

# Физико-химические свойства и структурные исследования олигомицина SC-II, продуцируемого *Streptomyces virginiae* 17

А. Н. ДАНИЛЕНКО<sup>1</sup>, М. В. БИБИКОВА<sup>2</sup>, И. А. СПИРИДОНОВА<sup>2</sup>, Н. Э. ГРАММАТИКОВА<sup>3</sup>, А. В. КАТЛИНСКИЙ<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля РАН, Москва

<sup>2</sup> ООО «Виорин», Москва

<sup>3</sup> ООО «Олфарм», Москва

<sup>4</sup> НПО «Микроген», Москва

## Physico-Chemical Properties and Structure of Oligomycin SC-II, Produced by *Streptomyces virginiae* 17

A. N. DANILENKO, M. V. BIBIKOVA, I. A. SPIRIDONOVA, N. E. GRAMMATIKOVA, A. V. KATLINSKY

N. M. Emmanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

Viorin Co., Moscow

Olfarm Co., Moscow

Microgen Co., Moscow

При выполнении программы поиска антибиотиков с антифунгальной и иммуносупрессивной активностью отобрана культура *Streptomyces virginiae* 17, которая образовывала комплекс антибиотиков олигомицинов. Разделение комплекса на индивидуальные компоненты методом ВЭЖХ показало, что он состоит из двух компонентов в соотношении 8:2. Были изучены физико-химические характеристики компонентов антибиотического комплекса. Методом ЯМР <sup>13</sup>C и <sup>1</sup>H определена структура олигомицина.

**Ключевые слова:** *Streptomyces virginiae*, олигомицин SC-II, физико-химические свойства.

Under the screening programme for antibiotics with antifungal and immunosuppressive activities, *Streptomyces virginiae* 17 producing an oligomycin complex was isolated. Separation of the complex by HPLC showed that it contained two components at a ratio of 8:2. The physico-chemical characteristics of the components were investigated. The structure of oligomycin was assessed by <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR.

**Key words:** *Streptomyces virginiae* 17, oligomycin SC-II, physico-chemical properties.

При выполнении программы поиска антибиотиков с гипополидемической и антифунгальной активностью нами была отобрана культура *Streptomyces* sp.17, выделенная из почвенного образца Тувы [1]. Культура образовывала комплекс антибиотиков, близких по физико-химическим свойствам олигомицинам А, В и С [2, 3], но отличающихся от них временами удерживания при хроматографии на колонке С18 и антибиотической активностью. По своей химической природе олигомицины являются макролидными антибиотиками, содержащими 26-членный  $\alpha$ ,  $\beta$ -ненасыщенный лактон, соединенный с бициклической спирокетальной группировкой.

### Выделение и очистка

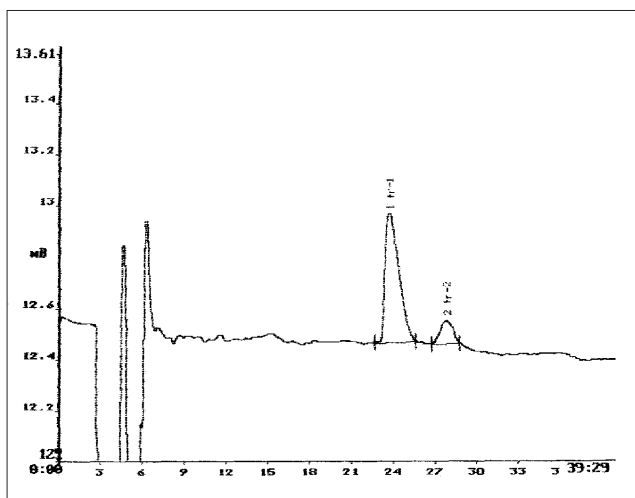
Культуральную жидкость фильтровали на бумажном фильтре № 3 под вакуумом водоструйно-

го насоса. Фильтрат отбрасывали, а осадок помещали в химический стакан и экстрагировали антибиотик ацетоном дважды при массовом соотношении мицелий/ацетон 1:3 в течение 1 ч при перемешивании механической мешалкой. После каждой экстракции мицелий от жидкости отделяли на фильтре № 3. В полученных фильтрах определяли содержание антибиотика методом ВЭЖХ, используя в качестве стандарта для количественных расчётов препарат фирмы Sigma, содержащий 60% олигомицина А, 30% олигомицина В и 10% олигомицина С.

