



УДК 615.332:543.4

## СТРУКТУРА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИБИОТИКОВ НОКАМИЦИНОВ I И II

*Бражникова М. Г., Константинова И. В., Потапова Н. П.,  
Толстых И. В., Рубашева Л. М.*

*Институт по изысканию новых антибиотиков  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

*Розынов Б. В.*

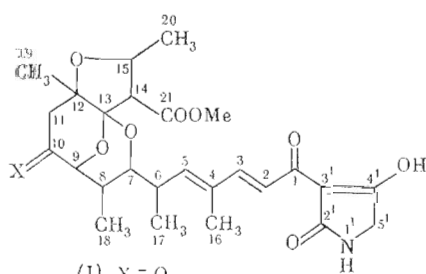
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина Академии наук СССР, Москва*

*Хорват Г.*

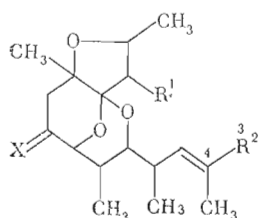
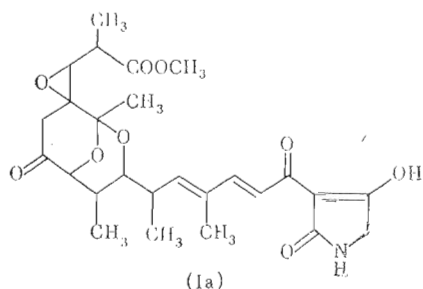
*Институт фармацевтической химии, Будапешт*

Строение компонентов I и II противоопухолевого антибиотика нокамицина, образуемого *Nocardopsis syringae*, установлено путем детального анализа ЯМР-, масс- и ИК-спектров антибиотиков и продуктов их химической деградации.

Как уже сообщалось [1—3], антибиотики нокамицины близки к группе антибиотиков тетрадамицинов-стрептолидигинов [4, 5]. Ранее мы предложили две возможные структуры для нокамицина I—(I) и (Ia) [3], выбор между которыми требовал дополнительных исследований. Во время публи-



(II) X = H, OH



(III) R<sup>1</sup> = COOCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = CHO, X = O

(IV) R<sup>1</sup> = COOCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = CHO, X = H, OH

(V) R<sup>1</sup> = COOCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OH, X = H, OH

(VI) R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>OH, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OH, X = H, OH

Физико-химические константы нокамицинов и продуктов их деградации

Соединение	Т. пл., °С	M+	Эмпирическая формула	$[\alpha]_D^{20}$	УФ (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), λ <sub>макс.</sub> , нм (ε)	R <sub>f</sub> на силифоле в системе СНСl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH (20 : 3)	Биологическая активность против <i>Bacillus mycooides</i>
(I)	147-149	503	C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>9</sub>	-56° (с 0,2, этанол)	235 (9000) 352 (35 500)	0,50	100 000 ЕД/мг
(II)	174-176	505	C <sub>26</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>9</sub>	-161° (с 0,2, этанол)	352 (36 300) 230 (9600)	0,40	1000 ЕД/мг
(III)	97-98	380	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> O <sub>7</sub>	+24° (с 0,2, этанол)	226 (16 600)	0,95	-
(IV)	192-194	382	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>	-103° (с 0,1, этанол)	227 (19 500)	0,70	-
(V)		384	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>		-	0,60	-
(VI)		356	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>		-	0,50	-

кация статьи [3] нам стал доступен патент, в котором приводится строение антибиотика Вu2313В, близкого к нокамицину по своим физико-химическим характеристикам и обладающего тетрагидрофурановым, а не эпоксидным кольцом в молекуле [6]. Данное сообщение посвящено детальному исследованию ИК-, УФ-, масс-спектров и спектров ЯМР нокамицинов I (I) и II (II), а также продуктов их окислительной деградации (III) и (IV) и последующего восстановления NaBH<sub>4</sub> (V) и LiAlH<sub>4</sub> (VI), которое позволило однозначно доказать формулы этих соединений.

Основные физико-химические и биологические свойства нокамицинов I и II, приведенные в табл. 1, показывают, что эти антибиотики существенно отличаются друг от друга.

