



УДК 577.182.82.03:577.151.33:577.18

НЕОБЫЧНАЯ РЕАКЦИЯ АМИДИРОВАНИЯ АСПАРАГИНСОДЕРЖАЩИХ ГЛИКОПЕПТИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ В ПРИСУТСТВИИ ГЕКСАФТОРФОСФАТА (БЕНЗОТРИАЗОЛ-1-ИЛ)ОКСИ-ТРИС(ПИРРОЛИДИНО)ФОСФОНИЯ (РУВОР)

© 2013 г. Е. Н. Олсуфьева[#], С. Е. Соловьева, М. И. Резникова,
А. М. Королев, М. Н. Преображенская

Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН,
119021, Москва, Б. Пироговская ул., 11

Поступила в редакцию 03.07.2012 г. Принята к печати 03.08.2012 г.

Конденсирующий реагент гексафторфосфат бензотриазол-1-илокси-трис(пирролидино)фосфония (РуВОР) широко применяется в синтезе различных пептидов и их амидов, в частности карбоксамидов антибиотиков-гликопептидов группы ванкомицина и тейкопланина. Амидирование карбоксильной группы 7-го аминокислотного остатка (АК7) антибиотиков аминами в присутствии РуВОР обычно не сопровождается образованием заметных количеств побочных продуктов. Однако, при синтезе амидов эремомицина с объемными заместителями (адамантил, децил и др.) при использовании РуВОР при pH ~ 8.5 (Et_3N или $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$) был обнаружен побочный продукт, который был выделен и охарактеризован как незамещенный АК7-амид эремомицина. Взаимодействие Asp-содержащих антибиотиков эремомицина или ванкомицина с избытком реагента РуВОР и Et_3N (pH ~ 8.5) в отсутствие амина или аммиака приводило к образованию еще больших количеств соответствующих незамещенных АК7-амидов (~20%). Их строение установлено методами ^1H -ЯМР и ESI MS, а также доказано сравнением с аутентичными образцами. Предполагается, что источником аммиака в необычной реакции амидирования Asp-содержащих антибиотиков служит амидная группа остатка Asn (АК3).

Ключевые слова: антибиотики-гликопептиды; ванкомицин; эремомицин; амидирование; гексафторфосфат бензотриазол-1-илокси-трис(пирролидино)фосфония (РуВОР).

DOI: 10.7868/S0132342313020097

ВВЕДЕНИЕ

Высокоактивный конденсирующий реагент гексафторфосфат (бензотриазол-1-ил)окси-трис(пирролидино)фосфония (РуВОР) широко применяется в синтезе различных пептидов и их

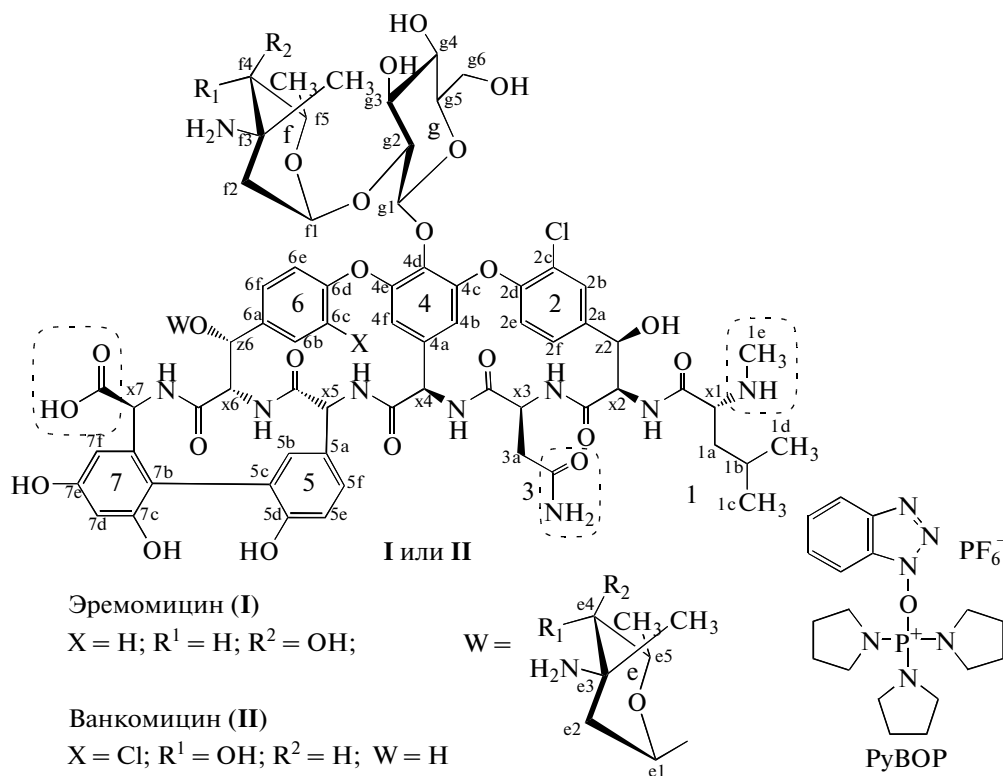
амидов [1, 2]. Реагент также широко используется в синтезе карбоксамидов антибиотиков-гликопептидов ванкомицинового и тейкопланинового типа [3–6].

Ранее при амидировании незащищенного антибиотика тейкопланиновой группы – А40926 в присутствии РуВОР был идентифицирован побочный продукт (схема 1): в результате отщепления молекулы воды формировался дополнительный цикл, соединяющий аминокислотные остатки 6 и 7 (АК6 и АК7) пептидного кора с образованием 3-оксазолин-5-он-производного антибиотика [7]. В другом эксперименте получено триспирролидинфосфониевое производное А40926, содержащее присоединенный по фенольному гидроксилу бокового радикала АК3 антибиотика фосфониевый фрагмент реагента [4].

Сокращения: GISA – стафилококки *S. aureus* с промежуточным уровнем устойчивости к гликопептидам; GRE – гликопептидрезистентные энтерококки; GRS – гликопептидрезистентные стафилококки; GSE – энтерококки, чувствительные к антибиотикам гликопептидной группы; iGln – изоглутамин; MS – масс-спектрометрия; ESI – ионизация электрораспылением; РуВОР – гексафторфосфат (бензотриазол-1-ил)окси-три(пирролидино)фосфония; DPPA – дифенилфосфорилазид; АК – остатки аминокислот; МПК (мкг/мл) – минимальная подавляющая концентрация антибиотика.