Количественное содержание антибиотика в культуральной жидкости составляло, по данным ВЭЖХ, 37 мг/л. Наилучшее разделение компонентов комплекса было достигнуто при следующих условиях: хроматографическая колонка Alltima C 18 (250×4,6 мм ; 5 мкм); подвижная фаза — метанол/вода в соотношении 85:15; скорость потока — 0,8 мл/мин, детектирование — 225 нм; объём вводимой пробы — 20 мкл (с=240 мкг/мл). В этих условиях на хроматограмме получали два

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул, За. ООО «Олфарм»

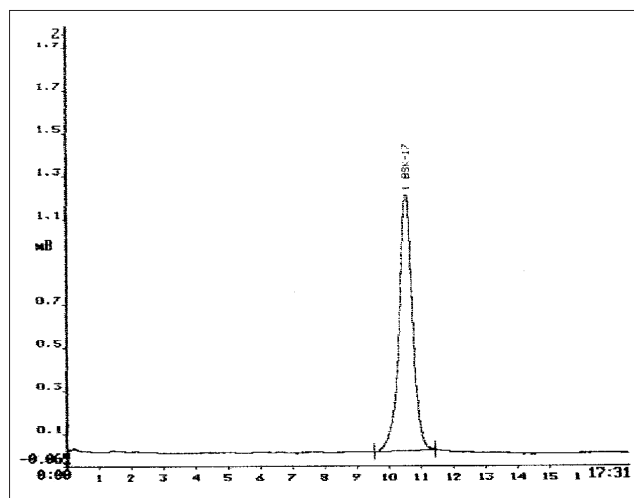


**Рис. 1.** Хроматограмма препаративного выделения олигомицина.

Условия: колонка — Zorbax C18 (250×22 мм; 5 мкм); подвижная фаза — метанол:вода в соотношении 85:15; скорость протока — 8 мл/мин; детектирование — рефрактометрия; объем вводимой пробы — 1 мл ( $c = 30$  мг/мл).

пика с временами удерживания 11,5 и 13,2 мин и соотношением площадей под пиками 8:1. Методом ВЭЖХ показано, что хроматографический пик с временем удерживания на колонке 13,2 мин (минорный компонент) соответствует времени удерживания олигомицина А для стандартного образца. На этом основании можно считать, что минорный компонент олигомицинового комплекса является олигомицином А.

В первом ацетоновом экстракте, по данным ВЭЖХ, находилось 85% антибиотика от его содержания в культуральной жидкости, а во втором — ~15%. Следует отметить, что второй экстракт был сильно пигментирован и по этой причине для дальнейшей очистки антибиотика не использовался. Первый фильтрат упаривали на роторном испарителе под вакуумом водоструйного насоса при температуре 40°C до полного удаления ацетона. Образовавшуюся водную суспензию помещали в колбу с притертой пробкой, добавляли двукратный объем этилового эфира и экстрагировали антибиотик в течение 1 ч при перемешивании на магнитной мешалке. Смесь помещали на делительную воронку, выдерживали ее до полного разделения на две фазы. Верхнюю (эфирную) фазу, содержащую ~97% антибиотика от его содержания в ацетоновом экстракте (определено методом ВЭЖХ), собирали в круглодонную колбу и упаривали на роторном испарителе досуха при комнатной температуре. Сухой остаток растворяли в 100 мл 80%-ого водного метанола и приливали равный объем гексана. Экстракцию проводили при перемешивании на магнитной мешалке в течение часа. Смесь помещали на делительную



**Рис. 2.** Аналитическая хроматограмма хроматографически очищенного олигомицина.

Условия: колонка — Alltima C18 (250×4,6 мм; 5 мкм); подвижная фаза — метанол:вода в соотношении 85:15; скорость протока — 0,8 мл/мин.; детектирование УФ при 225 нм; объем вводимой пробы — 20 мкл ( $c = 240$  мкг/мл).