Данные спектров <sup>1</sup>H-ЯМР самих антибиотиков (I) и (II) и продуктов их химической деградации (III) - (VI) приведены в табл. 2. Как видно из этих спектров, оба компонента антибиотика содержат 5 метильных групп и 2 метиленовые (5'-CH<sub>2</sub> и 11-CH<sub>2</sub>) группы, 6 метиновых протонов, три из которых (7-Н, 9-Н и 15-Н), судя по химическим сдвигам, находятся при кислороде, и три олефиновых протона (2-Н, 3-Н и 5-Н). При окислении нокамицинов I и II KMnO<sub>4</sub> происходит разрыв связи C2-C3 с образованием соединений (III) и (IV). Оба эти соединения содержат альдегидную группу (однопротонные синглеты при 9,43-9,42 м.д.), появление которой приводит к изменению химических сдвигов, 16-CH<sub>2</sub> и 5-Н по сравнению со спектрами антибиотиков. Дублетный сигнал 5-Н (δ 6,61 м.д.) в спектре соединения (IV) сливается в синглет при облучении мультиплета с центром при 3,0 м.д., и при этом же эксперименте сливается в синглет трехпротонный дублет при 1,09 м.д. (17-CH<sub>3</sub>), что позволяет отнести сигнал при 3,0 м.д. к 6-Н. Аналогичным образом на основании данных двойного резонанса и сравнения со спектром соединения (III) [3] сигналы при 3,86 и 2,1 м.д. в спектре продукта деградации (IV) были отнесены к 7-Н и 8-Н соответственно. В спектрах продуктов окислительной деградации обоих антибиотиков имеются сигналы протонов метиленовой группы, которые для соединения (III) имеют вид АВ-системы с центром при 2,8 м.д. и J<sub>gem</sub> 17 Гц, а в случае соединения (IV) наблюдается два дублета дублетов, один из которых имеет химический сдвиг 2,44 м.д. (J 17 и 7 Гц), а второй - 1,70 м.д. (J 17 и 12 Гц). Из это-

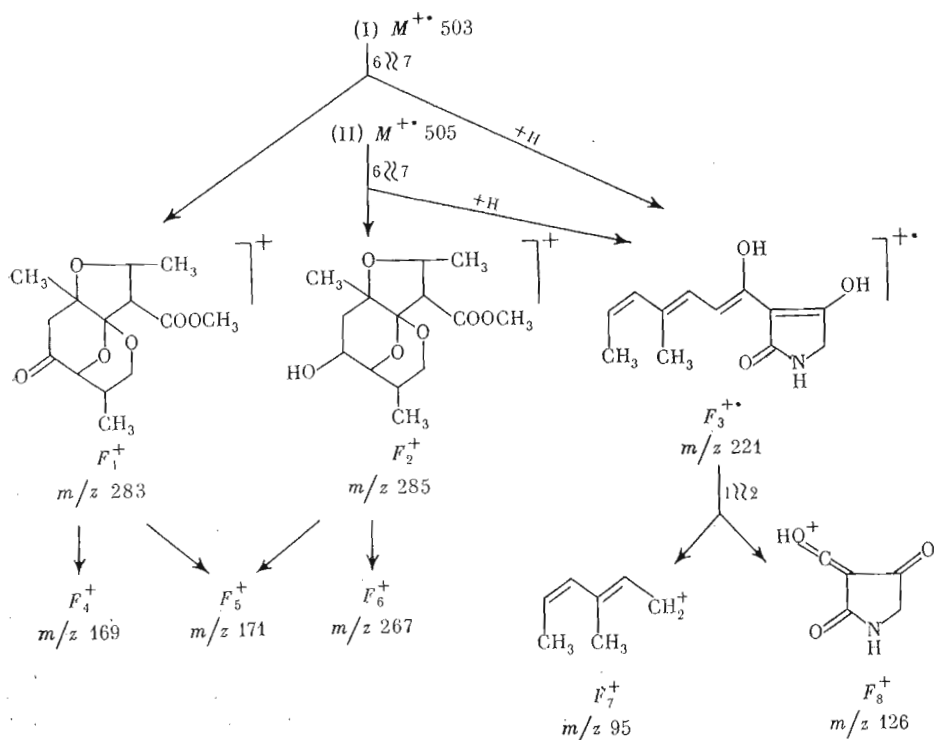
Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР нокамицинов и продуктов их деградации