*Работа была представлена на 12th International Conference on the Chemistry of Antibiotics and other Bioactive Compounds (ICCA-12) Berlin-Germany 11th Sept-14th Sept. 2011, P. 36.

[#]Автор для связи: (тел.: (499)246-06-36, факс: (499)245-02-95; эл. почта: eolsufeva@list.ru).



Выделены функциональные группы, показанные на схеме 2.

Антибиотики ванкомицинового типа – эремомицин (I) и ванкомицин (II) отличаются от антибиотиков тейкопланинового типа строением аминокислот 1 и 3 (АК1 и АК3), в частности, в качестве АК3 они имеют остаток Asp. Антибиотики обоих типов имеют одинаковые фраг-

менты структуры, поэтому можно предположить, что в случае эремомицина и ванкомицина реакция амидирования в присутствии PyBOP также может протекать с образованием побочных продуктов, подобных представленным на схеме 1.

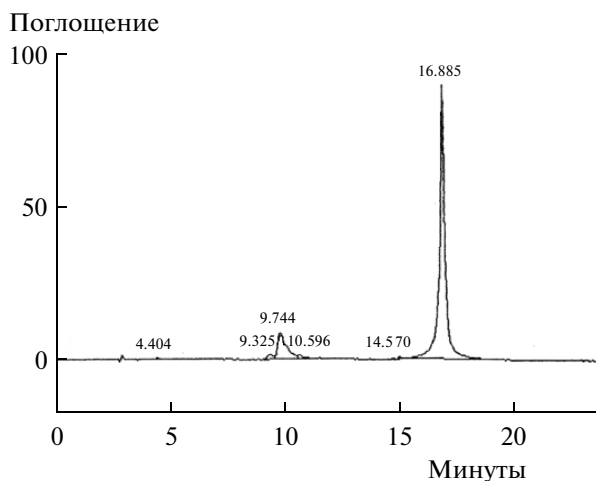


Рис. 1. Хроматограмма ВЭЖХ неочищенного продукта реакции (I) с адамантил-2-амином в присутствии PyBOP и Et_3N (pH ~ 8.5) в DMSO. Система А: R_t 9.74 мин (Ia) (~10%, отмечено звездочкой) и 16.88 мин (Ib) (~80%).

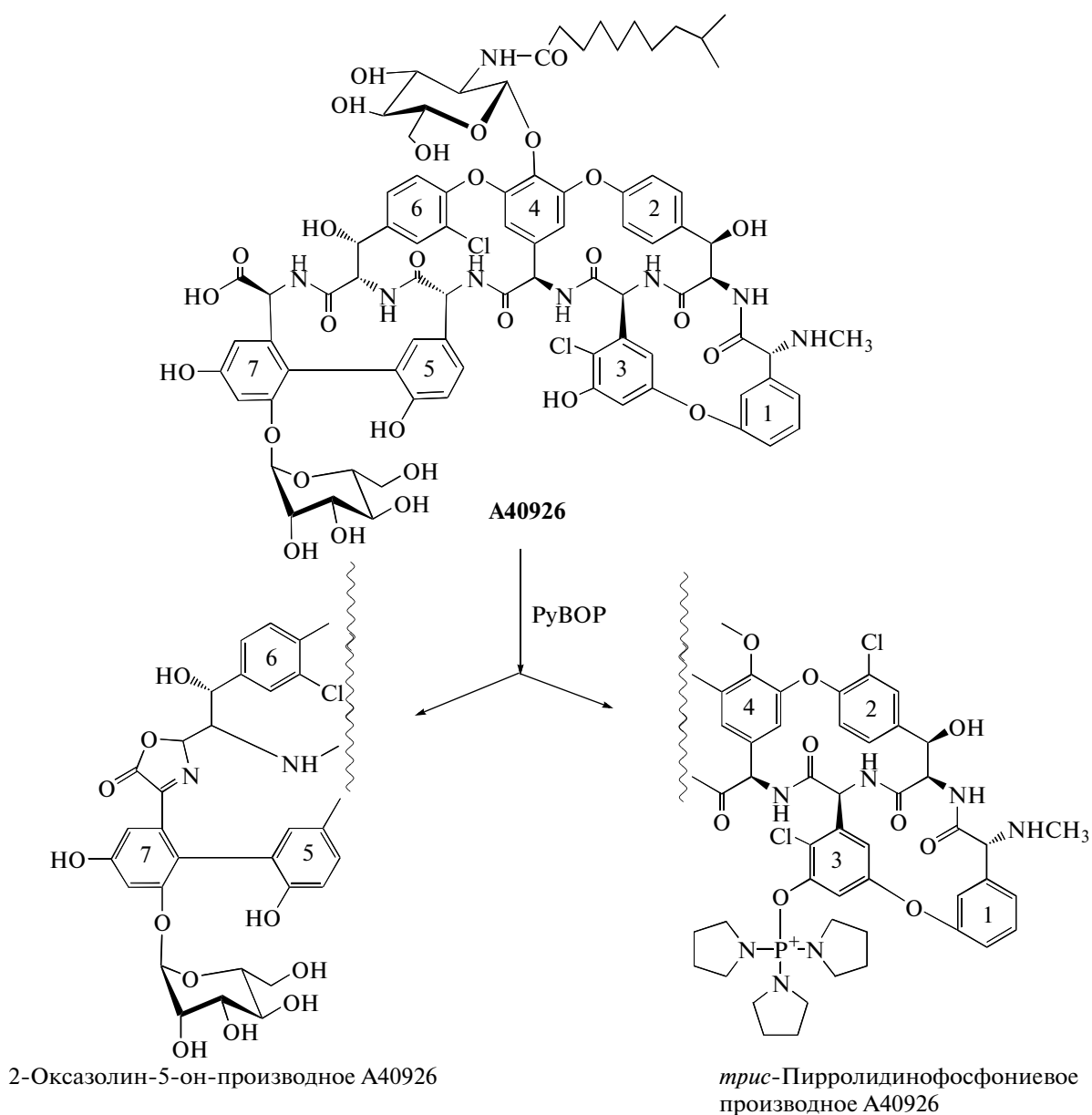


Схема 1. Образование 2-оксазолин-5-онового [7] и трис-пирролидинофосфониевого [4] производных А40926 под действием реагента PyBOP.

