



УДК 547.182.5'17

© 1992 г. Э. И. Лажко, М. Ю. Новоженев, И. А. Маланичева

АНТИБИОТИКИ ИЗ ШТАММА 34, ПОЛУЧЕННОГО ПРИ  
СЛИЯНИИ ПРОТОПЛАСТОВ ДВУХ ШТАММОВ*Streptomyces fradiae*

Институт по изысканию новых антибиотиков РАМН, Москва

Из культуральной жидкости штамма 34, полученного при слиянии протопластов двух штаммов *Streptomyces fradiae* — продуцентов аминогликозидного антибиотика неомицина и макролидного антибиотика тилозина, экстракцией хлороформом выделено несколько антибиотиков, подавляющих рост грамположительных бактерий. Антибиотики 34-1, 34-2, 34-3 и 34-4 получены в индивидуальном состоянии. Их структура установлена методами 1М- и 2М-спектроскопии ЯМР, и показано, что они относятся к группе бенз[а]антрахинонов. Компоненты 34-2, 34-3 и 34-4 идентичны ранее описанным антибиотикам X-14881E, 6-дезоксиг-8-О-метилрабеломоцину и 8-О-метилрабеломоцину соответственно, а антибиотик 34-1 (1-дигидро-6-дезоксиг-8-О-метилрабеломоцин) является новым представителем природных соединений этой группы.

Один из перспективных методов получения новых антибиотиков основан на слиянии протопластов актиномицетов [1, 2]. С помощью этого метода стали более доступными рекомбинантные штаммы — продуценты антибиотиков из новых или ранее известных структурных групп [3]. В ряде случаев антибиотики, образуемые такими рекомбинантными штаммами, не были гибридными по отношению к антибиотикам исходных штаммов, а имели другую химическую природу [4, 5]. Предполагают, что это обусловлено активацией молчащих генов биосинтеза вторичных метаболитов в геномах родительских штаммов в результате перестроек генетического материала, вызванных образованием, слиянием и регенерацией протопластов [6].

Для получения стабильных рекомбинантных штаммов нами проведено внутривидовое слияние протопластов двух различных немаркированных штаммов *Streptomyces fradiae*, продуцентов аминогликозидного антибиотика неомицина и макролидного антибиотика тилозина [7]. В качестве донора ДНК использовали инактивированные нагреванием протопласты продуцента тилозина, реципиентом служили протопласты неактивной линии продуцента неомицина. В результате получены штаммы, продуцирующие новые антибиотики. По признаку образования последних большинство штаммов оказались нестабильными. При рассеивании спор одного из немногих штаммов, стабильно сохранявших этот признак, выделена линия 34, которая по морфологическим свойствам значительно отличалась от родительских штаммов.

Нами ранее установлено строение двух основных компонентов, продуцируемых штаммом 34 [7]. Настоящая статья посвящена детальному изучению строения и физико-химических свойств основных и минорных антибиотиков из штамма 34.

Предварительные эксперименты по исследованию антибиотических свойств штамма 34 показали, что культуральная жидкость, в которой сосредоточена активность, подавляет рост только грамположительных бактерий, что указывает на отсутствие продукции аминогликозидных

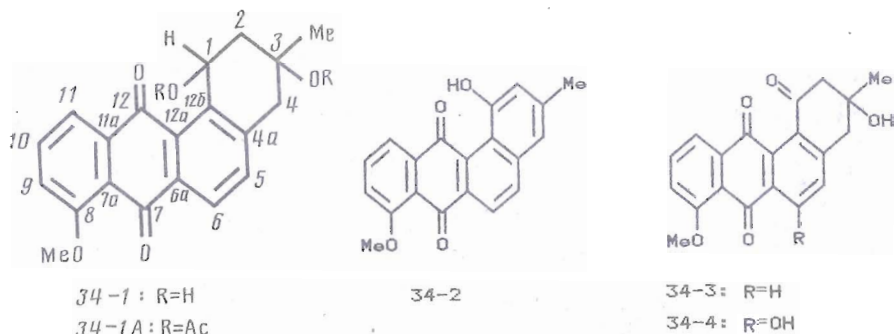


Рис. 1. Строение антибиотиков, продуцируемых штаммом 34

антибиотиков. Методами УФ-спектроскопии и ТСХ было также показано, что штамм 34 не образует тилозина.

