро-16(S),17(R)-дигидрокси-16,33-*O,O*-диформилолигомицина А (7) и

также наблюдалось значительное снижение активности в отношении филаментозных грибов и сохранение анти-кандидозного действия, однако, антипролиферативная активность в отношении опухолевых клеток оставалась на довольно высоком уровне. Восстановление карбонильных групп олигомицина А привело, наоборот к потере антикандидозной активности, и сохранению активности в отношении филаментозных грибов. Цитотоксическое действие 7,11-гидроксильных производных оказалось менее выраженным, чем у исходного антибиотика (за исключением линии клеток К-562).

Для получения противоопухолевых производных олигомицина с улучшенными токсикологическими свойствами наиболее перспективной оказалась модификация 33 положения боковой гидроксипропильной цепи и ацилирование гидроксильной группы в положении 9. Сравнительное исследование антипролиферативных свойств олигомицина А и его новых производных 33(*S*)-олигомицина А (**16**), 33-дегидроолигомицина (**17**), 33-*O*-формилолигомицина (**19**) и 33-*O*-трифторацетилолигомицина (**20**) на клетках хронического миелоидного лейкоза человека К-562 и её сублинии К-562/4 с МЛУ, обусловленной экспрессией Pgp, клетках аденокарциномы молочной железы MCF-7, а также на неопухолевых постнатальных клетках фибробластов человека или фибробластов эмбриона человека (ПФЧ/ФЭЧ) показали, что данные модификации гидроксильной группы в 33 положении боковой цепи олигомицина А вызывают снижение цитотоксичности в отношении нормальных клеток человека с сохранением активности в отношении опухолевых линий клеток. Аналогичная закономерность прослеживается и для 9-*O*-сукцинилолигомицина А (**21**) и 9-*O*-глицилолигомицина (**23**). Таким образом, данные производные представляют интерес для дальнейшего углубленного исследования их биологических и фармакологических свойств.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигомицин А (чистота 95%), продуцируемый штаммом *Streptomyces avermitilis* NIS B62, получен в автономном некоммерческом исследовательском центре БИОАН (Москва, Российская Федерация). Использовались реагенты и растворители производства Sigma-Aldrich, Acros, Merck. Для аналитической ТСХ использовались алюминиевые пластинки с закрепленным слоем силикагеля F₂₅₄ толщиной 0.2 мм (Merck); для колоночной хроматографии использовался силикагель 60 (Merck). Соединения обнаруживали в УФ-свете (254 нм), проявляли на ТСХ-пластинах при нагревании реактивом, содержащим 4.5% (об.) анисового альдегида, 3.0% (об.) концентрированной серной кислоты, 1.5% (об.) ледяной уксусной кислоты в EtOH.

Аналитическую ВЭЖХ выполняли с использованием хроматографа Shimadzu LC-20 AD (Shimadzu Corporation) на колонке Kromasil-100-C18 размером (4 x 250 мм, 5 мкм) (Knauer, Германия). Объем петли инжектора – 20 мкл. Детектирование осуществляли при длине волны 230 нм. Элюирование проводили в течение 40 мин системой H₂O-MeCN: 10 мин – градиентный режим (содержание MeCN 80 → 95%), 30 мин – изократический режим (содержание MeCN – 95%) скорость потока – 1 мл/мин. Для соединения **22** в качестве элюента А использовался 0.03М раствор формиата аммония (рН 6,4). Чистоту соединений определяли по площади пиков, используя метод внутренней нормализации.

Масс-спектры высокого разрешения ESI регистрировали на приборе «micrOTOF-Q II» («Bruker Daltonics GmbH», Германия). Растворы образцов (0.1 мг/мл в смеси CHCl₃ и EtOH или в смеси MeCN и H₂O) прямо вводили в ESI-источник с помощью шприцевого насоса со скоростью потока 3 мкл/мин и анализировали положительно и отрицательно заряженные ионы при следующих условиях детектирования: напряжение на капилляре 4 кВ, давление азота в небулайзере 0.4 Бар (5.8 psi), скорость потока осушающего

газа 4.0 л/мин и температура источника 180 °С. Для измерений использовали растворители с содержанием более 98 %, предназначенные для LC-MS.

Спектры ЯМР регистрировались на спектрометре «Avance III» фирмы «Bruker» с резонансной частотой на ядрах ^1H и ^{13}C 600 и 150 MHz, соответственно. В качестве растворителя использовали дейтерированный метанол, дейтерохлороформ и DMSO- d_6 фирмы «Merck». Химические сдвиги ядер измеряли при 25°C, используя в качестве внутреннего стандарта сигналы остаточных растворителей. Нумерация атомов в структуре олигомицина представлена на рисунке 3.1.

ИК-спектры регистрировали с использованием ИК-Фурье спектрометра Nicolet-iS10 (детектор DTGS, светоделитель KBr) с приставкой Smart Performer, оснащенной ZnSe кристаллом (Nicolet, Madison, WI, USA). Измерение проводили при разрешении 4 см $^{-1}$; зона спектра 4000 - 650 см $^{-1}$. Спектр обрабатывали с использованием программы OMNIC - 7.0. УФ-спектры регистрировали на спектрометре Hitachi-U2000.

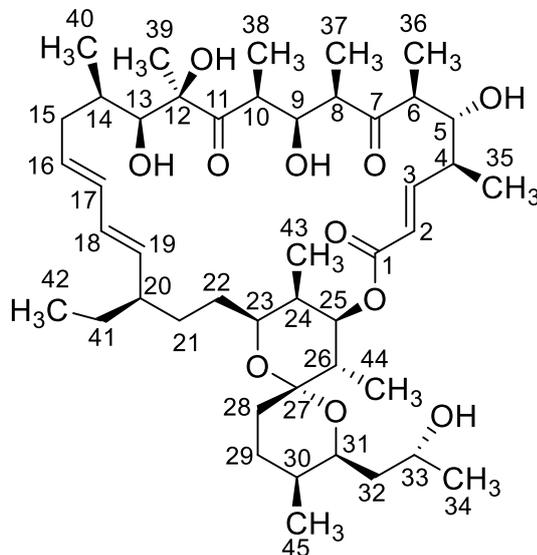


Рисунок 3.1. Нумерация атомов в молекуле олигомицина А

Синтез 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицина (2).

К раствору 60.0 мг (0.075 ммоль) олигомицина А (1) в 4.0 мл метанола прибавляют 48.0 мг (0.0225 ммоль) 5% Pd/C и гидрируют при избыточном давлении водорода (0.4 атм) при комнатной температуре 1 ч. Реакционную

смесь фильтруют, промывают катализатор метанолом и концентрируют в вакууме. Остаток очищают колоночной хроматографией (гексан:ацетон 10:3→10:4, хлороформ:метанол 10:0.2→10:0.3) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход 42.0 мг (69%). Аморфный бесцветный порошок. Найдено: m/z ESI 797.5593 (100%) $[M+H]^+$. $C_{45}H_{81}O_{11}$. Вычислено 796.5701. ИК (пленка) ν max cm^{-1} : 3416 с, 2971 ср, 2928 ср, 2857 ср, 1731 сл, 1698 с, 1458 с, 1382 ср, 1340 сл, 1264 сл, 1222 сл, 1191 сл, 1169 сл, 1135 сл, 1089 ср, 1048 ср, 982 с, 882 ср, 844 сл, 802 сл. УФ (метанол) λ_{max} (lg ϵ) нм: 207(3.7), 268 (2.8). ВЭЖХ: R_t =23.2, чистота 95.2%.

Синтез 16,17,18,19-тетрагидроолигомицина (3).

К раствору 60.0 мг (0.075 ммоль) олигомицина А (1) в 4.0 мл метанола прибавляют 48.0 мг (0.0225 ммоль) 5% Pt/C и гидрируют при избыточном давлении водорода (0.2 атм) при комнатной температуре 0.5 ч. Реакционную смесь фильтруют, промывают катализатор метанолом и концентрируют в вакууме. Остаток очищают колоночной хроматографией (гексан:ацетон 10:2→10:3.5, хлороформ:метанол 10:0.1→10:0.25) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход 24.0 мг (40%). Аморфный бесцветный порошок. Найдено: m/z ESI 829.5215 (100%) $[M-H+2H_2O]^-$. $C_{45}H_{81}O_{13}$. Вычислено 829.5683. ИК (пленка) ν max cm^{-1} : 3416 с, 2971 ср, 2928 ср, 2857 ср, 1731 сл, 1698 с, 1458 с, 1382 ср, 1340 сл, 1264 сл, 1222 сл, 1191 сл, 1169 сл, 1135 сл, 1089 ср, 1048 ср, 982 с, 882 ср, 844 сл, 802 сл. УФ (метанол) λ_{max} (lg ϵ) нм: 210 (3.7), 268 (2.8). ВЭЖХ: R_t =19.2, чистота 95.9%.