Ранее было показано, что амидирование эремомицина (**I**) или ванкомицина (**II**) алифатическими аминами, содержащими заместители небольших размеров, в присутствии реагента PyBOP практически не затрагивает другие реакционноспособные группы антибиотиков, протекает с хорошими выходами конечных целевых соединений и не сопровождается образованием заметных количеств побочных продуктов [5, 8]. Однако, в тех же условиях при использовании в реакции пространственно затрудненного адамантил-2-амина, помимо целевого адамантил-2-амида эремомицина (**16**) (~80%, ВЭЖХ, рис. 1) происходило образование

заметных количеств побочного соединения (~10%) (рис. 1). Его аналитические и биологические свойства практически совпадали со свойствами исходного (**I**). Ввиду разницы в масс-спектрах побочного продукта и исходного (**I**) на одну единицу было предположено, а затем доказано, что это соединение представляет собой незамещенный амид эремомицина (**1a**). Образец этого соединения оказался идентичным ранее описанному в литературе амиду (**1a**), полученному нами стандартными методами взаимодействием эремомицина (**I**) с хлоридом аммония при pH ~ 8–9,

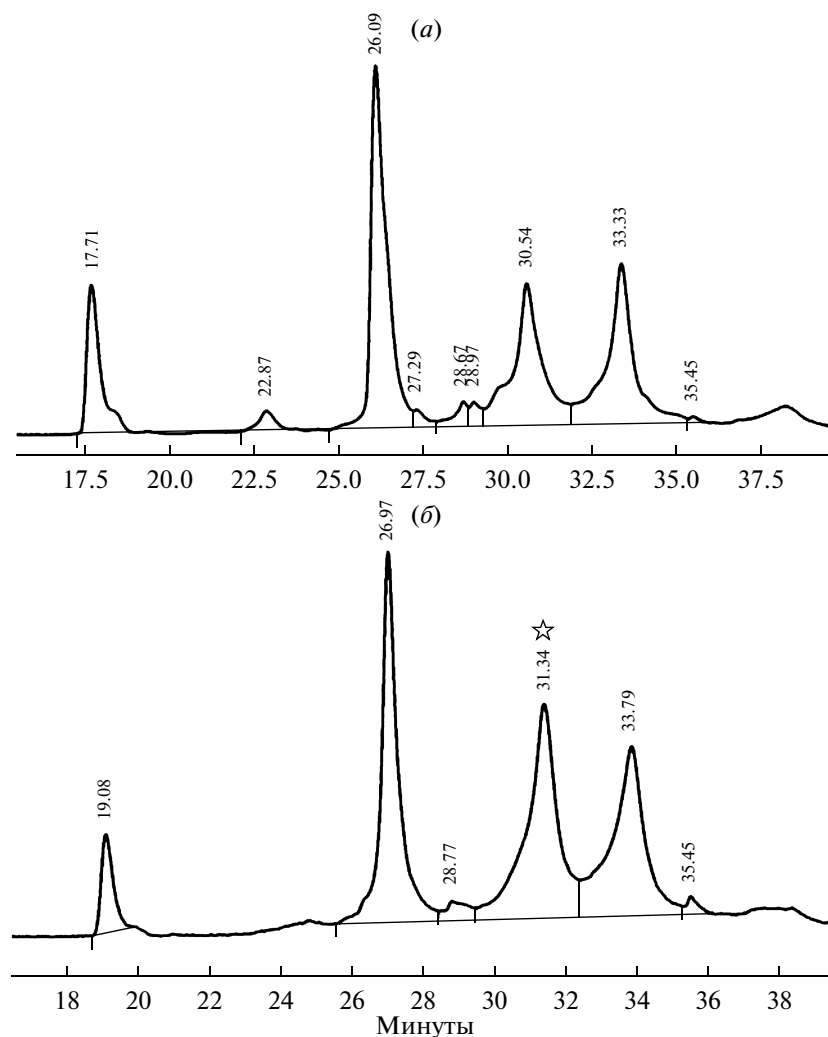


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограмма в системе Б (а) неочищенного продукта, образующегося при обработке **(I)** 4-кратным избытком реагента РуВОР и Et_3N ($\text{pH} \sim 8.5$) в DMSO (23°C , 1 ч) (схема 3) в отсутствие других аминов и аммиака [R_t 26.09 мин, 33.42% (**I**); 30.54 мин, 23.31% (**Ia**)]; (б) искусственной смеси продукта реакции (а) и заводского образца амида (**Ia**): $R_t = 31.34$ мин, 36.60% (отмечено звездочкой). Примечание: пики эремомицина и его производных на ВЭЖХ-хроматограммах имеют широкую форму и вследствие этого значения R_t одного и того же соединения может колебаться от опыта к опыту в пределах единицы, по-видимому, из-за склонности этих соединений к образованию молекулярных димеров [10,11].

в присутствии реагентов РуВОР [8] или дифенилфосфорилазида (DPPA) [9].

Детальное изучение реакции амидирования антибиотиков-гликопептидов заслуживает особого внимания, поскольку в опытах *in vitro* и *in vivo* ранее было показано, что амиды, содержащие объемные гидрофобные заместители (адамантил и др.), активны в отношении гликопептидоустойчивых клинических штаммов грамположительных бактерий: стафилококков, энтерококков [3–5] и сибирской язвы [6]. Также возник вопрос, каким образом могло образоваться соединение (**Ia**) в стандартных условиях получения адамантил-2-амида эремомицина (**Ib**).

Настоящая работа посвящена изучению этой необычной реакции амидирования эремомицина (**I**) и ванкомицина (**II**) в присутствии реагента РуВОР при $\text{pH} \sim 8.5$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было изучено взаимодействие антибиотиков (**I**) или (**II**) с избытком РуВОР при $\text{pH} \sim 8.5$ в DMSO в условиях, исключающих присутствие аммиака. Обработка эремомицина (**I**) 4-кратным избытком реагента РуВОР в присутствии Et_3N ($\text{pH} \sim 8.5$) в отсутствие других аминов или аммиака давало сложную смесь компонентов (ВЭЖХ, рис. 2 и 3).

Два главных компонента ($R_t = 26.09$ и 30.54 мин) были идентифицированы нами путем сравнения с соответствующими аутентичными образцами как непрореагировавший исходный антибиотик (**I**) и

амид эремомицина (**Ia**) (схема 2). Отнесение пика амида (**Ia**) ($R_t = 30.23$) осуществлено методом ВЭЖХ добавлением заведомого (**Ia**) ($R_t = 30.43$) к неочищенной смеси ($R_t = 31.34$), (рис. 2).