По данным ТСХ, хлороформный экстракт культуральной жидкости содержал несколько компонентов. Продуктивность штамма 34 составляла ~250 мг/л. Содержание компонентов изменялось в зависимости от линии штамма и обычно составляло (%): компонент 34-1 — более 40, 34-2 — ~20; 34-3 и 34-4 — по 5–10. Кроме того, в препарате было обнаружено не менее восьми минорных компонентов, которые в дальнейшем не изучались в связи с их низким содержанием. В индивидуальном состоянии получены компоненты 34-1, 34-2, 34-3 и 34-4 (рис. 1).

Строение антибиотиков 34-1, 34-2, 34-3 и 34-4 установлено на основании данных спектроскопии ЯМР (табл. 1–3). Отнесение резонансных сигналов в протонных спектрах проведено с использованием спектров гомоядерной корреляции химических сдвигов  $^1\text{H}$  (COSY) [8]. Для отнесения сигналов в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР зарегистрированы спектры гетероядерной корреляции химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  по прямым и дальним КССВ  $^{13}\text{C}$ — $^1\text{H}$  [9, 10].

Оказалось, что строение антибиотиков 34-2, 34-3 и 34-4 совпадает со строением описанных ранее соединений, выделенных из культуры *Streptomyces tsusimaensis* [11]. Компонент 34-2 имеет структуру, идентичную структуре антибиотика X-14881E [12], а компоненты 34-3 и 34-4 являются соответственно 6-дезоксиде-8-О-метилрабеломидином и 8-О-метилрабеломидином [11]. Сравнимые данные для известных антибиотиков приведены в табл. 1–3.

Антибиотик 34-1 ранее не был описан\*. В ароматической области спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР этого соединения наблюдаются сигналы *ortho*-протонов (H-5 и H-6) и три группы сигналов (H-9, H-10 и H-11), характер расщепления которых соответствует *ortho*- и *meta*-протонам ароматического кольца. Наличие кросс-пиков малой интенсивности в COSY-спектре между протонами в области 7,47 м.д. и дублетами 3,06 и 2,88 м.д., образующими АВ-систему, позволяет отнести их к H-5 и H-4а, б (рис. 2). Мультиплеты в области 2,31 и 2,10 м.д. относятся к метиленовым протонам H-2а, б, которые связаны спин-спиновым взаимодействием с H-1 в области 5,44 м.д. Два сигнала в области 4,00 и 1,47 м.д. соответствуют метокси- (Оме-8) и метильной (Ме-3) группам (см. табл. 1 и 2). Наличие двух гидроксильных групп в области 5,03 и 1,84 м.д. (ОН-1 и ОН-3) подтверждается также образованием диацетата 34-1А (см. табл. 1, 2).

\* В процессе подготовки данной работы к публикации в литературе появилось сообщение о выделении антибиотика SM 196 В [13], строение которого идентично антибиотик 34-1.

Химические сдвиги протонов ( $\delta$ , м.д.) выделенных антибиотиков (CDCl<sub>3</sub>, 7,25 м.д.)

Компо- нент	1-Н	1-ОН	2а-Н (2-Н)	2б-Н	3-Ме	3-ОН	4а-Н (4-Н)	4б-Н	5-Н	6-Н (6-ОН)	8-OMe	9-Н	10-Н	11-Н
34-1	5,44	5,03	2,10	2,34	1,47	1,84	2,88	3,06	7,47	8,14	4,00	7,28	7,66	7,81
34-1А	6,92	*	2,06	2,51	1,42	*	2,96	3,08	7,51	8,25	4,03	7,29	7,68	7,80
34-2	-	11,15	(7,10)		2,47	-	(7,22)		8,09	8,26	4,06	7,33	7,72	7,91
**	-	11,15	(7,15)		2,49	-	(7,26)		8,13	8,31	4,08	7,36	7,75	7,95
34-3	-	-	2,98	3,10	1,50	1,80	3,16	3,16	7,52	8,28	4,03	7,29	7,70	7,75
**	-	-	3,03	3,03	1,49	2,29	3,16	3,16	7,50	8,26	4,03	7,29	7,70	7,74
34-4	-	-	2,92	3,01	1,56	1,69	3,08	3,08	6,98	(13,06)	4,05	7,31	7,73	7,74
**	-	-	2,94	2,94	1,45	2,51	3,05	3,05	6,92	(13,03)	4,02	7,30	7,72	7,69

\* Сигналы протонов ацетильных групп наблюдаются в области 1,98 и 1,61 м.д.