Синтез (7S)-дигидроолигомицина А (4)

К раствору олигомицина А (100 мг, 0.13 ммоль) в уксусной кислоте (5 мл) прибавляют $NaBH(OAc)_3$ (55 мг, 0.26 ммоль) и перемешивают 1 ч. Реакционную смесь разбавляют водой и экстрагируют продукт этилацетатом (2×40 мл), промывают последовательно раствором (10%-м) гидрокарбоната натрия и водой до нейтральной реакции. Экстракт сушат безводным

сульфатом натрия, фильтруют и упаривают. Остаток очищают колоночной хроматографией (гексан:ацетон 10:3.8→10:4.4) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход – 90 мг (90%). Аморфный бесцветный порошок. Т.пл. 95-96 °С. Найдено m/z ESI 827.5566 (100%) $[M-H+2H_2O]^-$. $C_{45}H_{79}O_{13}$. Вычислено: 827.5521. ИК (пленка) ν max cm^{-1} : 3351 с, 2972 ср, 2921 ср, 2872 ср, 1699 с, 1640 ср, 1457 с, 1384 ср, 1282 с, 1224 ср, 1192 сл, 1164 сл, 1136 ср, 1086 ср, 1047 с, 984 с, 916 сл, 880 с, 845 сл, 805 сл, 691 сл. УФ (метанол) λ max (lg ϵ) нм: 224 (3.7), 233 (3.6), 242 (3.4). ВЭЖХ R_t = 9.5, чистота 95%.

Синтез (7S,11R)-7,11-тетрагидроолигомицина А (5)

К раствору (7S)-дигидроолигомицина А (2, 80 мг, 0.10 ммоль) в этаноле (8 мл) прибавляют $NaBH_4$ (15 мг, 0.40 ммоль) и перемешивают 24 ч. Растворитель отгоняют в вакууме, продукт экстрагируют этилацетатом (2×30 мл), промывают последовательно раствором (5%-м) соляной кислоты и водой до нейтральной реакции. Экстракт сушат безводным сульфатом натрия, фильтруют и упаривают. Остаток очищают колоночной хроматографией (элюент этилацетат, система элюентов хлороформ:ацетон 4:1→хлороформ:ацетон:метанол 4:1.7:0.05) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход производного 3 – 28 мг (35%). Аморфный бесцветный порошок. Найдено m/z ESI 817.5459 (100%) $[M+Na]^+$. $C_{45}H_{78}O_{11}Na$. Вычислено: 817.5436. ИК (пленка) ν max cm^{-1} : 3352 с, 2973 ср, 2932 сл, 2878 сл, 1699 пл., 1642 сл, 1456 ср, 1381 ср, 1277 ср, 1225 сл, 1192 сл, 1162 сл, 1135 сл, 1087 с, 1046 с, 985 с, 917 сл, 880 с. УФ (метанол) λ max (lg ϵ) нм: 225 (3.5). 234 (3.4), 243 (3.2). ВЭЖХ R_t = 13.5, чистота 94.8%.

Синтез 16,17-дигидро-16(S),17(R)-дигидрокси16,33-О,О-диформил-олигомицина А (7)

Раствор олигомицина А (100 мг, 0.13 ммоль) в хлористом метиле (10 мл) охлаждают до -17°С, прибавляют *m*-хлорнадбензойную кислоту (38 мг,

0.22 ммоль) и выдерживают 40 ч при -17°C . Реакционную смесь выливают в воду (20 мл) и экстрагируют продукт хлороформом (2×30 мл), промывают последовательно раствором гидрокарбоната натрия и водой до pH 7. Экстракт сушат безводным сульфатом натрия, фильтруют и упаривают. Полученный неочищенный эпоксид 2 растворяют в муравьиной кислоте (6 мл) и перемешивают 2 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляют водой и экстрагируют продукт этилацетатом (2×30 мл), промывают последовательно раствором (1%-м) гидрокарбоната натрия и водой до нейтральной реакции. Экстракт сушат безводным сульфатом натрия, фильтруют и упаривают. Остаток очищают колоночной хроматографией (хлороформ:метанол, 10:0.1 \rightarrow 10:0.3; гексан:ацетон 10:3 \rightarrow 10:4.5) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход – 23 мг (20%). Аморфный бесцветный порошок. Найдено m/z ESI 897.5224 (100%) $[\text{M}-\text{H}+\text{H}_2\text{O}]^-$. $\text{C}_{47}\text{H}_{77}\text{O}_{16}$. Вычислено: 897.5217. ИК (пленка) $\nu_{\text{max}} \text{ см}^{-1}$: 3372 с, 2975 ср, 2929 сл, 2876 сл, 1714 с, 1643 ср, 1456 ср, 1381 ср, 1277 ср, 1190 ср, 1087 ср, 1044 с, 984 ср, 879 с. УФ (метанол) $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon)$ нм: 215 (1.0). ВЭЖХ $R_t = 14.3$, чистота 95%.

Общая методика [4+2] циклоприсоединения к олигомицину А

В инертной атмосфере к раствору олигомицина А (60 мг, 0.076 ммоль) в толуоле (2 мл) прибавляют диенофил (0.380 ммоль) и перемешивают несколько часов при 70°C . Протекание реакции контролируют методом ТСХ (гексан-ацетон, 10:7) спустя 3 и 6 ч и, при необходимости, добавляют диенофил (0.20 ммоль). По окончании реакции, реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и концентрируют в вакууме. Остаток очищают колоночной хроматографией (гексан-ацетон, 10:3 \rightarrow 10:5 и хлороформ-метанол (10:0.1 \rightarrow 10:0.2) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1).

Аддукт олигомицина с бензохиноном (8). Выход 13 мг (20%). $R_f = 0.40$.
Найдено m/z HRMS (ESI) 933.5565 (100%) $[M-H+2H_2O]^+$. $C_{51}H_{81}O_{15}$.
Вычислено 933.5575. ИК (пленка) ν max cm^{-1} : 3385 с, 2972 с, 2937 сл, 2879 с,
1701 с, 1677 с, 1649 сл, 1457 сл, 1380 с, 1268 с, 1223 с, 1184 с, 1135 сл, 1087 с,
1046 с, 983 с, 956 ш, 918 ш. УФ (метанол) λ max (lg ϵ) нм: 210 (4.19), 230
(3.94), 242 (3.62). ВЭЖХ $R_t = 16.33$, чистота 96.1%.

Аддукт олигомицина с N-бензилмалеимидом (12a). Выход 35 мг (47%).
 $R_f = 0.51$. Найдено m/z HRMS (ESI) 1012.5998 (100%) $[M-H+2H_2O]^+$.
 $C_{56}H_{86}NO_{15}$. Вычислено 1012.6003. ИК (пленка) ν max cm^{-1} : 3388 с, 2971 с,
2932 сл, 2877 сл, 2791 сл, 1768 сл, 1693 с, 1642 сл, 1497 сл, 1457 сл, 1431 сл,
1399 ср, 1345 сл, 1280 с, 1224 сл, 1189 сл, 1137 сл, 1086 ср, 1047 с, 983 с, 956
сл, 919 сл. УФ (метанол) λ max (lg ϵ) нм: 212 (4.25), 224 (4.02), 232 (3.77).
ВЭЖХ $R_t = 14.57$, чистота 95.3%.

Аддукт олигомицина с N-бензилмалеимидом (12b). Выход 20 мг (27%).
 $R_f = 0.44$. Найдено m/z HRMS (ESI) 1012.5985 (100%) $[M+2H_2O-H]^+$.
 $C_{56}H_{86}NO_{15}$. Вычислено 1012.6003. ИК (пленка) ν max cm^{-1} : 3364 с, 2974 с,
2880 сл, 1766 сл, 1694 с, 1641 сл, 1456 сл, 1401 сл, 1379 сл, 1278 ср, 1224 сл,
1179 сл, 1151 сл, 1087 с, 1045 с, 984 с, 955 сл, 918 сл. УФ (метанол) λ max
(lg ϵ) нм: 210 (4.43), 222 (4.16), 228 (4.00). ВЭЖХ $R_t = 11.80$, чистота 96.5%.