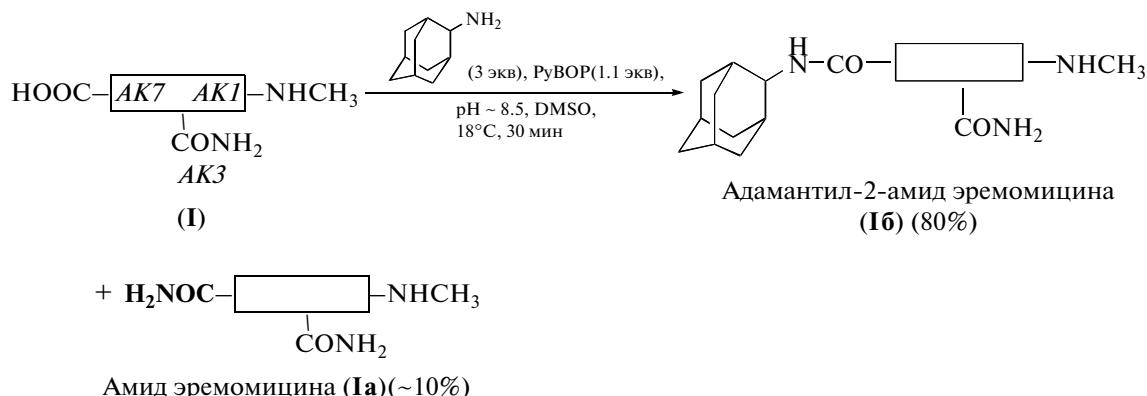


Схема 2. Синтез адамантил-2-амида эремомицина (**Ib**) и образование побочного амида (**Ia**), выходы – по данным ВЭЖХ (рис. 1).

Масс-спектр образца продукта, полученного в результате обработки эремомицина (**I**) 4-кратным избытком PyBOP при pH ~ 8.5, сравнили с масс-спектром заведомых образцов (**I**) и (**Ia**). Соответствующие значения m/z совпали между собой и с теоретически рассчитанными (см. экспериментальную часть).

Аналогичный результат был получен в опыте с ванкомицином (**II**) при его обработке 4-кратным избытком PyBOP и Et₃N (pH ~ 8.5) в отсутствие амина или аммиака (схема 2). Соединения (**II**) и (**IIa**) были идентифицированы путем сравнения с соответствующими аутентичными образцами как непрореагировавший исходный ванкомицин (**II**) и его амид (**IIa**). Индивидуальный образец амида ванкомицина (**IIa**) был получен стандартным методом [7] (см. эксперимент. часть). Отнесение пика амида (**IIa**) ($R_t = 15.40$ мин) подтверждено методом ВЭЖХ при добавлении заведомого (**IIa**) ($R_t = 15.21$ мин) к неочищенной смеси (рис. 3). Масс-спектр образца продукта, полученного в результате обработки ванкомицина (**II**) 4-кратным избытком реагента PyBOP при pH ~ 8.5, сравнили с масс-спектрами заведомых образцов (**II**) и (**IIa**). Соответствующие значения m/z совпали между собой и с теоретически рассчитанными (см. эксперимент. часть).

Изучение ¹H-ЯМР-спектров подтверждает строение амидов (**Ia**) и (**IIa**) (табл. 1). ¹H-ЯМР-спектры соединений (**Ia**) и (**I**) близки. ¹H-ЯМР-спектр амида (**IIa**) также близок спектру (**Ia**), но отличается в области аминоксахара и в области хлорсодержащего ароматического кольца АК6. Сигналы “e” аминоксахара остатка АК6 (W = аминоксахар,

см. формулу (**I**) при ~1.25–5.26 м.д. присутствуют в спектрах (**I**) и (**Ia**), и отсутствуют в спектре (**IIa**) (W = H). Сигналы при ~5.5–8.0 м.д. отнесены к ароматическим протонам АК2 и АК4–АК7 соединений (**I**) или (**Ia**) (14 H) и (**IIa**) (13 H). Геминальная константа J_{gem} сигналов метиленовой группы остатка Asn (AK3) 3a,a' имеет значение ~7 Гц для всех соединений. Сигналы g1 (1H) – при ~5.5 и g2–g6 (5 H) остатка глюкозы имеют значения ~3.6–4.1 м.д. для всех соединений; сигналы шести α -CH-групп (x2–x7) пептидного остова – ~4.0–6.5 м.д. для всех соединений.

Образцы амида (**Ia**) полностью совпадают по данным ВЭЖХ с образцом амида (**Ia**), содержащего ¹⁵N-атом в амиде остатка Asn и C-концевой АК7, полученным нами ранее независимым методом и изученным методом ¹H- и ¹⁵N-ЯМР [8]. Две группы сигналов при 7.80, 7.30 и 110.25 м.д. и при 7.35, 6.60 и 113.45 м.д. в спектрах меченного ¹⁵N амида (**Ia**) указывают на присутствие амидных групп в АК7 и АК3, соответственно.

На основании полученных данных сделан вывод о том, что образование амидов (**Ia**) или (**IIa**) под действием реагента PyBOP при pH ~ 8.5 возможно только в присутствии аммиака (схема 3), который вероятнее всего образуется в результате дезаминирования боковой амидной группы остатка Asn (AK3) антибиотиков. Такое превращение Asn- или Gln-содержащих пептидов в водных растворах известно как реакция транспептидации [12, 13], которая была также подробно описана для антибиотиков-гликопептидов ванкомициновой группы [14–16].