\*\* Данные для антибиотика X-14881 Е [11].

\*\* Данные для 6-дезон-8-О-метилрабедоминина [11].

\*\* Данные для 8-О-метилрабедоминина [11].

Константы спин-спинового взаимодействия  $^1\text{H}-^1\text{H}$  ( $J$ , Гц) выделенных антибиотиков

Компонент	$J_{1, \text{OH}}$	$J_{1, 2a}$	$J_{1, 2b}$	$J_{2a, 2b}$	$J_{2a, 4b}$	$J_{2b, 4a}$	$J_{4a, 4b}$	$J_{5, 6}$	$J_{9, 10}$	$J_{9, 11}$	$J_{10, 11}$
34-1	4,4	6,0	6,9	13,8	1,0	1,7	16,7	8,1	8,4	1,0	7,8
34-1A	—	6,1	6,1	14,3	<1	1,5	16,7	8,1	8,0	1,0	7,7
34-2	—	—	—	—	1,9	1,9	—	8,7	8,5	1,0	7,7
* 34-3	—	—	—	14,8	1,5	1,5	—	8,0	8,0	1,5	8,0
2*	—	—	—	15,0	0,8	—	—	8,1	8,3	1,3	7,6
34-4	—	—	—	15,1	1,9	—	—	8,0	8,0	1,5	8,0
3*	—	—	—	15,0	—	—	—	—	8,0	1,6	7,6
									8,0	1,5	8,0

\* Данные для антибиотика X-14881 E [11].

2\* Данные для 6-дезоксиг-8-О-метилрабеломидина [11].

3\* Данные для 8-О-метилрабеломидина [11].

Таблица 3

Химические сдвиги  $^{13}\text{C}$  выделенных антибиотиков (б, м.д. \*)

Положение углерода	34-1	34-2	34-3	[11] **	34-4	[11] **
C-1	65,25	154,98	199,40	196,9	198,43	195,8
C-2	43,95	119,65	54,30	53,8	54,30	53,6
C-3	69,07	141,08	73,10	72,5	72,55	71,9
C-4	45,38	121,09	44,70	44,0	44,86	44,1
C-4a	142,17	130,55	149,22	146,4	152,07	149,5
C-5	136,01	137,49	135,28	133,7	122,63	121,8
C-6	127,21	122,70	130,68	130,0	164,93	163,8
C-6a	136,01	136,63	136,09	135,1	118,93	117,6
C-7	182,27	182,06	182,81	181,4	186,29	188,1
C-7a	120,52	119,75	121,42	120,6	120,21	119,6
C-8	159,67	159,47	161,33	159,8	161,91	160,2
C-9	117,66	118,10	119,01	117,2	119,28	117,4
C-10	134,98	135,19	136,98	135,4	137,67	136,3
C-11	120,11	120,91	120,16	119,6	120,21	119,8
C-11a	137,03	137,20	138,97	137,7	139,07	137,7
C-12	187,75	190,60	186,04	184,6	189,41	184,6
C-12a	131,00	138,27	136,39	135,2	139,02	137,5
C-12b	140,09	119,04	135,40	134,2	128,25	127,0
3-Me	29,39	21,18	29,82	29,9	29,64	29,7
8-OMe	56,50	56,57	56,94	56,5	57,05	56,5

\* Химические сдвиги измерены относительно сигнала растворителя  $\text{CDCl}_3$  (77,00 м.д.) для соединений 34-1 и 34-2 и относительно сигнала растворителя  $\text{CD}_3\text{OD}$  (49,00 м.д.) для соединений 34-3 и 34-4.\*\* Данные для 6-дезоксиг-8-О-метилрабеломидина в  $\text{CDCl}_3$ .\*\*\* Данные для 8-О-метилрабеломидина в  $\text{CDCl}_3$ .

Полученные данные показывают, что компонент 34-1 отличается от 34-3 модификацией в положении 1 и является 1-дигидро-6-дезоксиг-8-О-метилрабеломидином. Этот вывод согласуется со значением  $m/z$  338 для иона  $[M]^+$ , полученным из масс-спектра, а также данными ИК- и УФ-спектроскопии.

Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР антибиотика 34-1 (табл. 3) полностью соответствует предложенной структуре. Наличие кросс-пиков между C-7 и H-6, а также между C-12 и H-11 в спектре гетероядерной корреляции химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  по дальним КССВ  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$  (рис. 3) свидетельствует о замещении антрахинонового цикла в положении 8, 12б и 4а.