Аддукт олигомицина с N-(3-пиколил)малеимидом (14a). Выход 35 мг
(47%). $R_f = 0.38$ Найдено m/z HRMS (ESI) 1013.5997 (100%) $[M+2H_2O-H]^+$
 $C_{55}H_{85}N_2O_{15}$. Вычислено 1013.5955. ИК (пленка) ν max cm^{-1} : 3343 с, 2973 с,
2879 с, 1923 сл, 1698 с, 1644 сл, 1456 ср, 1400 сл, 1378 ср, 1274 ср, 1225 сл,
1192 сл, 1088 с, 1045 с, 984 с. УФ (метанол) λ max (lg ϵ) нм: 214 (4.14), 230
(3.77), 254 (3.50), 260 (3.51), 266 (3.38). ВЭЖХ $R_t = 14.04$, чистота 94.9%.

Синтез (33S)-олигомицина A (16)

Раствор 33-*O*-мезилолигомицина А (30 мг, 0.035 ммоль) и тиомочевины (53 мг, 0.70 ммоль) в смеси вода-метилцеллозольв (1:1, 15 мл) перемешивают в инертной атмосфере 3 ч при 95 °С. По окончании реакции (анализ методом ТСХ, гексан-ацетон, 10:7), реакцию смесь охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 0.01н раствор HCl (10мл) и экстрагируют этилацетатом (20мл×2). Объединенные органические фракции промывают водой (20мл×3), солевым раствором (20мл), сушат с сульфатом натрия и упаривают. Остаток очищают методом колоночной хроматографии (гексан-ацетон (10:7) и хлороформ-этилацетат-метанол (10:10:0.01)) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход 11 мг (40%). Найдено m/z HRMS (ESI) 813.5251 (100%) [M+Na]⁺. C₄₅H₇₄O₁₁Na. Вычислено 813.5129. ИК (пленка) ν max см⁻¹: 3468 с, 2961 с, 2923 с, 2854 с, 1702 с, 1643 сл, 1459 с, 1383 с, 1277 с, 1223 сл, 1191 сл, 1135 сл, 1074 сл, 1046 сл, 984 с, 923 сл, 882 сл, 795 сл, 743 сл. УФ (метанол) λ max (lgε) нм: 225 (4.52), 232 (4.47), 243 (4.25). ВЭЖХ Rt = 14.55, чистота 92.5%.

Синтез 33-дегидроолигомицина А (17)

Раствор 33-*O*-мезилолигомицина А (30 мг, 0.034 ммоль) и триэтиламина (0.15 мл, 1.36 ммоль) в безводном диметилсульфоксиде (15 мл) перемешивают в инертной атмосфере 3 ч при 105 °С. По окончании реакции (анализ методом ТСХ, гексан-ацетон, 10:7), реакцию смесь охлаждают до комнатной температуры, добавляют 0.01 Н раствор HCl (10мл) и экстрагируют этилацетатом (20мл×2). Объединенные органические фракции промывают водой (20мл×3), солевым раствором (20мл), сушат с сульфатом натрия и упаривают. Остаток очищают методом колоночной хроматографии (гексан-ацетон (10:7) и хлороформ-метанол (10:0.5)) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход 14 мг (50%). Найдено m/z HRMS (ESI) 811.4988 (100%) [M+Na]⁺. C₄₅H₇₂O₁₁Na. Вычислено 811.4972. ИК (пленка) ν max см⁻¹: 3495, 2973, 2925, 2874, 1699, 1642, 1466, 1382, 1276,

1222, 1190, 1036, 1091, 1047, 984, 924, 879, 803, 686. УФ (метанол) λ_{\max} (lg ϵ)
нм: 225 (4.05), 232 (4.02), 243 (3.85). ВЭЖХ $R_t = 16.59$, чистота 96.1%.

Синтез 33-(R,S)-бромо-33-дезоксиолигомицина А (18)

Метод А. К раствору 33-*O*-мезилолигомицин А (15) (30 мг, 0.035 ммоль) в *N*-метил-2-пирролидоне (5 мл) прибавляют тетрабутиламмоний бромид (220 мг, 0.70 ммоль), в инертной атмосфере реакционную смесь перемешивают 4-4.5 ч при 95°C. Через 1.5 ч к смеси прибавляют тетрабутиламмоний бромид (110 мг, 0.35 ммоль). Контроль реакции осуществляют методом ТСХ (гексан/ацетон (10:7)). По окончании реакции смесь охлаждают, разбавляют водой (10.0 мл) и дважды экстрагируют этилацетатом (2x25.0 мл). Объединенный экстракт промывают водой, раствором лимонной кислоты (0.1н), затем водой до нейтрального рН, затем раствором NaHCO₃ (0.1н) и водой до нейтрального рН. Экстракт сушат безводным сульфатом натрия и упаривают. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле с использованием систем элюентов гексан/ацетон (10:7) и хлороформ/метанол (10:0.5) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход 13 мг (45%).

Метод Б. К раствору 33-*O*-мезилолигомицина А (15) (30 мг, 0.035 ммоль) в диметилсульфоксиде (3 мл) прибавляют бромид калия (40 мг, 0.34 ммоль) и 18-краун-6 (9 мг). В инертной атмосфере реакционную смесь перемешивают 4 ч при 85 °С. Контроль реакции осуществляют методом ТСХ (гексан/ацетон (10:7)). По окончании реакции смесь охлаждают, разбавляют водой (10 мл) и дважды экстрагируют этилацетатом (2x25.0 мл) и несколько раз промывали водой. Объединенный экстракт сушат безводным сульфатом натрия и упаривают. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле с использованием систем элюентов гексан/ацетон (10:7) и хлороформ/метанол (10:0.5) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход 0.011 г (38 %). Бесцветный аморфный порошок. Найдено m/z HRMS (ESI) 875.4254 (100%) $[M+Na]^+$. C₄₅H₇₃BrO₁₀Na.

Вычислено 875.4284. ИК (пленка) ν max cm^{-1} : 3424 с, 2969 с, 2925 с, 2880 с, 1698 с, 1644 сл, 1456 ср, 1381 ср, 1278 ср, 1224 ср, 1189 ср, 1135 сл, 1096 ср, 1048 ср, 985 с, 924 ср, 880 ср. УФ (метанол) λ max (lg ϵ) нм: 260 (4.4), 280 (4.2). ВЭЖХ $R_{t1}=26.7$, $R_{t2}=27.5$ мин.

Синтез 33-О-формилолигомицина А (19)

Олигомицин А (100 мг, 0.13 ммоль) растворяют в муравьиной кислоте (8 мл, 98%) и перемешивают 2 ч при комнатной температуре. Протекание реакции контролируют методом ТСХ (элюирующая система – хлороформ:метанол 10:0.5). Реакционную массу разбавляют водой и экстрагируют продукт этилацетатом (2x30 мл), промывают последовательно раствором (1%-м) гидрокарбоната натрия и водой до нейтральной реакции. Экстракт сушат безводным сульфатом натрия, фильтруют и упаривают. Остаток очищают колоночной хроматографией (хлороформ:метанол, 10:0.1→10:0.3) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход производного **19** – 61 мг (57%). Аморфный порошок белого цвета. Найдено m/z ESI 841.5110 (100%) $[M+Na]^+$. $C_{46}H_{74}O_{12}Na$. Вычислено: 841.5072. ИК (пленка) ν max cm^{-1} : 3346 с, 2974 с, 2878 сл, 1703 сл, 1641 сл, 1455 сл, 1379 сл, 1327 сл, 1274 сл, 1088 с, 1045 с, 986 сл, 880 с, 804 сл. УФ (метанол) λ max (lg ϵ) нм: 220 (2.5), 225 (2.5), 235 (2.5), 243 (2.3). ВЭЖХ $R_t = 16.69$, чистота 97%.

Синтез 33-О-трифторацетилолигомицина А (20)

В инертной атмосфере к раствору олигомицина А (60 мг, 0.076 ммоль) в безводном хлористом метиле (4 мл) добавляют диазабициклоундецен (0.011 мл, 0.076 ммоль) и ангидрид трифторуксусной кислоты (0.009 мл, 0.114 ммоль). Реакционную смесь перемешивают 3-5 ч при комнатной температуре в инертной атмосфере. По окончании реакции (анализ методом ТСХ, хлороформ-метанол, 10:0.5), реакцию смесь разбавляют 0.01н раствором HCl (10мл) и дважды экстрагируют этилацетатом (2x20мл).

Объединенные органические фракции промывают раствором (1%-м) гидрокарбоната натрия (15 мл) и водой (2×20мл), сушат с сульфатом натрия и упаривают. Остаток очищают методом колоночной хроматографии (хлороформ-метанол (10:0.1→10:0.3)) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход 34 мг (50 %). Найдено m/z HRMS (ESI) 921.5168 (100%) $[M+2H_2O-H]^-$. $C_{47}H_{76}F_3O_{14}$. Вычислено 921.5193. ВЭЖХ $R_t = 21.25$, чистота 96.3%.