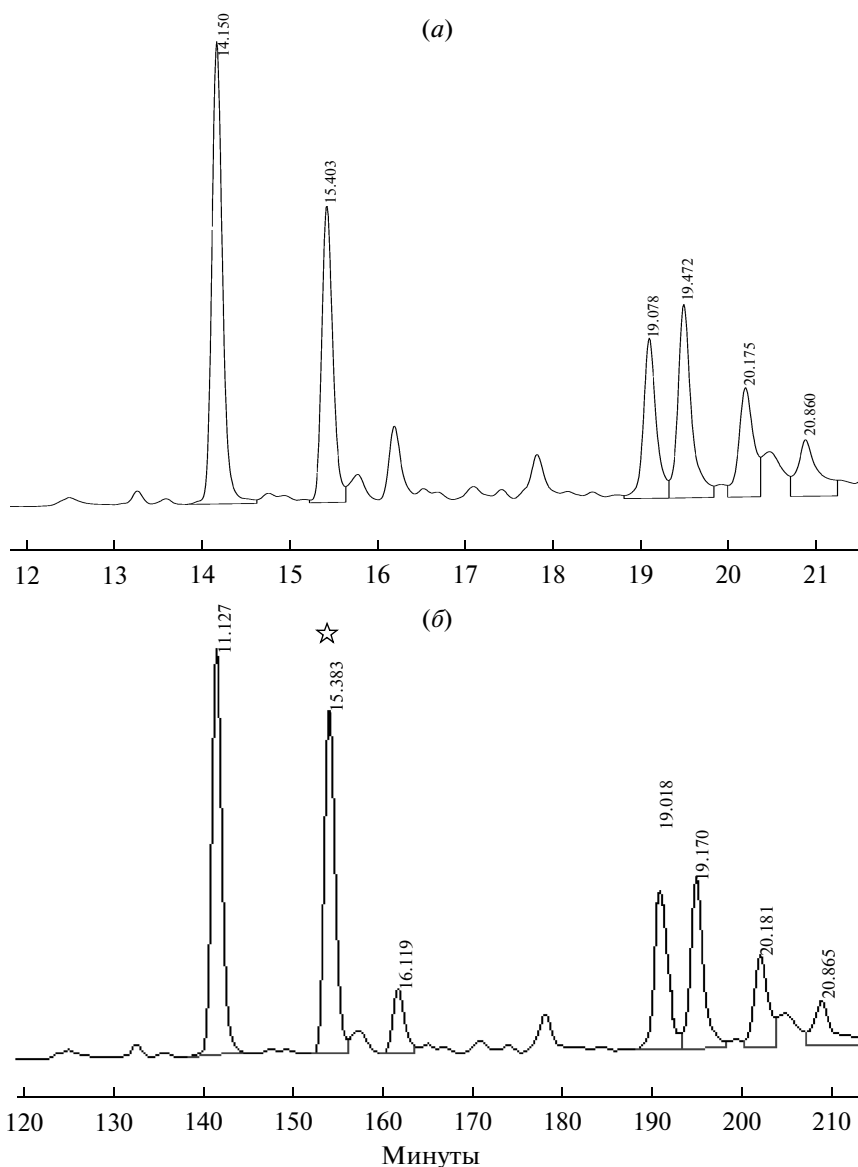


Рис. 3. ВЭЖХ хроматограмма в системе В: (а) неочищенного продукта, образующегося при обработке (II) 4-кратным избытком РуВОР и Et₃N (pH ~ 8.5) в DMSO (23°C, 1 ч) в отсутствие других аминов и аммиака (схема 3): [R_t 14.15 мин, 28.28% (II); 15.40 мин, 18.63% (IIa)] и (б) искусственной смеси продукта реакции (а) и заведомого образца амида (IIa) [R_t = 15.38 мин, 25.12% (отмечено звездочкой)].

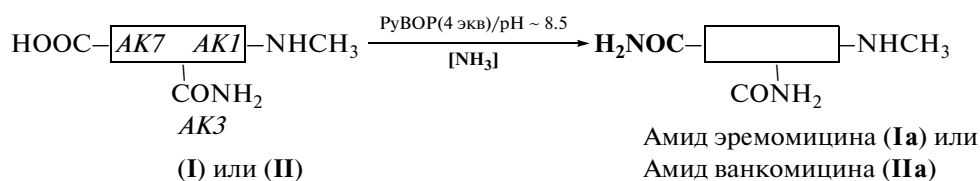


Схема 3. Образование амидов (Ia) или (IIa) в присутствии РуВОР и Et₃N (pH ~ 8.5) при взаимодействии антибиотиков (I) или (II) с аммиаком (ВЭЖХ на рис. 2 и 3).

На схеме 4 представлены наиболее вероятные продукты дезаминирования антибиотика в щелочной среде. На первом этапе предположительно образуется сукцинимидное производное, ко-

торое далее в присутствии воды легко превращается в равновесную смесь двух атропоизомерных форм изоаспартата (за счет вращения хлорсодержащего ароматического радикала АК2). Вода все-

Таблица 1. Химические сдвиги ^1H -ЯМР-спектров амидов (**Ia**) и (**IIa**) в сравнении со спектром эритромицина (**I**)

Сигнал	(I) ^{a)} D ₂ O, 70°C	(Ia) H ₂ O/D ₂ O, 9 : 1, 27°C	(IIa) D ₂ O, 40°C
Протоны гептапептидного остова^{б,в)}			
1a,a'	1.88	1.61	1.81
1b	1.73	1.49	1.51
1c,1d	0.96	0.85	0.96
1e	2.89	2.72	2.82
3a,a'	2.67	2.46	2.80
z2	5.59	5.44	5.58
z6	5.47	5.26	5.50
x1	4.24	4.21	4.30
Протоны углеводных остатков^{г)}			
e1	5.08	4.97	
e2	2.39, 2.54	2.14, 2.22	
e4	3.53	3.38	
e5	3.85	3.55	
CH ₃ e3	1.68	1.60	
CH ₃ e5	1.42	1.25	
f1	5.37	5.26	5.42
f2	2.14, 2.36	2.30, 2.52	2.16, 2.38
f4	3.48	3.38	3.41
f5	4.58	4.40	4.80
CH ₃ f3	1.40	1.38	1.48
CH ₃ f5	1.28	1.28	1.28

a) ^1H -ЯМР-спектр (**I**) (500 МГц) опубликован в работе [10].

б) Протоны ароматической области АК2 и АК4-АК7 (14 Н для (**Ia**) и (13 Н) для (**IIa**) зарегистрированы при ~5.5–8.0 м.д. Сигналы шести α -СН-групп (α 2~ α 7) пептидного остова – при ~4.0–6.5 м.д. для всех соединений.