Следующий этап нашего исследования — установление конфигурации заместителей в циклогексеновом фрагменте молекулы. Поскольку мети-

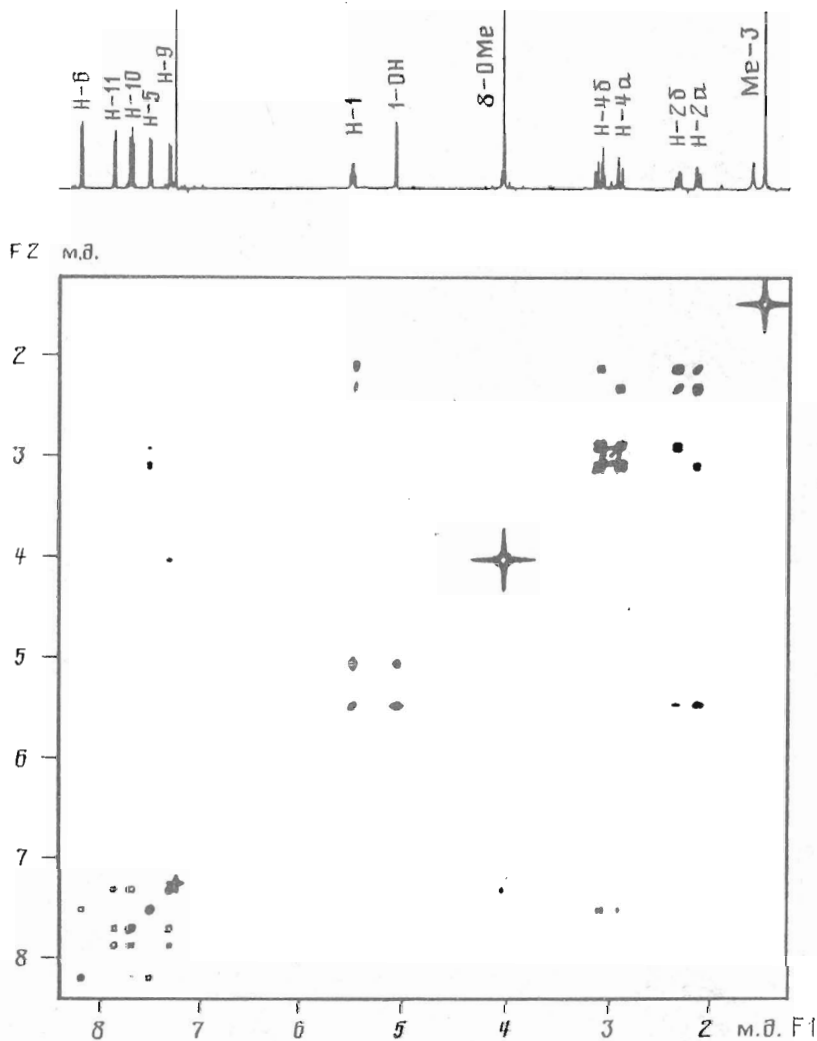


Рис. 2. Спектр гомоядерной корреляции химических сдвигов  $^1\text{H}$  антибиотика 34-1 в  $\text{CDCl}_3$

леновые протоны H-2a, H-2b и H-4a, H-4b проявляются в спектре в виде отдельных сигналов, молекула является стереохимически «жесткой». Учитывая наличие двух асимметрических центров C-1 и C-3, а также основную конформацию «полукресло» циклогексенового фрагмента молекулы, следует рассмотреть четыре теоретически возможных конформера (рис. 4).

Сравнение КССВ  $J_{1,2a}$  и  $J_{1,2b}$  (6,0 и 6,9 Гц) дает возможность заключить, что H-1 занимает псевдоэкваториальное положение. Эти данные позволяют исключить из рассмотрения конформеры Б и Г в качестве возможных для антибиотика 34-1. С помощью эксперимента по измерению величины ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) метиленовых протонов при селективном насыщении сигнала Me-3 определено псевдоэкваториальное положение метильной группы (см. рис. 5) [14]. На основании этих данных структуры типа В также исключаются из рассмотрения.