Соединение	δ, м. д. (J, Гц)																		
	2-Н	3-Н	5-Н	6-Н	7-Н	8-Н	9-Н	10-Н	11-СН <sub>2</sub>	14-Н	15-Н	16-СН <sub>3</sub>	17-СН <sub>3</sub>	18-СН <sub>3</sub>	19-СН <sub>3</sub>	20-СН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	NH	5'-СН <sub>2</sub>
(I)	7,55 (16)	7,14 (16)	6,10 (10)	2,8	3,41 (12 и 2)	2,08	4,04 (6)	—	АВ-система с центром 2,8 (17)	2,98 (8)	4,58 (8 и 6)	1,90	1,05 (7)	0,86 (7)	1,42	1,32 (6)	3,86	6,55	3,86
(II)	7,56 (16)	7,10 (16)	6,15 (10)	2,9	3,8— —3,9	2,1	3,8— —3,9	4,35	2,41 (17 и 7) 4,68 (17 и 12)	2,76 (8)	4,57 (8 и 6)	1,90	1,05 (7)	0,99 (7)	1,38	1,25 (6)	3,76	6,55	3,76
(III)	—	9,43	6,52 (10)	2,85	3,44 (12 и 2)	2,07	4,07 (6)	—	АВ-система с центром 2,8 (17)	2,96 (8)	4,55 (8 и 6)	1,75	1,06 (7)	0,86 (7)	1,42	1,30 (6)	3,79	—	—
(IV)	—	9,42	6,61 (10)	3,0	3,86 (12)	2,1	3,9	4,37	2,44 (17 и 7) 1,70 (17 и 12)	2,76 (8)	4,60 (8 и 6)	1,76	1,09 (7)	1,01 (7)	1,39	1,28 (6)	3,74	—	—
(V)	—	4,26	5,92 (10)	2,90	4,02 (12)	2,4	4,13 (6 и 6)	4,7	2,72 (17 и 7) 2,04 (17 и 12)	3,01 (8)	4,74 (8 и 6)	1,80	1,42 (7)	1,22 (7)	1,58	1,30 (6)	3,75	—	—
(VI)	—	4,20	5,86 (10)	2,85	3,97 (12)	2,4	4,06 (6 и 6)	4,77 (6,7 и 12)	2,70 (17 и 7) 2,07 (17 и 12)	2,4	4,32 (8 и 6)	1,78	1,43	1,20	1,38	1,49	3,8—4,4 (21-СН <sub>2</sub> )	—	—

го можно сделать вывод, что в нокамицине II в положении 10 имеется протон, которого нет в молекуле нокамицина I. При сравнении спектров соединений (III) и (IV) можно видеть, что в области 4,37 м.д. только у второго из них имеется однопротонный мультиплет, при облучении которого превращаются в дублеты с  $J_{\text{гем}}$  17 Гц сигналы протонов 11-метиленовой группы. Химический сдвиг этого сигнала свидетельствует о наличии при С10 гидроксильной группы.

В спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР соединения (III) имеются сигналы с  $\delta$  207,8 и 52,03 м.д. (триплет в режиме *off*-резонанса), которые могут быть отнесены соответственно к кетонной группе и С11. В спектре же соединения (IV) сигнал кетонной группы отсутствует (вместо него появляется резонанс СН-О- при 73,58 м.д.), а сигнал метиленовой группы сдвигается в сильное поле до 42,01 м.д. Совокупность всех этих данных, а также наличие мультиплетного сигнала при 4,35 м.д. в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре позволяют утверждать, что в нокамицине II(II) в положении 10 находится гидроксильная группа.

Кроме описанных выше в спектрах каждого их компонентов (I) и (II) антибиотика и продуктов их деградации имеются следующие сигналы: трехпротонный дублет при  $\sim 1,3$  м.д. ( $20\text{-CH}_3$ ), который связан спин-спиновым взаимодействием с однопротонным сигналом в виде дублета кватретонов при  $\sim 4,7$  м.д. ( $15\text{-H}$ ), связанным в свою очередь с дублетом при  $\sim 3,0$  м.д. ( $14\text{-H}$ ), что свидетельствует о наличии фрагмента  $\text{CH}_3\text{-CH(O-)-CH-}$ . Кроме того, в спектрах обоих компонентов нокамицина имеются еще два трехпротонных синглета при  $\sim 1,4$  ( $19\text{-CH}_3$ ) и  $\sim 3,75$  м.д. ( $\text{OCH}_3$ ). Последний сигнал был отнесен к  $\text{COOCH}_3$ -группе. Наличие ее также подтверждено спектрами  $^{13}\text{C}$ -ЯМР соединений (III) и (IV), которые дают сигналы карбоксильных углеродных атомов соответственно при 168,80 и 170,12 м.д. Кроме того, присутствие группы  $\text{COOCH}_3$  в нокамицине подтверждается образованием в условиях мягкого щелочного гидролиза нокамициновой кислоты с  $M^{++}$  489 [3].