в) Аутентичный образец (**Ia**), содержащий ^{15}N -атом в обеих амидных группах остатков АК7 (т.е. в С-концевой группе пептидного остова) и АК3 (т.е. в Asn) был получен и изучен нами ранее методом ^1H - и ^{15}N -ЯМР [8]. Две группы сигналов при 7.80, 7.30 и 110.25 м.д. и при 7.35, 6.60 и 113.45 м.д. в спектрах меченного ^{15}N (**Ia**) указывали на присутствие амидных групп в АК7 и АК3, соответственно. Константа J_{gem} сигнала СН₂-группы (3a,a') остатка Asn (АК3) соединений (**Ia**), (**IIa**) и (**I**) имеет одинаковое значение ~7 Гц.

г) Сигналы g1 (1 Н) и g2–g6 остатка глюкозы (5 Н) соединений (**Ia**), (**IIa**) и (**I**) присутствуют в спектре при ~5.5 и ~3.6–4.1 м.д., соответственно.

гда содержится в некотором количестве в образцах исходных антибиотиков. В случае амидирования эремомиицина (**I**) пространственно затрудненным адамантил-2-амином при рН ~8.5 в присутствии РуВОР образование побоч-

ного продукта (**Ia**) можно объяснить тем, что выделяющийся при дезаминировании остатка АЗ аммиак вступает в реакцию с исходным (**I**) быстрее, чем амин, несущий объемный радикал.

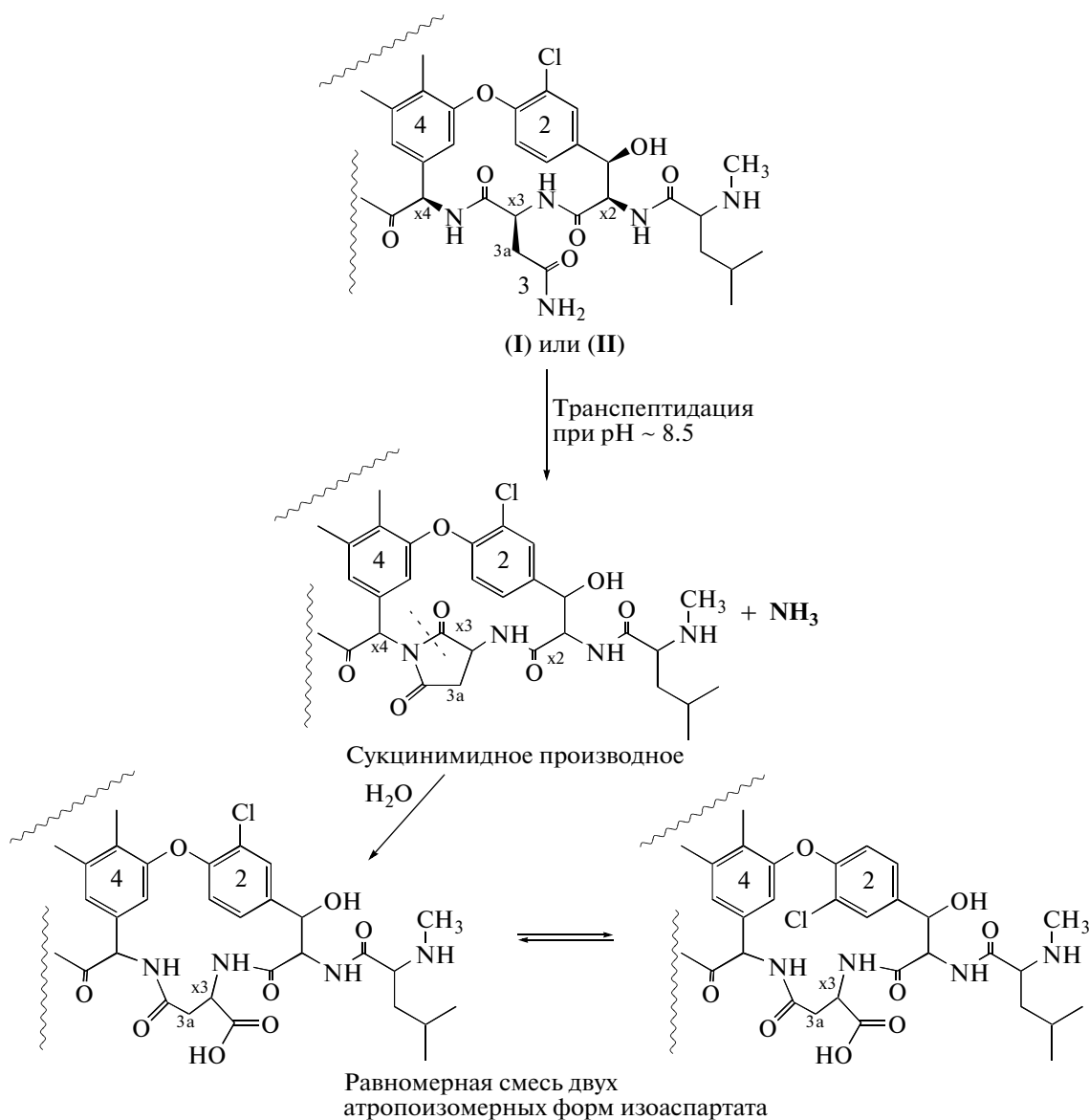


Схема 4. Дезаминирование антибиотиков (I) и (II) с образованием аммиака и возможные структуры продуктов дезаминирования гликопептидных антибиотиков ванкомицинового типа в щелочной среде: сукцинимидное производное и равновесная смесь двух атропизомерных форм изоаспартата.

Незамещенные амиды гликопептидных антибиотиков (Ia) и (IIa) обладают высокой антибактериальной активностью, сравнимой с активностью исходных антибиотиков (MICs ~0.13–4 мкг/мл) (табл. 2), поэтому в процессе получения амидов этих антибиотиков с объемными заместителями необходим тщательный контроль над образованием побочных амидов (Ia) и (IIa).