Синтез 9-О-сукцинилолигомицина А (21)

В инертной атмосфере к раствору олигомицина А (60 мг, 0.076 ммоль) в безводном хлористом метиле (4 мл) прибавляют диазабициклоундецен (0.011 мл, 0.076 ммоль) и ангидрид янтарной кислоты (13 мг, 0.114 ммоль). Реакционную смесь перемешивают 3-5 ч при комнатной температуре в инертной атмосфере. По окончании реакции (анализ методом ТСХ, хлороформ-метанол, 10:0.5), реакцию смесь разбавляют 0.01н раствором HCl (10мл) и дважды экстрагируют этилацетатом (2×20мл). Объединенные органические фракции тщательно промывают водой (3×20мл), сушат с сульфатом натрия и упаривают. Остаток очищают методом колоночной хроматографии (хлороформ-метанол (10:0.2→10:0.4)) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход 47 мг (70%). Найдено m/z HRMS (ESI) 891.5451 (100%) $[M+H]^+$. $C_{49}H_{79}O_{14}$. Вычислено 891.5464. ВЭЖХ $R_t = 17.51$, чистота 96.3%.

Синтез 9-О-глицилолигомицина А (23)

Олигомицин А, РуВОР и сукцинимидный эфир (*N*-Вос)аланина предварительно сушат в эксикаторе над P_2O_5 24 ч. В инертной атмосфере к раствору олигомицина А (80 мг, 0.101 ммоль) в безводном хлористом метиле (3 мл) прибавляют диазабициклоундецен (0.015 мкл, 0.101 ммоль), сукцинимидный эфир (*N*-Вос)аланина (55 мг, 0.202 ммоль) и РуВОР (13 мг, 0.202 ммоль). Реакционную смесь перемешивают 3-5 ч при комнатной

температуре в инертной атмосфере. По окончании реакции (анализ методом ТСХ, хлороформ-метанол, 10:0.5), реакцию смесь разбавляют 0.01N раствором HCl (10мл) и дважды экстрагируют хлороформом (2×20мл). Объединенные органические фракции тщательно промывают водой (3×20мл), сушат с сульфатом натрия и упаривают. Остаток очищают методом колоночной хроматографии (гексан-этилацетат (7:2→7:4), хлороформ-метанол (15:0.02→15:0.1)) и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход Вос-производного **22** 39 мг (40%). Найдено m/z HRMS (ESI) 970.5862 (100%) [M+Na]⁺. C₅₂H₈₅NO₁₄. Вычислено 970.5892. ВЭЖХ Rt = 16.84, чистота 89.2%.

Вос-производное **22** (39мг, 0.041 ммоль) растворяют в хлористом метиле (2 мл), прибавляют анизол (20 мкл, 0.184 ммоль), затем трифторуксусную кислоту (1.0 мл, 0.013 моль) и перемешивают 20 мин. Реакционную массу выливают в 15 мл 0.95M водного раствора NaHCO₃ (1.2 г, 0.014 моль NaHCO₃). Продукт экстрагируют этилацетатом (2×30мл) и промывают водой (3×20мл), затем экстракт подкисляют 2M раствором HCl в диэтиловом эфире (20 мкл, 0.04 ммоль HCl) и упаривают. Остаток очищают колоночной хроматографией, неподвижная фаза – полимер Toyopearl HW-65, подвижная фаза – ацетонитрил и кристаллизуют из смеси гексан/хлористый метилен (10:1). Выход продукта **23** 23 мг (66%). Найдено m/z HRMS (ESI) 848.5530 (100%) [M+H]⁺. C₄₇H₇₇NO₁₂. Вычислено 848.5530. ВЭЖХ Rt = 10.06, чистота 95.7%.

ВЫВОДЫ

1. Показана возможность региоселективного восстановления двойных С-С и С-О связей макроцикла олигомицина А за счет более высокой реакционной способности диеновой С16-С19 системы и С7 карбонильной группы в сравнении с акриловым фрагментом лактона и С11 карбонильной группой соответственно; присоединение гидрида к С7 карбонильной группе протекает стереоселективно за счет стерического фактора и полиольного хирального окружения.
2. Установлено, что эпоксидирование диеновой системы олигомицина А протекает по С16-С17 связи и приводит к дестабилизации структуры; получение стабильных производных возможно только после раскрытия оксиранового фрагмента.
3. Показано, что олигомицин А легко вступает в реакции [4+2] циклоприсоединения с активными диенофилами. Стереохимический результат реакции определяет *эндо*-тип переходного состояния и его стабилизация за счет образования водородных связей между карбонильной группой диенофила и 33-ОН группой олигомицина А.
4. Показано, что тиокарбамид и карбамид катализируют замещение метансульфоной группы 33-О-мезилолигомицина А на гидроксильную с обращением конфигурации.
5. Синтезирован 33-дегидроолигомицин А, спектральные и физико-химические характеристики которого существенно отличаются от таковых природного антибиотика, что в совокупности с химическими свойствами олигомицина подтверждает строение боковой цепи олигомицина, подвергнутое ранее сомнению в работах R.A. Palmer.
6. Найдены условия одностадийного региоселективного ацилирования либо С33, либо С9 гидроксильной группы антибиотика. Показано, что наиболее эффективным катализатором ацилирования олигомицина А

ангидридами органических кислот и активными эфирами аминокислот является диазабициклоундецен.

7. Анализ связи структура-активность позволил выделить наиболее перспективные направления химической модификации олигомицина для улучшения его фармакологических свойств – это трансформация боковой гидроксипропильной цепи и С9-ОН группы. Ряд производных, модифицированных по С33 и С9 положениям, проявили высокую активность и сниженную токсичность *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pagliarani A., Nesci S., Ventrella V. Novel drugs targeting the c-ring of the F_1F_0 -ATP synthase // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 16. – P. 815-824.
2. Lamb R., Harrison H., Hulit J. et al. Mitochondria as new therapeutic targets for eradicating cancer stem cells: Quantitative proteomics and functional validation via MCT1/2 inhibition // *Oncotarget.* – 2014. – Vol. 5. – P. 11029-11037.
3. Niedzwiecka K., Tisi R., Penna S. et al. Two mutations in mitochondrial ATP6 gene of ATP synthase, related to human cancer, affect ROS, calcium homeostasis and mitochondrial permeability transition in yeast // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* – 2018. – Vol. 1865(1). – P. 117-131.
4. Andries K. Verhasselt P., Guillemont J. et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis* // *Science.* – 2005. – Vol. 307. – P. 223-227.
5. Vestergaard M., Nohr-Meldgaard K., Bojer M.S. et al. Inhibition of the ATP synthase eliminates the intrinsic resistance of staphylococcus aureus towards polymyxins // *mBio.* – 2017. – Vol. 8. – e01114-17.
6. Salomon A.R., Voehringer D.W., Herzenberg L. A., Khosla C. Apoptolidin, a selective cytotoxic agent, is an inhibitor of F_0F_1 -ATPase // *Chem. Biol.* – 2001. – Vol. 8. – P. 71-80.
7. Li Y. C., Fung K.P., Kwok T.T. et al. Mitochondria-targeting drug oligomycin blocked P-glycoprotein activity and triggered apoptosis in doxorubicin-resistant HepG2 cells // *Chemoter.* – 2004. – Vol. 50. – P. 55-62.
8. Бибикова М.В., Грамматикова Н.Э., Корыстова А.Ф. и др. Олигомицины подавляют множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток // *Биол. мембр.* – 2015. – Т. 32. – С. 211-216.
9. Dinos G. P. The macrolide antibiotic renaissance // *Brit. J. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 174. – P. 2967–2983.