Масс-спектры нокамицинов I и II

Нокамицин I				Нокамицин II			
<i>m/z</i>	отн. инт., %	<i>m/z</i>	отн. инт., %	<i>m/z</i>	отн. инт., %	<i>m/z</i>	отн. инт., %
503	1,2	169	48	505	1,5	171	26
283	32	126	18	285	15	126	14
221	100	95	6	267	12	95	7
171	12			221	100		

Таблица 4

Масс-спектр соединения (VI)

<i>m/z</i>	отн. инт., %	<i>m/z</i>	отн. инт., %	<i>m/z</i>	отн. инт., %	<i>m/z</i>	отн. инт., %	<i>m/z</i>	отн. инт., %
15	5,0	57	25	95	33	165	15	285	1
27	15	58	10	97	25	167	10	307	2
28	10	67	20	99	20	177	4	323	1,5
29	22	69	75	107	15	179	3	325	8
31	17	71	24	109	20	181	4	338	0,9
39	20	79	12	111	20	203	5	339	1,0
41	60	81	17	121	25	209	3	355	0,2
42	10	82	17	123	20	211	3	356	0,3
43	100	83	20	125	10	220	18	357	0,4
44	7	85	10	135	17	239	14		
45	10	87	10	139	80	255	10		
53	15	91	10	143	35	257	42		
55	65	93	12	163	14	283	0,8		

Масс-спектры нокамицина I и нокамицина II дают молекулярные ионы  $M^+$  503 и 505 соответственно\*. Фрагментация антибиотиков приведена на схеме, а соответствующие масс-спектральные данные — в табл. 3.

Ион  $F_3^+$  с  $m/z$  221, которому отвечают наиболее интенсивные пики в масс-спектрах нокамицинов I и II, образуется в результате разрыва С6—С7-связи с миграцией атома Н к заряженной части молекулы, как и при фрагментации тирандамицинов А и В [4]. Дальнейшая фрагментация этого иона приводит к иону  $F_8^+$ , представляющему собой остаток тетраминной кислоты, и иону  $F_7^+$ , отвечающему углеводородной части молекулы; ион  $F_8^+$  ( $m/z$  126) наблюдается также в спектре тирандамицина А [4]. Простой разрыв связи С6—С7 в нокамицинах I и II приводит соответственно к ионам  $F_1^+$  и  $F_2^+$ ; аналогичный распад наблюдается в случае тирандамицинов А и В [4, 8]. В случае нокамицина I дальнейшая фрагментация иона  $F_1^+$  дает два высокоинтенсивных иона  $F_4^+$  и  $F_5^+$ , содержащих карбометоксигруппу. Ион  $F_2^+$ , характерный для масс-спектра нокамицина II, распадается далее с образованием ионов  $F_5^+$  и  $F_6^+$  ( $F_2^+ - H_2O$ ).

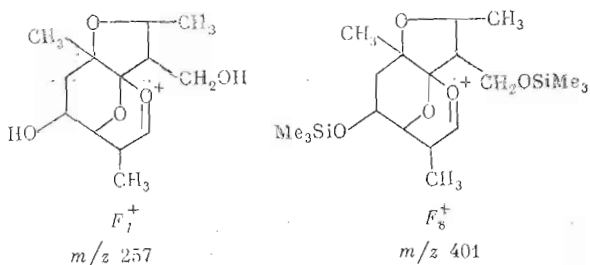
То, что нокамицин II отличается от нокамицина I наличием гидроксильной группы вместо кетонной, было дополнительно доказано восстановлением соединения (III) боргидридом натрия. Из спектра  $^1H$ -ЯМР продукта восстановления (V) и экспериментов по двойному резонансу следовало, что он весьма близок к соединению (IV), отличаясь от него вполне естественным отсутствием альдегидной группы (исчезновение сигнала при 9,43 м.д.), восстановившейся до  $CH_2OH$  (двухпротонный синглет при 4,26 м.д.). Небольшие различия в химических сдвигах протонов (табл. 2)

\* Оформление масс-спектрометрических данных проведено в основном в соответствии с рекомендациями [7], EIMS — масс-спектр с ионизацией электронным ударом, IE — энергия ионизирующих электронов, отн. инт. — относительная интенсивность.