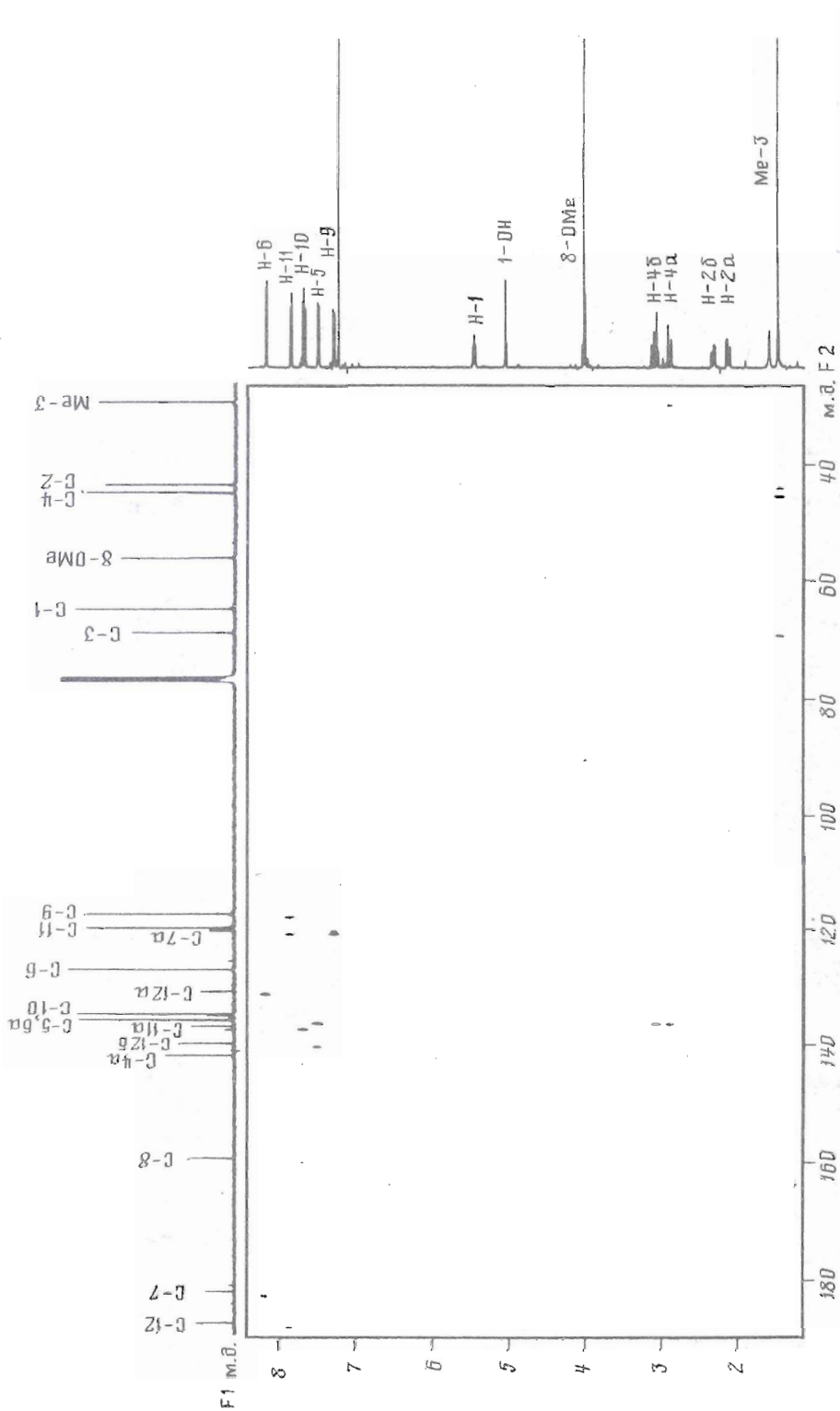


Рис. 3. Спектр гетероядерной корреляции химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  по дальним КССВ  $^{13}\text{C}$  -  $^{15}\text{N}$  антибиотика 34-1 ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $^nJ_{\text{C-N}} = 8,0$  Гц)