- 10.Solovieva S.E., Olsufyeva E.N., Preobrazhenskaya M.N. Chemical modification of antifungal polyene macrolide antibiotics // Russ. Chem. Rev. – 2011. – Vol. 80. – P. 103-126
- 11.Omelchuk O.A., Tevyashova A.N., Shchekotikhin A.E. Recent advances in antifungal drug discovery based on polyene macrolide antibiotics // Russ. Chem. Rev. – 2018. – Vol. 87. – P. 1206–1225.
- 12.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. – Vol. 72. – P. 590-641.
- 13.Huss M., Vitavska O., Albertmelcher A. et al. Vacuolar H(+)-ATPases: intra- and intermolecular interactions // Eur. J. Cell. Biol. – 2011. – Vol. 90. – P. 688-695.
- 14.Shrestha B.M. Two decades of tacrolimus in renal transplant: basic science and clinical evidences // Exp. Clin. Transplant. – 2017. – Vol. 15. – P. 1-9.
- 15.Yoo Y.J., Kim H., Park S.R., Yoon Y.J. An overview of rapamycin: from discovery to future perspectives // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – Vol. 44. – P. 537-553.
- 16.Laing R., Gillan V., Devaney E. Ivermectin - old drug, new tricks? // Trends Parasitol. – 2017. – Vol. 33. – P.463-472.
- 17.Smith R.M., Peterson W.H., McCoy E. Oligomycin, a new antifungal antibiotic // Antibiot. Chemother. – 1954. – Vol. 4. – P. 962-970.
- 18.Driniayev V.A., Krugliak E.B., Apenianskaya L.M. et al. *Streptomyces avermitilis* - a producer of oligomycin // Biotekhnol. – 1994. – Vol. 7. – P. 30-34.
- 19.Lin X., Wen Y., Li M. et al. A new strain of *Streptomyces avermitilis* produces high yield of oligomycin A with potent anti-tumor activity on human cancer cell lines in vitro // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 81. – P. 839-845.

20. Kim H.S., Bang H.J., Lee S.Y. et al. 44-Homooligomycin E, a new cytotoxic macrolide antibiotic from *Streptomyces ostreogriseus* // Biosci. Biotech. Biochem. – 1997. – Vol. 61. – P. 378-380.
21. Kim C.-J., Lee S.-Y., Han S.-B. et al. Immunosuppressive characteristics of oligomycin derivatives produced by *Streptomyces lydicus* MCY-524 // J. Microbiol. Biotechnol. – 1997. – Vol. 7. – P. 56-61
22. Kim B.S., Moon S.S., Hwang B.K. Isolation, identification, and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani* // Can. J. Bot. – 1999. – Vol. 77. – P. 850-858.
23. Grammatikova N.E., Bibikova M.V., Spiridonova I.A. et al. *Streptomyces griseolus* No. 182, a new producer of oligomycin antibiotics // Antibiot. Khimioter. – 2003. – Vol. 48. – P. 11-15.
24. Wagenaar M.M., Williamson R.T., Ho D.M., Carter G.T. Structure and absolute stereochemistry of 21-Hydroxyoligomycin A // J. Nat. Prod. – 2007. – Vol. 70. – P. 367-371.
25. Yang P.W., Li M.G., Zhao J.Y. et al. Oligomycins A and C, major secondary metabolites isolated from the newly isolated strain *Streptomyces diastaticus* // Folia Microbiol. – 2010. – Vol. 55. – P. 10–16.
26. Khebizi N., Boudjella H., Bijani C. et al. Oligomycins A and E, major bioactive secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. strain HG29 isolated from a Saharan soil // J. Mycol. Med. – 2018. – Vol. 28. – P. 150-160.
27. Masamune S., Sehgal J.M., Tamelen E.E. et al. Separation and preliminary characterization of oligomycins A, B and C // J. Am. Chem. Soc. – 1958. – Vol. 80. – P. 6092-6095.
28. Beechey R.B., Williams V., Holloway C.T. et al. Estimation of the molecular weights and molecular formulae of oligomycin-A, rutamycin & aurovertin by mass spectrometry // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1967. – Vol. 26. – P. 339-341.

29. Chamberlin J.W., Gorman M., Agtarap A. Characterization of the oligomycins and related antibiotics // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1969. – Vol. 34. – P. 448-453.
30. Prouty W.F., Schnoes H.K., Strong F. M. A molecular weight revision for compounds of the oligomycin complex // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1969. – Vol. 34. – P. 511-516.
31. Prouty W.F., Thompson R.M., Schnoes H.K., Strong F.M. Oligomycin: degradation products and part structure of oligomycin B1 // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1971. – Vol. 44. – P. 619-627.
32. Von Glehn M., Norrestam R., Kierkegaard P., Maron L. Three-dimensional structure of oligomycin B // *FEBS Lett.* – 1972. – Vol. 20. – P. 267-269.
33. Arnoux B., Garcia-Alvarez M.C., Marazano C. et al. X-Ray structure of the antibiotic rutamycin // *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* – 1978. – Vol. 7. – P. 318-319.
34. Morris G.A., Richards M.S. Concerted use of two-dimensional NMR techniques in the ab initio assignment of complex spectra: complete proton and carbon-13 assignment of oligomycin A // *Magnet. Res. in Chem.* – 1985. – Vol. 23. – P. 676-683.
35. Carter G.T. Structure determination of oligomycins A and C // *J. Org. Chem.* – 1986. – Vol. 51. – P. 4264-4271.
36. Wuthier D., Keller-Schierlein W., Wahl B. Stoffwechselprodukte von mikroorganismen 227. Mitteilung. Isolierung und strukturaufklärung von rutamycin B // *Helvetica Chimica Acta.* – 1984. – Vol. 67. – P. 1208-1216.
37. Kobayashi K., Nishino C. Oligomycin E, a new antitumor antibiotic produced by *Streptomyces* sp. MCI-2225 // *J. Antibiot.* – 1987. – Vol. 40. – P. 1053-1057.
38. Laatsch H., Kellner M., Wolf G. et al. Oligomycin F, a new immunosuppressive homologue of oligomycin A // *J. Antibiot.* – 1993. – Vol. 46. – P. 1334-1341.

39. Enomoto Y., Shiomi K., Matsumoto A. et al. Isolation of a new antibiotic oligomycin G produced by *Streptomyces* sp. WK-6150 // J. Antibiot. – 2001. – Vol. 54. – P. 308-313.
40. Danilenko A.N., Bibikova M.V., Spiridonova I.A. et al. Physicochemical properties and structure of oligomycin SC-II produced by *Streptomyces virginiae* 17 // Antibiot. Khimioter. – 2012. – Vol. 57. – P. 3-7.
41. Yamazaki M., Yamashita T., Harada T. et al. 44-Homooligomycins A and B, new antitumor antibiotics from *Streptomyces bottropensis*. Producing organism, fermentation, isolation, structure elucidation and biological properties // J. Antibiot. – 1992. – Vol. 45. – P. 171-179.
42. Kim H.S., Han S.B., Kim H.M. et al. 41-Demethylhomooligomycin B, a new immunosuppressant antibiotic from *Streptomyces ostreogriseus* // J. Antibiot. – 1996. – Vol. 49. – P. 1275-1277.
43. Pat. EP0381124A2. Novel antibiotic NK130119, process for production of the same and application of the same / Harada T., Hirose K., Kurokawa T. et al. / Published 08.08.1990.
44. Pat. EP0322748A1. Antibiotic NK86-0279, process for production of the same and application of the same / Harada T., Hirose K., Kurokawa T. et al. / Published 05.07.1989.
45. Iitaka Y., Yamazaki M., Yamashita T. et al. Crystal and molecular structures of 44-homooligomycin B // Analyt. Sci. – 1991. – Vol. 7. – P. 983-985.
46. Evans D.A., Ng H.P., Rieger D.L. Total synthesis of the macrolide antibiotic rutamycin B // J. Am. Chem. Soc. – 1993. – Vol. 115. – P. 11446-11459.
47. Szilagyi L., Feher K. Oligomycins B and C: complete ab initio assignments of their ¹H and ¹³C NMR spectra and a study of their conformations in solution // J. Mol. Struct. – 1998. – Vol. 471. – P. 195-207.
48. Williamson R.T., Marquez B.L., Sosa A.C.B., Koehn F.E. Relative stereochemical determination of β -hydroxycarbonyl compounds (aldol products) utilizing the J-based configuration analysis method // Magn. Reson. Chem. – 2003. – Vol. 41. – P. 379-385.