соединений (IV) и (V) объясняются также тем, что спектры сняты в разных растворителях (восстановленный продукт плохо растворим в хлороформе).

Для окончательного суждения о существовании эпоксидного или тетрагидрофуранового циклов было проведено алюмогидридное восстановление продуктов окисления (III) и (IV). Для обоих соединений был при этом получен один и тот же продукт, в ИК-спектре которого отсутствуют полосы поглощения карбонильных групп ( $1650-1750\text{ см}^{-1}$ ). Из спектра  $^1\text{H-NMR}$  (табл. 2) вытекает, что в соединении (VI), как и следовало ожидать, оказались восстановленными альдегидная группа (вместо сигнала с  $\delta$  9,42 м.д. появился двухпротоновый синглет при 4,20 м.д.), кетонная группа в положении 10 (однопротоновый сигнал при 4,77 м.д.) и карбоксигруппа (исчезновение трехпротонового синглета  $\text{OCH}_3$ -группы при 3,8 м.д.). В случае существования эпоксидного цикла он должен был раскрыться при действии  $\text{LiAlH}_4$ , в результате чего появился бы еще один протон в положении 12 или 14, что в свою очередь вызвало бы изменение мультиплетности сигналов 11-Н или 15-Н. Однако в спектре ЯМР соединения (VI) имеется 29 протонов, а не 30, как должно быть в случае раскрытия эпоксидного цикла (гидроксильные группы не видны, так как их протоны обмениваются с водой, содержащейся в пиридине- $d_5$ ), и мультиплетность сигналов, относимых к протонам в положениях 11 и 15, не меняется.

В масс-спектре соединения (VI) присутствует малонинтенсивный пик  $M^{+}$  356, который распадается по трем путям с образованием ионов  $[M-\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $[M-31]^+$  и  $[M-99]^+$ ; структуру последнего иона можно представить как  $F_7^+$ .



Этот ион последовательно элиминирует две молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  и превращается в ион с  $m/z$  220. В спектре присутствуют также пики ионов  $[M-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3]^+$  и  $[M-31-\text{H}_2\text{O}]^+$ . Все приведенные распады подтверждаются наличием соответствующих метастабильных пиков. Данные приведены в табл. 4.

В масс-спектре синильного производного соединения (VI) присутствует достаточно интенсивный пик молекулярного иона  $M^{+}$  572 и пик иона  $[M-\text{CH}_3]^+$  с  $m/z$  557. Сравнение масс молекулярных ионов восстановленного продукта (VI) и его триметилсилильного производного указывает на наличие трех гидроксильных групп в исследуемой молекуле. Распад молекулярного иона  $M^{+}$  приводит к ионам  $[M-\text{CH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_3]^+$  с  $m/z$  469 и  $[M-(98+\text{Si}(\text{CH}_3)_3)]^+$  ( $F_8^+$ ); последний теряет молекулу триметилсиланола и превращается в ион с  $m/z$  311.

Таким образом, на основании спектральных исследований компонентов нокамицина (I) и (II), продуктов их окислительной деградации (III) и (IV) и дальнейшего восстановления комплексными гидридами (V) и (VI) мы пришли к заключению, что более правильной для нокамицина является структура, включающая в себя тетрагидрофурановый цикл.

## Экспериментальная часть

Спектры ЯМР всех исследованных соединений получали на спектрометре «Varian XL-100», ИК-спектры — на спектрофотометре «Pye Unicam SP-1100», УФ-спектры — на спектрофотометре «Beckman UV 5260», масс-спектры (EIMS) нокамицина I и нокамицина II — на спектрометре «Varian MAT SM-1» ( $IE$  70 эВ, температура ионизационной камеры 175° для нокамицина I и 230° С для нокамицина II), масс-спектры соединений (V) и (VI) — на спектрометре LKB-9000 ( $IE$  70 эВ, температура ионизационной камеры 250° С). Для колоночной хроматографии использовали водную кремниевую кислоту; ТСХ проводили на пластинках силуфола в системе хлороформ — метанол (20:3), вещества обнаруживали опрыскиванием 1% раствором перманганата калия.

*Очистка антибиотиков.* Препарат-сырец, полученный методом, описанным ранее [1], хроматографировали на колонке в хлороформе. Фракции, содержащие нокамицин I, объединяли, упаривали досуха и остаток кристаллизовали из метанола. Фракции, соответствующие нокамицину II, объединяли, упаривали досуха и повторно хроматографировали в хлороформе на колонке. После упаривания остаток кристаллизовали из метанола.