Нельзя также исключить возможности протекания побочных реакций подобного рода при использовании высокоактивных конденсирующих агентов (фосфониевого типа – PyBOP) или (урониевого типа – TBTU) в синтезе различных оли-

гопептидов или их амидов, содержащих незащищенные остатки Asn или Gln.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы: сульфат эремомицина (I) (содержание воды по Фишеру ~12 моль на 1 моль антибиотика), полученный на опытной установке НИИНА им. Г.Ф. Гаузе РАМН. Все реагенты и растворители были предоставлены фирмами “Aldrich” (США), “Fluka” (Швейцария) или “Merck” (Германия); гидрохлорид ванкомицина (II) (содержание воды по Фишеру ~4 моль на 1 моль антибиотика) – фирмой “Sigma” (США). Полноту про-

Таблица 2. Антибактериальная активность (МПК, мкг/мл) амидов (**Ia**) и (**IIa**) в сравнении с антибиотиками (**I**) и (**II**)

Соединение	533 <i>S.</i> ^{a)} <i>epidermidis</i>	602 <i>S.</i> ^{a)} <i>haemolyticus</i>	3797 <i>S.</i> ^{a)} <i>aureus</i> (GISA) ^{b)}	3798 <i>S.</i> ^{a)} <i>aureus</i> (GISA) ^{b)}	568 <i>E.</i> ^{b)} <i>faecium</i> (GSE)	559 <i>E.</i> ^{b)} <i>faecalis</i> (GSE)
Эремомицин (I)	0.25	0.25	4	4	0.25	0.13
(Ia)	0.13	0.13	0.25	0.5	0.25	0.25
Ванкомицин (II)	1	1	16	8	1	1
(IIa)	1	0.5	2	8	2	1

a) *S.* – *Staphylococcus*. *E.*^{b)} – *Enterococcus*. ^{b)} 3797 *S. aureus* (HIP-5836 New Jersey) and 3798 *S.* (HIP-5827 Michigan). Все штаммы – клинические изоляты.

хождения реакций, а также чистоту полученных соединений контролировали методом ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu LC-10 (Япония) при длине волны 280 нм (детектор Shimadzu SPD-10A). Подвижная фаза 0.6% HCOONH₄, pH 7.8 и градиент концентрации MeCN: 8–70% за 30 мин, и 70–90% за 10 мин (система А) или 8–15% за 15 мин, 15–40% за 15 мин, 40–70% за 10 мин (система Б). Система В: 1% H₂PO₄NH₄, pH 4.5 и градиент концентрации MeCN 8–40% за 30 мин и далее 40% – 5 мин. Скорость потока для всех систем 1.0 мл/мин. Для систем А и В использовали колонку Kromasil 110A-C18 размером 4.6 × 250 мм, зернением 5μ (БиоХимМак СТ, Россия). Для системы Б использовали колонку Grace Smart C-18, размером 4.0 × 250 мм, зернением 5μ (Grace, США).

Препаративное выделение и очистку соединений осуществляли на колонках, снабженных регистрирующим устройством LKB Uvicord 2138 с Recorder 6520. В качестве носителей использовали силианизированный силикагель Kieselgel 60 silanisiert, 0.063–0.200 мм (Merck, Германия). Масс-спектры получали при ионизации электрораспылением (ESI MS) на приборе Bruker “micrOTOF-Q II” (Bruker Daltonics GmbH, Бремен, Германия); образцы растворяли в водном MeOH или MeCN (0.1 мг/мл) и анализировали, вводя со скоростью 3 мкл/мин. Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометрах ЯМР Bruker DRX 500 (Германия) и Varian Unity+400 (Швейцария).

Адамантил-2-амид эремомицина (Ib) получен как описано в работе [6]. В процессе очистки сырого продукта (чистота ~80% по ВЭЖХ, рис. 1) на колонке с силианизированным силикагелем помимо целевого соединения (**Ib**) (выход по массе 62%, чистота 97% по ВЭЖХ) было выделено соединение (выход по массе ~5%, чистота 95% по ВЭЖХ), которое по всем характеристикам соответствовало амиду эремомицина (**Ia**), полученному прямым синтезом, описанным в работах [7, 8], а также в результате взаимодействия исходного (**I**) с избытком РуВОР в присутствии Et₃N (pH ~ 8.5) (в отсутствие других аминов или аммиака) (см. ниже).

Взаимодействие эремомицина (I) с РуВОР и выделение амида эремомицина (Ia). К 80 мг (0.048 ммоль) сульфата эремомицина (**I**) в 2 мл DMSO добавили 70 мкл (0.144 ммоль) Et₃N (pH ~

~ 8.5), 50 мг РуВОР (0.098 ммоль) в 0.5 мл DMSO двумя порциями. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 15 мин. Затем добавили еще 70 мкл (0.144 ммоль) Et₃N (pH ~ ~ 8.5), 50 мг РуВОР (0.098 ммоль) в 0.5 мл DMSO двумя порциями и перемешивали при комнатной температуре 45 мин. Затем добавили 7 мл эфира, энергично встряхивали, эфирный слой слили и отбраили. Эту операцию повторили еще два раза. К полученному маслу добавили водный раствор 0.1 N HCl (pH ~ 5), и целевое вещество осаждали смесью ацетон-эфир (1 : 2). Осадок (60 мг) отфильтровали и высушили в вакууме. ВЭЖХ осадка приведена на рис. 1.

Осадок (60 мг), полученный в предыдущем эксперименте, растворили в минимальном объеме воды, гидрофобные примеси (продукты разрушения реагента РуВОР) удалили экстракцией этилацетатом (3 мл × 2), водный слой нанесли на колонку с силианизированным силикагелем Merck (*H* = 30 см, *D* = 1 см) уравновешенным дегазированной водой. Элюцию проводили водой, содержание фракций контролировали ВЭЖХ. Фракции, содержащие чистый амид эремомицина (**Ia**), объединили, упарили в вакууме с добавлением бутанола до небольшого объема (~0.5 мл), к которому добавили избыток ацетона. Осадок отфильтровали и высушивали в вакууме. Выход гидрохлорида **Ia** 9 мг (~13%, 96% чистоты по ВЭЖХ, система 2). Вычислено: 1556.5875, C₇₃H₉₁ClN₁₁O₂₅⁺ [*M* + *H*]⁺, найдено 1556.5909 [*M* + *H*]⁺. С той же колонки аналогично выделили непрореагировавший антибиотик (**I**) – 5 мг (98% чистоты по ВЭЖХ, система Б). Вычислено: 1557.5716, C₇₃H₉₀ClN₁₀O₂₆⁺ [*M* + *H*]⁺, найдено 1557.5711 [*M* + *H*]⁺.

Взаимодействие ванкомицина (II) с РуВОР и выделение амида ванкомицина (IIa). Амид (**IIa**) получен аналогично амиду (**Ia**) из 76 мг (0.05 ммоль) гидрохлорида ванкомицина (**II**) и хлорида аммония с выходом 8 мг (~10%, 95% чистоты по ВЭЖХ, система В). Вычислено: 1447.4539, C₆₆H₇₇Cl₂N₁₀O₂₃⁺ [*M* + *H*]⁺, найдено 1447.4459 [*M* + *H*]⁺.