воронку и после разделения на фазы, нижнюю фазу (водно-метанольную) содержащую ~95% антибиотика от его содержания в эфирном экстракте (определено методом ВЭЖХ) собирали в круглодонную колбу и упаривали на роторном испарителе досуха. Сухой остаток в виде кристаллов растворяли в 4 мл метанола и использовали для дальнейшей очистки методом препаративной ВЭЖХ в обращенных фазах.

Хроматографическая колонка Zorbax C18 (250×22 мм, 5 мкм), подвижная фаза — метанол/вода при соотношении 85:15, скорость протока — 8 мл/мин, детектирование осуществляли рефрактометром, объем вводимой пробы — 1 мл при концентрации — 30 мг/мл. Хроматограмма при препаративной наработке основной фракции-1 приведена на рис. 1. Фракцию собирали в круглодонную колбу и упаривали на роторном испарителе досуха. Полученный кристаллический препарат досушивали в эксикаторе над пятиокисью фосфора под вакуумом. На рис. 2 приведена аналитическая хроматограмма полученного препарата. Степень очистки по данным ВЭЖХ не менее 98%.

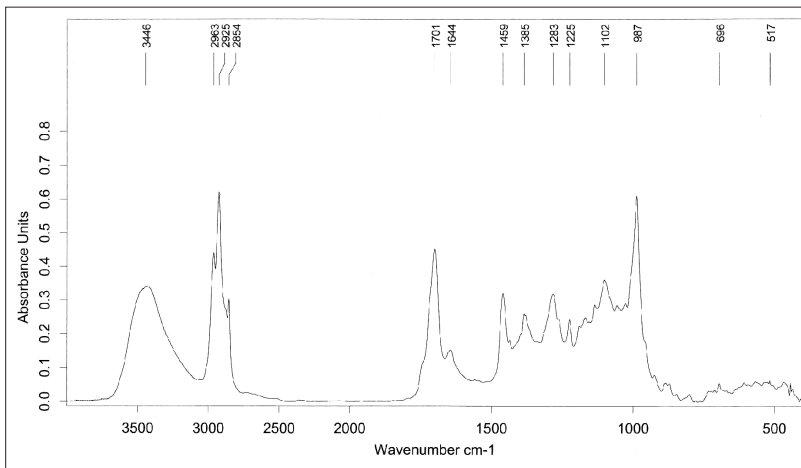
### Физико-химические свойства

В табл. 1 приведены физико-химические свойства исследуемого компонента антибиотического комплекса (фракция 1), продуцируемого культурой *Streptomyces virginiae* 17.

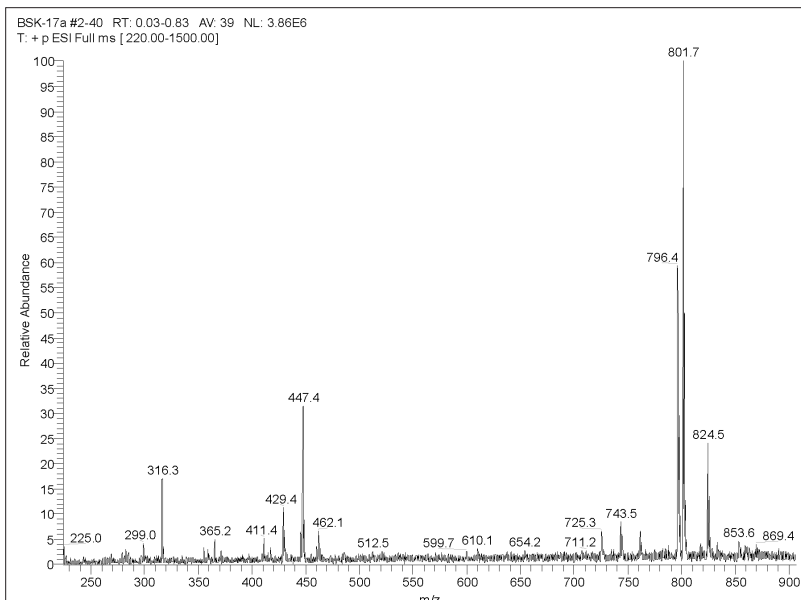
УФ-абсорбционные спектры получены на спектрофотометре Specord UV VIS (Karl Zeiss) при концентрации антибиотика в растворе мета-