49. Palmer R.A., Potter B.S. X-ray structures and absolute configurations of the antibiotics Oligomycins A, B and C: inhibitors of ATP synthase // *J. Chem. Crystallogr.* – 2008. – Vol. 38. – P. 243-253.
50. Palmer R.A., Ladd M., Howlin B., Lisgarten D.R. X-ray structures of two forms of the antibiotic oligomycin A: an inhibitor of ATP synthase // *Future Med. Chem.* – 2013. – Vol. 5. – P. 881-893.
51. Fredenhagen A., Derrien C., Gassmann E. An MS/MS library on an ion-trap instrument for efficient dereplication of natural products. Different fragmentation patterns for $[M+H]^+$ and $[M+Na]^+$ ions // *J. Nat. Prod.* – 2005. – Vol. 68. – P. 385-391.
52. Gierczyk B., Schroeder G., Przybylski P. et al. ESI MS, NMR and PM5 semiempirical studies of oligomycin A and its complexes with Li^+ and Na^+ cations // *J. Mol. Struct.* – 2005. – Vol. 738. – P. 261-270.
53. Przybylski P., Brzezinski B., Bartl F. Oligomycin A complex structures with some divalent metal cations studied by ESI MS and PM5 semiempirical methods // *J. Mol. Struct.* – 2007. – Vol. 830. – P. 58-71.
54. Fernandez-Chimeno R.I., Canedo L., Espliego F. et al. IB-96212, a novel cytotoxic macrolide produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities // *J. Antibiot.* – 2000. – Vol. 53. – P. 474-478.
55. Canedo L.M., Fernandez-Puentes J.L., Baz J.P. IB-96212, a novel cytotoxic macrolide produced by a marine *Micromonospora*. II. Physico-chemical properties and structure determination // *J. Antibiot.* – 2000. – Vol. 53. – P. 479-483.
56. Mukhopadhyay T., Nadkarni S.R., Patel M.V. et al. Maclafungin, a new antifungal macrocyclic lactone from *Actinomycete* sp. Y-8521050 // *Tetrahedron.* – 1998. – Vol. 54. – P. 13621–13628.
57. Sato S., Iwata F., Yamada S., Katayama M. Neomaclafungins A–I: oligomycin-class macrolides from a marine-derived actinomycete // *J. Nat. Prod.* – 2012. – Vol. 75. – P. 1974-1982.

58. Yamamoto K., Futamura Y., Uson-Lopez R.A. et al. YO-001A, a new antifungal agent produced by *Streptomyces* sp. YO15-A001 // *J. Antibiot.* – 2019. – Vol. 72. – P. 986-990.
59. Lardy H.A. Antibiotic inhibitors of mitochondrial energy transfer // *Pharmacol. Ther.* – 1980. – Vol. 11. – P. 649-660.
60. Rhodes A., Fantes K.H., Boothroyd B. et al. Venturicin: a new antifungal antibiotic of potential use in agriculture // *Nature.* – 1961. – Vol. 192. – P. 952-954.
61. Brufani M., Keller-Schierlein W., Löffler W. et al. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 69. Mitteilung [1]. Über das Venturicin B, das Botrycin und die Zuckerbausteine der Venturicine A und B // *Helv. Chim. Acta.* – 1968. – Vol. 51. – P. 1293-1304.
62. Schmitz H., Jubinski S.D., Hooper I.R. et al. Ossamycin, a new cytotoxic agent // *J. Antibiot. Ser. A.* – 1965. – Vol. 18. – P. 82-88.
63. Brufani M., Cerrini S., Fedeli W. et al. Structures of the venturicidins A and B // *Experient.* – 1971. – Vol. 27. – P. 604-606.
64. Fourati-Ben Fguira L., Fotso S., Ben Ameer-Mehdi R. et al. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80 // *Res. Microbiol.* – 2005. – Vol. 156. – P. 341-347.
65. Shaaban K., Singh S., Elshahawi S. et al. Venturicin C, a new 20-membered macrolide produced by *Streptomyces* sp. TS-2-2 // *J. Antibiot.* – 2014. – Vol. 67. – P. 223-230.
66. Laatsch H., Kellner M., Lee Y. S., Wolf G. Isolation of venturicin-X, the aglycon of venturicin A and venturicin B from *Streptomyces* sp. Z. // *Naturforsch. (B).* – 1994. – Vol. 49. – P. 977-980.
67. Kirst H.A., Mynderse J.S., Martin J.W. et al. Structure of the spiroketal-macrolide ossamycin // *J. Antibiot.* – 1996. – Vol. 49. – P. 162-167.
68. Hochlowski J.E., Mullally M.M., Brill G.M. et al. Dunaimycins, a new complex of spiroketal 24-membered macrolides with immunosuppressive

- activity. II. Isolation and elucidation of structures // *J. Antibiot.* – 1991. – Vol. 44. – P. 1318-1330.
69. Takahashi K., Yoshihara T., Kurosawa K. Ushikulides A and B, immunosuppressants produced by a strain of *Streptomyces* sp. // *J. Antibiot.* – 2005. – Vol. 58. – P. 420-424.
70. Trost B.M., O'Boyle B.M., Hund D. Total synthesis and stereochemical assignment of (–)-Ushikulide A // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 131. – P. 15061-15074.
71. Burres N.S., Premachandran U., Frigo A. et al. Dunaimycins, a new complex of spiroketal 24-membered macrolides with immunosuppressive activity. III. Immunosuppressive activities of dunaimycins // *J. Antibiot.* – 1991. – Vol. 44. – P. 1331-1341.
72. Pat. WO2011057006A2. Insecticidal fermentation broth from Actinomycetes / Guilhabert-Goya M., Jimenez J., Margolis J. et al. / Published 12.05.2011.
73. Salomon A.R., Zhang Y., Seto H., Khosla C. Structure–activity relationships within a family of selectively cytotoxic macrolide natural products // *Org. Lett.* – 2001. – Vol. 3. – P. 57-59.
74. Kihara T., Kusakabe H., Nakamura G. et al. Cytovaricin, a novel antibiotic // *J. Antibiot.* – 1981. – Vol. 34. – P. 1073-1074.
75. Sakurai T., Kihara T., Isono K. Structure of cytovaricin–acetonitrile (1:1), C₄₇H₈₀O₁₆.C₂H₃N // *Acta Cryst. Sec. C Cryst. Struct. Comm.* – 1983. – Vol. 39. – P. 295-297.
76. Kihara T., Sono K. The absolute configuration of cytovaricin: isolation of methyl β-D-cymaroside by methanolysis // *J. Antibiot.* – 1983. – Vol. 36. – P. 1236.
77. Yamashita N., Shin-Ya K., Kitamura M. et al. Cytovaricin B, a new inhibitor of JAK-STAT signal transduction produced by *Streptomyces torulosus* // *J. Antibiot.* – 1997. – Vol. 50. – P. 440-442.
78. Kirst H.A., Larsen S.H., Paschal J.W. et al. Structure of the new spiroketal-macrolide A82548A // *J. Antibiot.* – 1995. – Vol. 48. – P. 990-996.

79. Kim J.W., Adachi H., Shin-ya K. et al. Apoptolidin, a new apoptosis inducer in transformed cells from *Nocardiosis* sp // J. Antibiot. – 1997. – Vol. 50. – P. 628-630.
80. Hayakawa Y., Kim J.W., Adachi H. et al. Structure of apoptolidin, a specific apoptosis inducer in transformed cells // J. Am. Chem. Soc. – 1998. – Vol. 120. – P. 3524-3525.
81. Wender P.A., Sukopp M., Longcore K. Apoptolidins B and C: isolation, structure determination, and biological activity // Org. Lett. – 2005. – Vol. 7. – P. 3025-3028.
82. Wender P.A., Longcore K.E. Isolation, structure determination, and anti-cancer activity of apoptolidin D // Org. Lett. – 2007. – Vol. 9. – P. 691-694.
83. Wender P.A., Longcore K.E. Apoptolidins E and F, new glycosylated macrolactones isolated from *Nocardiosis* sp // Org. Lett. – 2009. – Vol. 11. – P. 5474-5477.
84. Bachmann B.O., McNees R., Melancon B.J. et al. Light-induced isomerization of apoptolidin A leads to inversion of C2–C3 double bond geometry // Org. Lett. – 2010. – Vol. 12. – P. 2944-2947.
85. Sheng Y., Fotso S., Serrill J.D. et al. Succinylated apoptolidins from *Amycolatopsis* sp. ICBB 8242 // Org. Lett. – 2015. – Vol. 17. – P. 2526-2529.
86. Nazari M., Serrill J.D., Wan X. et al. New mandelalides expand a macrolide series of mitochondrial inhibitors // J. Med. Chem. – 2017. – Vol. 60. – P. 7850-7862.
87. Lardy H.A., Johnson D., McMurray W.C. Antibiotics as tools for metabolic studies. I. A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems // Arch. Biochem. Biophys. – 1958. – Vol. 78. – P. 587 – 597.
88. Racker E. A mitochondrial factor conferring oligomycin sensitivity on soluble mitochondrial ATPase // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1963. – Vol. 10. – P. 435–439.