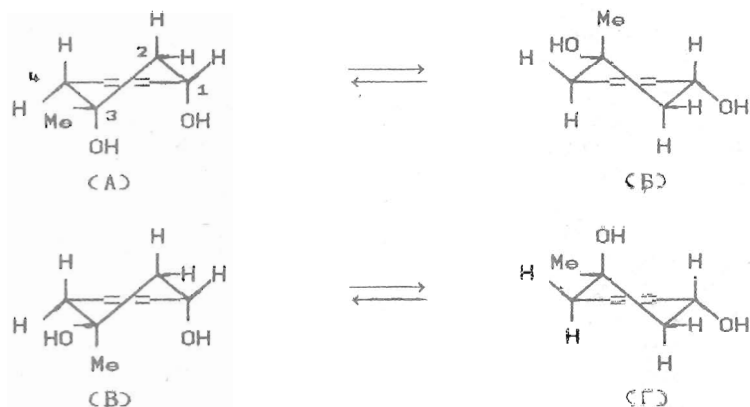


Рис. 4. Структура возможных конформеров соединения 34-1

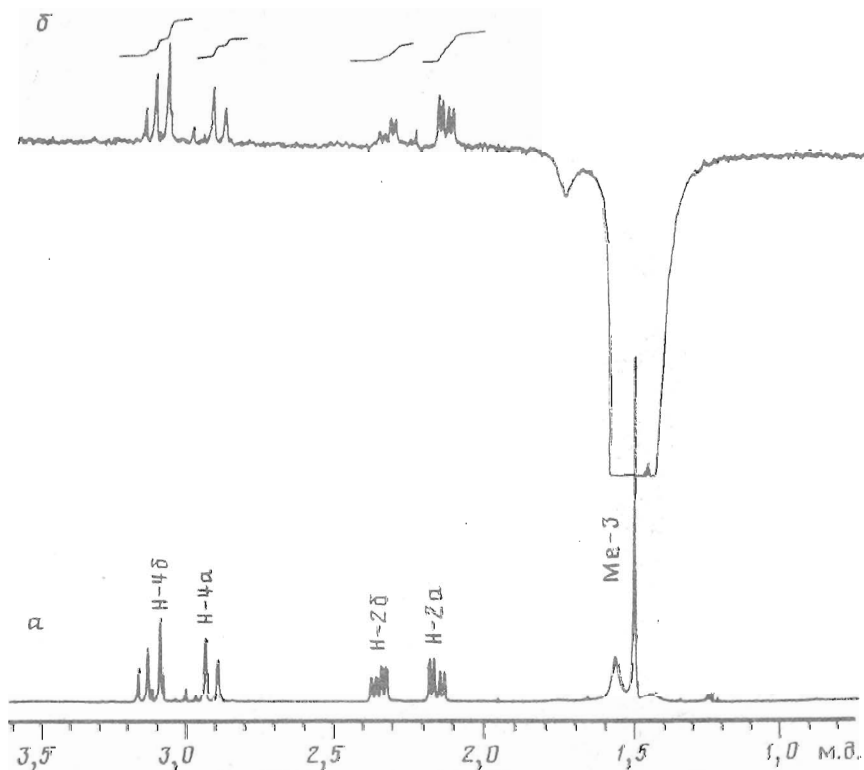


Рис. 5. Измерение ЯЭО метиленовых протонов H-2 $\alpha$ , $\delta$  и H-4 $\alpha$ , $\delta$  антибиотика 34-1 ( $\text{CDCl}_3$ ) при селективном насыщении сигнала Me-3:  $\alpha$  - фрагмент  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра;  $\delta$  - разностный спектр, полученный путем вычитания спектра ( $\alpha$ ) из спектра, полученного при селективном насыщении сигнала Me-3

Таким образом, циклогексеновый фрагмент молекулы антибиотика 34-1 имеет структуру А или ее оптического антипода с *цис*-диаксиальным расположением гидроксильных групп в положениях 1 и 3.

Интересно, что, несмотря на большое разнообразие антибиотиков, относящихся к 1,2,3,4-тетрагидробенз[*a*]антрахинонам, антибиотик 34-1

представляет собой один из немногих примеров природных бенз[а]антрахинонов, содержащих гидроксильную группу в положении 1 [11, 15, 16].

### Экспериментальная часть

Для получения антибиотического вещества штамм 34 выращивали на жидкой среде, содержащей (в г/л) соевую муку — 15; глицерин — 30; NaCl — 2 и CaCO<sub>2</sub> — 5 (рН 7,0), в течение 5 сут на качалке при 28° С.

Активность на всех этапах выделения и очистки антибиотиков контролировали методом диффузии в агар, используя в качестве тест-микробного организма *Bacillus mycooides* R-537.