*Окислительная деградация нокамицинов.* Кристаллический нокамицин I (2 г) растворяли в 50 мл хлороформа и к охлажденному до 5° С раствору прибавляли 180 мл 2% раствора марганцовокислого калия в ацетоне. Образовавшийся осадок двуокиси марганца отделяли, промывали 50 мл смеси хлороформа с ацетоном (1:1) и отбрасывали. Объединенный фильтрат упарили досуха и остаток хроматографировали на колонке, содержащей 30 г силикагеля «Merck», суспендированного в бензоле, элюируя смесью бензола с хлороформом (36:14). Фракции, содержащие вещество с  $R_f$  0,95 (ТСХ), объединяли, упаривали досуха и остаток кристаллизовали из этанола. Получили 0,4 г кристаллического продукта (III), выход 20%. Из 2 г кристаллического нокамицина II в аналогичных условиях получили 0,35 г кристаллического вещества, выход 18%.

*Восстановление соединения (III)  $NaBH_4$ .* Раствор 0,1 г соединения (III) и 0,4 г  $NaBH_4$  в 60 мл этанола выдерживали 24 ч при 20° С, затем избыток  $NaBH_4$  разлагали 10% HCl и выпавший осадок фильтровали. Фильтрат разбавляли водой и экстрагировали хлороформом, экстракт промывали водой, высушивали безводным  $Na_2SO_4$ , упаривали досуха и остаток кристаллизовали из этанола. Получили 0,06 г кристаллического тетрагидропроизводного (V), выход 60%.

*Восстановление соединений (III) и (IV)  $LiAlH_4$ .* 0,15 г соединения (III) растворяли в 10 мл свежеперегнанного и высушенного над металлическим натрием тетрагидрофурана, к полученному раствору прибавляли по каплям раствор  $LiAlH_4$  в 4 мл тетрагидрофурана, смесь энергично перемешивали 1 ч при 20° С, после чего избыток  $LiAlH_4$  разлагали водой. Образовавшийся осадок промывали тетрагидрофураном, упаривали и остаток кристаллизовали из ацетона. Получили 0,07 г кристаллического производного (VI), выход 46%. Из 0,12 г соединения (IV) в условиях, описанных выше, получили 0,045 г кристаллического производного (VI), выход 38%.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бражникова М. Г., Константинова Н. В., Потапова Н. П., Толстых И. В. (1977) Антибиотики, 22, 486–489.
2. Гаузе Г. Ф., Свешникова М. А., Ухолина Р. С., Комарова Г. Н., Бажанов В. С. (1977) Антибиотики, 22, 483–486.
3. Horvath G., Brazhnicova M. G., Konstantinova N. V., Tolstykh I. V., Potapova N. P. (1979) J. Antibiot., 32, 555–558.
4. Hagenmaier H., Jaschke K. H., Santo L., Scheer M., Zahner H. (1976) Arch. Microbiol., 109, 65–74.

5. Rinehart K. L., Jr., Cook G. C., Jr., Maurer K. H., Rapp U. (1974) *J. Antibiot.*, **27**, 1-13.
6. Patent № 7829691 (1979), USA.
7. Maccoll A. (Editor-in-chief) (1979) *Org. Mass Spectrom.*, **14**, 1-2.
8. McKellar F. A., Grostic M. F., Olson E. C., Wnuc R. J., Branfman A. R., Rinehart K. L., Jr. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 4943-4945.

Поступила в редакцию  
10.IV.1980.

## THE STRUCTURE OF ANTITUMOR ANTIBIOTICS NOCAMYCINS I AND II

BRAZHNIKOVA M. G., KONSTANTINOVA N. V., POTAPOVA N. P.,  
TOLSTYKH I. V., RUBASHEVA L. M., ROZYNOV B. V., HORVATH G.

*Institute of New Antibiotics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;  
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow; Institute for Drug Research, Budapest*

Antitumor antibiotics nocamycins are produced by *Nocardopsis syringae*. The structures of two components (I and II) of nocamycins have been elucidated with the aid of mass- and NMR-spectroscopic analysis. The antibiotics, the products of their oxidative degradation and those from reduction of the latter by  $\text{NaBH}_4$  and  $\text{LiAlH}_4$  were investigated.