89. Jonckheere A.I., Smeitink J.A.M., Rodenburg R.J.T. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2012. – Vol. 35. – P. 211–225.
90. Symersky J., Pagadala V., Osowski D. et al. Structure of the c10 ring of the yeast mitochondrial ATP synthase in the open conformation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 19. – P. 485–491.
91. Devenish R.J., Prescott M., Boyle G.M., Nagley P. The oligomycin axis of mitochondrial ATP synthase: OSCP and the proton channel // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2000. – Vol. 32. – P. 507–515.
92. Green R.C.E., Thumser A.E., Povey D. et al. A comparative study of the single crystal X-ray determination and molecular modelling of the binding of oligomycin to ATP synthase // *Comp. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 33. – P. 189–195.
93. Symersky J., Osowski D., Walters D.E. et al. Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109. – P. 13961–13965.
94. Salomon A.R., Voehringer D.W., Herzenberg L.A., Khosla C. Understanding and exploiting the mechanistic basis for selectivity of polyketide inhibitors of F₀F₁-ATPase // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 97. – P. 14766–14771.
95. Madreiter-Sokolowski C.T., Gottschalk B., Parichatikanond W. et al. Resveratrol specifically kills cancer cells by a devastating increase in the Ca²⁺ coupling between the greatly tethered endoplasmic reticulum and mitochondria // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2016. – Vol. 39. – P. 1404–1420.
96. Korystov Yu.N., Kublik L.N., Kudryavtsev A.A. et al. Opposite effects of low oligomycin concentrations on the apoptosis of normal and tumor cells // *Dokl. Biol. Sci.* – 2003. – Vol. 392. – P. 475–477.
97. Chavez E., Rodriguez J., Garcia G. et al. Oligomycin strengthens the effect of cyclosporin A on mitochondrial permeability transition by inducing phosphate uptake // *Cell Biol. Int.* – 2005. – Vol. 29. – P. 551–558.

98. Morciano G., Preti D., Pedriali G. et al. Discovery of novel 1,3,8-triazaspiro[4.5]decane derivatives that target the c subunit of F₁/F₀-adenosine triphosphate (ATP) synthase for the treatment of reperfusion damage in myocardial infarction // *J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 61. – P. 7131–7143.
99. Alvarez-Calderon F., Gregory M.A., Pham-Danis C. et al. Tyrosine kinase inhibition in leukemia induces an altered metabolic state sensitive to mitochondrial perturbations // *Clin. Cancer Res.* – 2015 – Vol. 21. – P. 1360-1372.
100. MacDonald J.A., Kura N., Sussman C., Woods D.C. Mitochondrial membrane depolarization enhances TRAIL-induced cell death in adult human granulosa tumor cells, KGN, through inhibition of BIRC5 // *J. Ovarian Res.* – 2018. – Vol. 11. – P. 89.
101. He L., Jang J.H., Choi H.G. et al. Oligomycin A enhances apoptotic effect of TRAIL through CHOP-mediated death receptor 5 expression // *Mol. Carcinogen.* – 2011. – Vol. 52. – P. 85-93.
102. Mizumachi T., Suzuki S., Naito A. et al. Increased mitochondrial DNA induces acquired docetaxel resistance in head and neck cancer cells // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27. – P. 831-838.
103. Zahreddine H.A., Culjkovic-Kraljacic B., Gasiorek J. et al. GLI1-Inducible glucuronidation targets a broad spectrum of drugs // *ACS Chem. Biol.* – 2019. – Vol. 14. – P. 348-355.
104. Wenzel C., Riefke B., Gründemann S. et al. 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions // *Exp. Cell Res.* – 2014. – Vol. 323. – P.131-143.
105. De Luca A., Fiorillo M., Peiris-Pages M. et al. Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6. – P. 14777-14795.
106. Subedi A., Muroi M., Futamura Y. et al. A novel inhibitor of tumorspheres reveals the activation of the serine biosynthetic pathway upon mitochondrial inhibition // *FEBS Lett.* – 2019. – Vol. 593. – P. 763-776.

107. Seo H.-S., Journe F., Larsimont D. et al. Decrease of estrogen receptor expression and associated ERE-dependent transcription in MCF-7 breast cancer cells after oligomycin treatment // *Steroids*. – 2003. – Vol. 68. – P. 257–269.
108. Kanai M., Iba S., Okada R. et al. Oligomycin induced the proteasomal degradation of cyclin D1 protein // *J. Antibiot.* – 2009. – Vol. 62. – P. 425-429.
109. Salim A.A., Tan L., Huang X.-C. et al. Oligomycins as inhibitors of K-Ras plasma membrane localisation // *Org. Biomol. Chem.* – 2016. – Vol. 14. – P. 711-715.
110. Cho K., Casteel D.E., Prakash P. et al. AMPK and eNOS signaling regulates K-Ras plasma membrane interactions via cGMP-dependent Protein Kinase 2 // *Mol. Cell. Biol.* – 2016. – Vol. 36. – P. 3086-3099.
111. Hao W., Chang C.-P.B., Tsao C.-C., Xu J. Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 12647-12654.
112. Serrill J.D., Tan M., Fotso S. et al. Apoptolidins A and C activate AMPK in metabolically sensitive cell types and are mechanistically distinct from oligomycin A // *Biochem. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 93. – P. 251-265.
113. Tettamanti G., Malagoli D., Marchesini E. et al. Oligomycin A induces autophagy in the IPLB-LdFB insect cell line // *Cell Tissue Res.* – 2006. – Vol. 326. – P. 179–186.
114. Tettamanti G., Malagoli D., Ottaviani E., Eguileor M. Oligomycin A and the IPLB-LdFB insect cell line: Actin and mitochondrial responses // *Cell Biol. Int.* – 2008. – Vol. 32. – P. 287-292.
115. Ramio-Lluch L., Yeste M., Fernandez-Novell J.M. et al. Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2014. – Vol. 26. – P. 883-897.

116. Nohr-Meldgaard K., Ovsepián A., Ingmer H., Vestergaard M. Resveratrol enhances the efficacy of aminoglycosides against *Staphylococcus aureus* // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2018. – Vol. 52. – P. 390-396.
117. Grabowski J.M., Perera R., Roumani A.M. et al. Changes in the proteome of langat-infected *Ixodes scapularis* ISE6 Cells: metabolic pathways associated with flavivirus infection // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2016. Vol. 10. – P. e0004180.
118. Kornfuehrer T., Eustaquio A. Diversification of polyketide structures via synthase engineering // MedChemComm. – 2019. – Vol. 10. – P. 1256-1272.
119. Khosla C., Gokhale R.S., Jacobsen J.R., Cane D.E. Tolerance and specificity of polyketide synthases // Annu. Rev. Biochem. – 1999. – Vol. 68. – P. 219-253.
120. Jenke-Kodama H., Borner T., Dittmann E. Natural biocombinatorics in the polyketide synthase genes of the actinobacterium *Streptomyces avermitilis* // PLoS Comp. Biol. – 2006. – Vol. 2. – P. e132.
121. Lysenkova L.N., Turchin K.F., Korolev A.M. et al. Study on retroaldol degradation products of antibiotic oligomycin A // J. Antibiot. – 2014. – Vol. 67. – P. 153-158.
122. Lysenkova L.N., Turchin K.F., Korolev A.M. et al. A novel acyclic oligomycin A derivative formed via retro-aldol rearrangement of oligomycin A // J. Antibiot. – 2012. – Vol. 65. – P. 405-411.
123. Ramirez F., Marecek J. F., Kantor T. V. et al. Effects of borohydride-treated oligomycins on processes of energy transduction in mitochondria // Eur. J. Biochem. – 1982. – Vol. 121. – P. 275–279.
124. Pat. JPH06192266A. New derivative from antibiotic NK86-0279-I, its production and use thereof / Okada M., Shimada N., Sugi K. et al. / Published 12.07.1994.
125. Szilagyi L., Samu J., Harsanyi I. Structure elucidation of two acetylated derivatives of oligomycin A // Spectrosc. Lett. – 1995. – Vol. 28. – P. 699-707.