**Таблица 1. Физико-химические свойства олигомицина (фракция-1), выделенного из *Streptomyces virginiae* 17**

Физико-химические свойства	Параметры
Молекулярная масса, d(MS)	778
Брутто формула (данные элементного анализа)	$C_{44}H_{74}O_{11}$
Брутто формула (данные ЯМР)	$C_{44}H_{74}O_{11}$
Удельное вращение, $[\alpha]_D^{20}$ , в $CH_3OH$ , °	-44,7 (c=0,36)
УФ-абсорбционный спектр, нм	220; 225; 233; 242
Удельная экстинция ( $E_{1cm}^{25}$ , $CH_3OH$ )	450
ИК-спектр, $\nu_{max}$ ( $cm^{-1}$ )	3435, 2964, 2929, 1702, 1644, 1459, 1385, 1284, 1225, 1136, 987
Температура плавления кристаллов, °C	102-105

**Рис. 3. ИК-спектр исследуемого олигомицина.**

Спектр снят в таблетках КВг на ИК-спектрометре Bruker Logo, Type JFS113.

**Рис. 4. Масс-спектр исследуемого олигомицина.**

Получен на масс-спектрометре LCQ deca XP при ионизирующем напряжении 3,2 кВ и температуре 200°C. Ион с  $m/z = 801,7$  соответствует  $Na^+$  форме олигомицина.

ноле 20 мкг/мл в 1 см кюветах. Удельные экстинкции определены при длине волны 225 нм. УФ-спектры для олигомицина А [3] и полученного нами антибиотика идентичны (табл. 1). Они

имеют максимумы поглощения при одной и той же длине волны и 3 «плеча», расположенные при одинаковых длинах волн. Удельная экстинция для нашего антибиотика равна 450 (см. табл. 1), что практически совпадает с величиной для олигомицина А ( $\epsilon=436$ ) [3]. ИК-спектры получены в таблетках КВг на приборе Bruker Logo, Type JFS113 приведены на рис. 3 и значения  $\nu_{max}$  в табл. 1. Значения  $\nu_{max}$  для нашего антибиотика и олигомицина А приведённые в работе [4], практически полностью совпадают.

Полученные данные свидетельствуют о том, что выделенный нами антибиотик близок к известным антибиотикам группы олигомицинов, но отличается по времени удерживания на колонке С18 от олигомицинов А, В и С (данные не приводятся).

Молекулярная масса антибиотика была определена на масс-спектрометре LCQ deca XP при ионизирующем напряжении 3,2 кВ и температуре на капилляре 200°C (рис. 4). Значение молекулярной массы полученного антибиотика приведено в табл. 1. Она отличается от молекулярных масс для известных олигомицинов [2—4].

Элементный анализ, проведённый методом сжигания пробы и с учётом молекулярной массы антибиотика дал следующую брутто формулу —  $C_{44}H_{74}O_{11}$ .

Удельное вращение антибиотика в метаноле (c=0,36%) было определено на поляриметре Perkin-Elmer 141 при длине волны 589 нм в 1 дм кювете. Полученные данные приведены в табл. 1.