Аутентичные образцы амидов эремомицина (Ia) и ванкомицина (IIa) получены по стандартной ме-

тодике, описанной в работе [8], с выходами ~80% и чистотой >95% (ВЭЖХ). Для аутентичных образцов найдено: $R_t = 30.43$ (ВЭЖХ, система Б) и $m/z 1556.5882 [M + H]^+$ (**Ia**) и 15.21 (ВЭЖХ, система В), $m/z 1447.4448 [M + H]^+$ (**IIa**).

Антибактериальная активность (МПК, мкг/мл) амидов (**Ia**) и (**IIa**) в сравнении с антибиотиками (**I**) и (**II**) определена по стандартному методу, как описано в работе [17], в соответствии с National Committee for Clinical Laboratory Standard и приведена в табл. 2.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят сотрудников НИИНА им. Г.Ф. Гаузе РАМН: д.м.н. Е.П. Мирчинк за определение антибактериальной активности, к.ф.н. К.Ф. Турчина за получение ЯМР-спектров, а также доктора Д. Батта (Университет Дебрецена, Венгрия, G. Batta, University of Debrecen, Hungary) за получение ЯМР-спектров. Работа выполнена при поддержке Гранта РФФИ 10-03-00210 а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Valeur E., Bradley M. // Chem. Soc. Rev. 2009. V. 38. P. 606–631.
2. Albericio F., Bofill J.M., El-Faham A., Kates S.A. // J. Org. Chem. 1998. V. 63. P. 9678–9683.
3. Zweifel M.J., Snyder N.J., Cooper R.D.G., Nicas T.I., Mullen D.L., Butler T.F., Rodrigues M.J. // J. Antibiotics. 2003. V. 56. P. 289–295.
4. Malabarba A., Ciabatti R., Scotti R., Goldstein B.P., Ferrari P., Kurz M., Andreini B.P., Denaro M. // J. Antibiotics. 1995. V. 48. P. 869–883.
5. Miroshnikova O.V., Printsevskaya S.S., Olsufyeva E.N., Pavlov A.Y., Nilius A., Hensey-Rudloff D., Preobrazhenskaya M.N. // J. Antibiotics. 2001. V. 54. P. 455–459.
6. Maples K.R., Wheeler C., Ip E., Plattner J.J., Chu D., Zhang Y.-K., Preobrazhenskaya M.N., Printsevskaya S.S., Solovieva S.E., Olsufyeva E.N., Heine H., Lovchik J., Lyons C.R. // J. Med. Chem. 2007. V. 50. P. 3681–3685.
7. Panzone G., Ferrari P., Kurz M., Trani A. // J. Antibiotics. 1998. V. 51. P. 872–879.
8. Solovieva S.E., Printsevskaya S.S., Olsufyeva E.N., Batta G., Preobrazhenskaya M.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2008. V. 34. P. 747–754 (Соловьева С.Е., Принцевская С.С., Олсуфьева Е.Н., Батта Д., Преображенская М.Н. // Биоорганическая химия. 2008. Т. 34. С. 831–839).
9. Pavlov A.Y., Berdnikova T.F., Olsufyeva E.N., Miroshnikova O.V., Filipposyanz S.T., Preobrazhenskaya M.N., Sottani C., Colombo L., Goldstein B.P. // J. Antibiotics. 1996. V. 49. P. 194–198.
10. Batta G., Sztaricskai F., Kover K.E., Rudel C., Berdnikova T.F. // J. Antibiotics. 1991. V. 44. P. 1208–1221.
11. Миргородская О.А., Олсуфьева Е.Н., Колуме Д.Е., Йоргенсен Е.Д.Д., Роенсторф П., Павлов А.Ю., Мирошникова О.В., Преображенская М.Н. // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С. 630–639.
12. Samanen J.M. Peptide and protein Drug Delivery (Ed: Lee V.H.L.), New York: Marcel Dekker Inc., 1991. P. 157–158.
13. Bodanzky M., Martinez J. // Synthesis. 1981. V. 5. P. 333–355.
14. Harris C.M., Kopecka H., Harris T.M. // J. Am. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 6915–6922.
15. Antipas A.S., Van der Velde D.G., Jois S.D.S., Siahaan T., Stella V.J. // J. Pharm. Sci. 2000. V. 89. P. 742–750.
16. Gause G.F., Brazhnikova M.G., Lomakina N.N., Berdnikova T.F., Fedorova G.B., Tokareva N.L., Borisova V.N., Batta G.Y. // J. Antibiotics. 1989. V. 42. P. 1790–1799.
17. Pavlov A.Y., Preobrazhenskaya M.N., Malabarba A., Ciabatti R., Colombo L. // J. Antibiot. 1998. V. 51. P. 73–81.

Unusual Amidation Reaction of Asn-Containing Glycopeptide Antibiotics Using the Coupling Reagent Pybop

E. N. Olsuf'eva[#], S. E. Solov'eva, M. I. Reznikova, A. M. Korolev, M. N. Preobrazhenskaya

[#] Phone: (499) 246-06-36, fax: (499) 245-02-95, e-mail: eolsufeva@list.ru
Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, B. Pirogovskaya ul. 11,
Moscow, 119021 Russia

The coupling reagent PyBOP is widely used for the synthesis of different peptides and their amides, particularly for carboxamides of glycopeptide antibiotics of vancomycin or teicoplanin groups. The amidation reaction of the peptide core of the glycopeptide antibiotic eremomycin (**I**) with highly reactive amines in the presence of PyBOP is usually not accompanied by the formation of side products. However, the amidation of **I** with bulky amines (e.g., decyl amine and adamantyl amine) in the presence of PyBOP and Et₃N or di-(*i*-Pr)₂EtN (pH ~ 8.5) yielded N-unsubstituted carboxamide of eremomycin (**Ia**) as an admixture. The reaction of (**I**) or vancomycin (**II**) with an excess of PyBOP and Et₃N (pH ~ 8.5) without addition of an amine or ammonia gave a mixture of products which contained higher amounts of the corresponding N-unsubstituted carboxamides (~20%). The structures of the samples of **Ia** and vancomycin amide (**IIa**) were proved by ¹H NMR and ESI MS methods and confirmed by comparing with the authentic samples.

Keywords: glycopeptides, eremomycin, vancomycin, amidation reaction, PyBOP, asparagine