126. Lysenkova L.N., Turchin K.F., Danilenko V.N. et al. The first examples of chemical modification of oligomycin A // *J. Antibiot.* – 2010. – Vol. 63. – P. 17-22.
127. Lysenkova L.N., Turchin K.F., Korolev A.M. et al. Synthesis and properties of a novel brominated oligomycin A derivative // *J. Antibiot.* – 2012. – Vol. 65. – P. 223-225.
128. Lysenkova L.N., Turchin K.F., Korolev A.M. et al. Synthesis and cytotoxicity of oligomycin A derivatives modified in the side chain // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 21. – P. 2918-2924.
129. Lysenkova L.N., Godovikov I.A., Korolev A.M. et al. Synthesis and anti-actinomycotic activity of the oligomycin A thiocyanato derivative modified at 2-oxypropyl side chain // *Macroheterocycles.* – 2015. – Vol. 8. – P. 424-428.
130. Sladojevich F., Arlow S.I., Tang P., Ritter T. Late-stage deoxyfluorination of alcohols with PhenoFluor // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – Vol. 135. – P. 2470-2473.
131. Zu Y.-G., Zhao Q., Zhao X. et al. Process optimization for the preparation of oligomycin-loaded folate-conjugated chitosan nanoparticles as a tumor-targeted drug delivery system using a two-level factorial design method // *Int. J. Nanomed.* – 2011. – Vol. 6. – P. 3429-3441.
132. Park J.W., Park S.R., Han A.R. et al. Generation of reduced macrolide analogs by regio-specific biotransformation // *J. Antibiot.* – 2011. – Vol. 64. – P. 155-157.
133. Panek J.S., Jain N.F. Total synthesis of rutamycin B and oligomycin C // *J. Org. Chem.* – 2001. – Vol. 66. – P. 2747-2756.
134. White J.D., Hanselmann R., Jackson R.W. et al. Total synthesis of rutamycin B, a macrolide antibiotic from *Streptomyces aureofaciens* // *J. Org. Chem.* – 2001. – Vol. 66. – P. 5217-5231.
135. Wender P.A., Gullledge A.V., Jankowski O.D., Seto H. Isoapoptolidin: structure and activity of the ring-expanded isomer of apoptolidin // *Org. Lett.* – 2002. – Vol. 4. – P. 3819-3822.

136. Pennington J.D., Williams H.J., Salomon A.R., Sulikowski G.A. Toward a stable apoptolidin derivative: identification of isoapoptolidin and selective deglycosylation of apoptolidin // *Org. Lett.* – 2002. – Vol. 4. – P. 3823-3825.
137. Wender P.A., Jankowski O.D., Tabet E.A., Seto H. Facile synthetic access to and biological evaluation of the macrocyclic core of apoptolidin // *Org. Lett.* – 2003. – Vol. 5. – P 2299-2302.
138. Chau S.T., Sulikowski G.A., Wu B. Studies on the synthesis of the apoptolidins // *Strategies and Tactics in Organic Synthesis.* – 2012. – Vol.8. – P. 375-394.
139. Daniel P.T., Koert U., Schuppan J. Apoptolidin: induction of apoptosis by a natural product // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2006. – Vol. 45. – P. 872-893.
140. Nicolaou K.C., Li Y., Sugita K. et al. Total synthesis of apoptolidin: completion of the synthesis and analogue synthesis and evaluation // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – Vol. 125. – P. 15443-15454.
141. Wehlan H., Dauber M., Fernaud M.-T.M. et al. Total synthesis of apoptolidin // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2004. – Vol. 43. – P. 4597-4601.
142. Wehlan H., Dauber M., Fernaud M.T.M. et al. Apoptolidin A: total synthesis and partially glycosylated analogues // *Chem. Eur. J.* – 2006. – Vol. 12. – P. 7378-7397.
143. Pat. US6747011B1. Antitumor drugs and methods / Zhang J.H. / Published 08.06.2004.
144. Ghidu V.P., Wang J., Wu B. et al. Synthesis and evaluation of the cytotoxicity of apoptolidinones A and D // *J. Org. Chem.* – 2008. – Vol. 73. – P. 4949-4955.
145. Ghidu V.P., Ntai I., Wang J. et al. Combined chemical and biosynthetic route to access a new apoptolidin congener // *Org. Lett.* – 2009. – Vol.11. – P. 3032-3034.
146. Wender P.A., Jankowski O.D., Tabet E.A., Seto H. Toward a structure–activity relationship for apoptolidin: selective functionalization of the hydroxyl group array // *Org. Lett.* – 2003. – Vol. 5. – P. 487-490.

147. Lewis C.A., Longcore K.E., Miller S.J., Wender P.A. An approach to the site-selective diversification of apoptolidin A with peptide-based catalysts // *J. Nat. Prod.* – 2009. – Vol. 72. – P. 1864-1869.
148. Wender P.A., Jankowski O.D., Longcore K. et al. Correlation of F₀F₁-ATPase inhibition and antiproliferative activity of apoptolidin analogues // *Org. Lett.* – 2006. – Vol. 8. – P. 589-592.
149. Du Y., Derewacz D.K., DeGuire S.M. et al. Biosynthesis of the apoptolidins in *Nocardiosis* sp. FU 40 // *Tetrahedron.* – 2011. – Vol. 67. – P. 6568-6575.
150. DeGuire S.M., Earl D.C., Du Y. et al. Fluorescent probes of the apoptolidins and their utility in cellular localization studies // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2014. – Vol. 54. – P. 961-964.
151. Chong K.M., Leelatian N., Deguire S.M. et al. The use of fluorescently-tagged apoptolidins in cellular uptake and response studies // *J. Antibiot.* – 2016. – Vol. 69. – P. 327–330.
152. Nguyen M.H., Imanishi M., Kurogi T. et al. Synthetic access to the mandelalide family of macrolides: development of an anion relay chemistry strategy // *J. Org. Chem.* – 2018. – Vol. 83. – P. 4287-4306.
153. Saksena A.K., Mangiaracina P. Recent studies on veratrum alkaloids: a new reaction of sodium triacetoxyborohydride [NaBH(OAc)₃] // *Tetrahedron Lett.* – 1983. – Vol. 24. – P. 273-276.
154. Carey J.S., Laffan D., Thomson C., Williams M.T. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules // *Org. Biomol. Chem.* – 2006. – Vol. 4. – P. 2337-2347.
155. Parker R.E., Isaacs N.S. Mechanisms of epoxide reactions // *Chem. Rev.* – 1959. – Vol. 59. – P. 737-799.
156. Bouchez L.C., Rusch M., Larraufie M.-H. Diels-Alder Cycloaddition in Medicinal Chemistry // *Curr. Org. Chem.*, 2016, 20(22), 2358 – 2378.
157. Schrödinger: Maestro. – New York, NY: Schrödinger, LLC, 2016. – Retrieved from <http://www.scipy.org/>.

158. Parish C., Lombardi R., Sinclair K., Smith E., Goldberg A., Rappleye M., Dure M. A comparison of the Low Mode and Monte Carlo conformational search methods // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. – 2002. – Vol. 21, № 2. – P. 129–150.
159. Yuan X., Xia Y., Lu P. et al. Synthesis and evaluation of ¹H-pyrrole-2,5-dione derivatives as cholesterol absorption inhibitors for suppressing the formation of foam cells and inflammatory response // *Bioorg. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 26. – P. 1435-1447.
160. Kim J.K., Choi M.J., Shin J.-S. et al. Synthesis, biological evaluation, and docking analysis of a novel family of 1-methyl-1H-pyrrole-2,5-diones as highly potent and selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2014. – Vol. 24. – P. 1958-1962.
161. Matuszak N., Muccioli G.G., Labar G., Lambert D.M. Synthesis and in vitro evaluation of N-substituted maleimide derivatives as selective monoglyceride lipase inhibitors // *J. Med Chem.* – 2009. – Vol. 52. – P. 7410-7420.
162. E. Schweizer, A. Hoffmann-Roder, J.A. Olsen et al. Multipolar interactions in the D pocket of thrombin: large differences between tricyclic imide and lactam inhibitors // *Org. Biomol. Chem.* – 2006. – Vol. 4. – P. 2364-2375.
163. Seeman J.I. The Curtin-Hammett principle and the Winstein-Holness equation: new definition and recent extensions to classical concepts // *J. Chem. Educ.* – 1986. – Vol. 63(1). – P. 42.
164. Seeman J.I., Farone W.A. Analytical solution to the Curtin-Hammett/Winstein-Holness kinetic system // *J. Org. Chem.* – 1978. – Vol. 43. – P. 1854–1864.
165. Seeman J.I. Effect of Conformational Change on Reactivity in Organic Chemistry. Evaluations, Applications, and Extensions of Curtin-Hammett Winstein-Holness Kinetics // *Chem. Rev.* – 1983. – Vol. 83. – P. 83–134.
166. Medvedev M.G., Zeifman A.A., Novikov F.N., Bushmarinov I.S., Stroganov O.V., Titov I.Yu., Chilov G.G., Svitanko I.V. Quantifying Possible Routes for

SpnF-Catalyzed Formal Diels–Alder Cycloaddition // J. Am. Chem. Soc. – 2017. – Vol. 139. – P. 3942–3945.

167. Landini D., Quici S., Rolla F. A convenient synthesis of optically active secondary alkyl halides under phase-transfer conditions synthesis // Synthesis. – 1975. – Vol. 1975(7). – P. 430-431.
168. Rautio J., Kumpulainen H. Heimbach T., et al. Prodrugs: design and clinical applications // Nat. Rev. Drug Disc. – 2008. – Vol. 7. – P. 255-270.