Температура плавления кристаллов была определена в капиллярах и методом дифференциальной сканирующей калориметрии на приборе DSM-3 при скорости сканирования 8

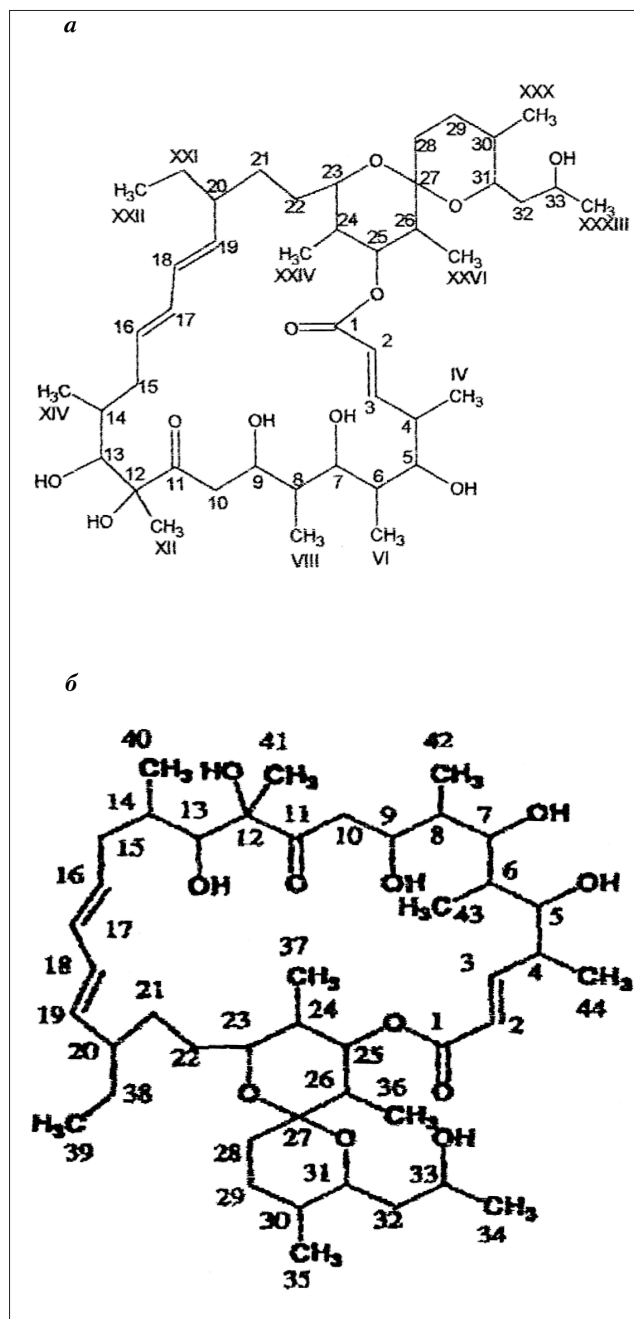
**Таблица 2.** Данные двухмерного ЯМР антибиотика 17, выделенного из *Streptomyces virginiae* 17

C, No.	Группа	$\delta$ (C), ppm	$\delta$ (H), ppm
1	O=C-O	165,2644	—
2	CH sp <sup>2</sup>	122,1339	5,80
3	CH sp <sup>2</sup>	149,7556	6,70
4	CH	40,8888	2,48
5	CH-O	80,4529	3,66
6	CH	36,1898	1,86
7	CH-O	80,2614	3,88
8	CH	41,2706	1,48
9	CH-O	68,0141	4,04
10	CH <sub>2</sub>	31,6146	2,76
11	C=O	217,7442	—
12	C <sub>quart</sub> -O(H)	82,5768	—
13	CH-O	71,5457	4,05
14	CH	33,3845	1,87
15	CH <sub>2</sub>	38,3599	2,12
16	CH sp <sup>2</sup>	129,8501	5,24
17	CH sp <sup>2</sup>	132,5892	6,07
18	CH sp <sup>2</sup>	130,4746	5,97
19	CH sp <sup>2</sup>	137,3733	5,27
20	CH	46,2310	1,86
21	CH <sub>2</sub>	31,5359	1,53/1,47
22	CH <sub>2</sub>	31,0173	1,65/1,04
23	CH-O	68,9108	3,80
24	CH	35,7796	2,15
25	CH-O	76,3116	4,90
26	CH	37,7609	1,82
27	O-C <sub>quart</sub> -O	99,0818	—
28	CH <sub>2</sub>	26,0362	1,93/1,25
29	CH <sub>2</sub>	26,5444	2,13/1,42
30	CH	30,5374	1,58
31	CH-O	67,2142	4,01
32	CH <sub>2</sub>	42,6325	1,62/1,30
33	CH-O	64,6993	4,05
xxi	CH <sub>2</sub>	28,7336	1,40/1,30
xxxiii	CH <sub>3</sub>	24,7347	1,24
xii	CH <sub>3</sub>	20,9723	1,17
iv	CH <sub>3</sub>	17,9258	1,7
xiv	CH <sub>3</sub>	14,6784	1,02
xxii	CH <sub>3</sub>	12,0307	0,84
xxvi	CH <sub>3</sub>	11,8917	0,98
xxx	CH <sub>3</sub>	11,2475	0,92
viii	CH <sub>3</sub>	9,1791	1,03
xxiv	CH <sub>3</sub>	5,9346	0,86
vi	CH <sub>3</sub>	4,4784	0,86

град/мин в диапазоне температур от 50 до 170°C (см. табл. 1).

Используя физико-химические данные, приведенные в табл. 1, был проведён поиск по банку данных для антибиотиков (Berdy Berdy J. BNPД, data base for microbial metabolite research. Abstr of Intern Conf Microbial Secondary Metabolism. Interlaken, Suisse 1994: 2). Однако антибиотик с приведёнными физико-химическими характеристиками не был найден.

Спектры ЯМР <sup>13</sup>C и <sup>1</sup>H получены на ЯМР-спектрометре Bruker DRX 500 (500/125 МГц <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C) в CDCl<sub>3</sub> при комнатной температуре (10 мг препарата антибиотика растворяли в 0,5 мл CDCl<sub>3</sub>). Отнесение сигналов в спектрах выполнено при помощи двухмерных экспериментов: COSY,



**Рис. 5.** Химическая формула олигомицина SC-II олигомицина SC-II полученного нами (а) и из японского патента (б).

TOCSY, ROESY, HSQC и HMBSC. Химические сдвиги сигналов <sup>13</sup>C и <sup>1</sup>H ЯМР антибиотика 17 представлены в табл. 2.

На основании этих данных была установлена химическая формула антибиотика, как аналога группы олигомицинов (рис. 5, а). При детальном анализе литературы найден японский патент [5], в котором приведены данные двухмерного ЯМР и химическая формула олигомицина SC-II (рис. 5, б), соответствующая нашим данным. Однако в указанном патенте допущена ошибка, ЯМР данные <sup>13</sup>C для углеродов C(38) и C(39) должны быть пронумерованы в противоположном порядке.

Следует так же отметить, что олигомицин SC- II запатентован в Японии на японском языке, а продуцентом антибиотика является грамотрицательная энтеробактерия *Pantotea aglomerans* [5].

Таким образом установлена структура нового компонента комплекса антибиотика 17 (фракция 1), который отличается от олигомицинов А,В,С и соответствует олигомицину SC-II.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бибикова М. В. Грамматикова Н. Э. и др. Штамм *Streptomyces* sp. 17 — продуцент антибиотика олигомицина SC-II. (характеристика продуцента, биологически свойства антибиотика). Антибиотики и химиотер 2012; 7—8; 3—6.
2. Smith R. A., Peterson W. H., Coy E. Oligomycin, a new antifungal antibiotic. *Antibiot Chemother* 1954; 4: 962—970.
3. Nakakita Y., Nakagava M., Sakai H. Isolation of oligomycin A as a result of screening for antagonists of lipids. *J Antibiot* 1980; 33: 514—516.
4. Кабанов А. Е., Даниленко А. Н., Спиридонова И. А. и др. Определение структуры основного компонента антибиотического комплекса, образуемого *Streptomyces driseolus* 182. Антибиотики и химиотер 2003; 10: 16—20.
5. Daisuke K., Makato K., Yamada K. et. al. Oligomycin SC compounds of *Pantotea Aglomerans* as anticancer agents. *J P Pat Appl* 09,208,587 (C1.C07D493/20) aug.12,1997.