Культуральную жидкость отделяли от мицелия, антибиотики дважды экстрагировали хлороформом при рН 8,0. На объем культуральной жидкости брали 0,5 объема хлороформа. Объединенные экстракты упаривали, вещество осаждали гексаном. Компоненты, составляющие полученный суммарный препарат, разделяли на колонке с силикагелем. В качестве подвижной фазы использовали хлороформ и смесь хлороформ — метанол, 20 : 3. Активные фракции объединяли, упаривали и дополнительно очищали препаративной хроматографией на пластинках с силикагелем (толщина слоя 0,75 мм) в системе растворителей хлороформ — бензол — метанол, 5 : 4 : 1 (А). Аналитическую ТСХ экстрактов и проверку чистоты полученных компонентов проводили на пластинках Silufol (Kavalier, ЧСФР) и Kieselgel (Merck, ФРГ) в системе А или в системе хлороформ — метанол, 10 : 1 (Б).

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре UV-5260 (Beckman, Австрия) в метаноле; ИК-спектры снимали в таблетках KBr на спектрометре SP-1100 (Pye Unicam, Великобритания). Масс-спектры электронного удара (EI-MS) получили на спектрометре Varian-MAT-112 при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и температуре ионного источника 240–230° С.

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре VXR-400 (Varian, США) с рабочей частотой для ядер <sup>1</sup>H 400 МГц, для ядер <sup>13</sup>C — 100,6 МГц. Регистрацию 2М-спектров гомоядерной корреляции химических сдвигов <sup>1</sup>H и гетероядерной корреляции химических сдвигов <sup>13</sup>C и <sup>1</sup>H проводили с помощью импульсных последовательностей COSY и HETCOR, входящих в состав математического обеспечения спектрометра. Ядерный эффект Оверхаузера измеряли с помощью импульсной последовательности NOEDIF.

Удельное оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer 241 (Швеция), температуру плавления — на приборе Buchi SMP-20 (Швейцария).

**Антибиотик 34-1.** Желтые кристаллы, т. пл. 186–187° С; мало растворим в воде и хорошо растворим в низших спиртах, хлороформе и этилацетате. C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>. [M]<sup>+</sup> 338. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +209,4° (с 0,5; MeOH). УФ-спектр, λ<sub>max</sub>, нм (ε): 215, 259, 375. ИК-спектр, см<sup>-1</sup>: 3500, 3450, 1665, 1590, 1570, 1275. R<sub>f</sub> 0,55 (А), 0,50 (Б).

Ди-О-ацетильное производное 34-1А получали ацетилированием соединения 34-1 уксусным ангидридом в пиридине.

**Антибиотик 34-2.** Темно-коричневые игольчатые кристаллы; нерастворим в воде, плохо растворим в низших спиртах, хорошо растворим в хлороформе. C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>. [M]<sup>+</sup> 318. УФ-спектр, λ<sub>max</sub>, нм (ε): 225, 312, 415. ИК-спектр, см<sup>-1</sup>: 1670, 1590, 1275. R<sub>f</sub> 0,95 (А), 0,6 (CHCl<sub>3</sub>).

**Антибиотик 34-3.** Желтый порошок; по растворимости близок к соединению 34-1. C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>. M 336. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -114,0° (с 0,1; MeOH). УФ-спектр, λ<sub>max</sub> нм (ε): 255, 420. ИК-спектр, см<sup>-1</sup>: 1710, 1680, 1590, 1275. R<sub>f</sub> 0,65 (А), 0,61 (Б).



Антибиотик 34-4. Ярко-желтый порошок; по растворимости близок к соединению 34-1.  $C_{20}H_{16}O_6$ .  $M$  352.  $[\alpha]_D^{20}$   $-69,0$  ( $c$  0,1; MeOH). УФ-спектр,  $\lambda_{max}$ , нм ( $\epsilon$ ): 263, 375. ИК-спектр,  $cm^{-1}$ : 1675, 1590, 1275.  $R_f$  0,76 (A), 0,60 (B).

Авторы выражают благодарность проф. М. Н. Преображенской за ценные замечания и предложения, высказанные в ходе обсуждения результатов, а также канд. хим. наук Б. В. Розынову (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина) за получение масс-спектров.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hopwood D. A., Wright H. M., Bibb M. J., Cohen S. N. // Nature. 1977. V. 268. № 5616. P. 171-174.
2. Baltz R. H. // J. Gen. Microbiol. 1978. V. 107. № 1. P. 93-102.
3. Дудник Ю. В., Козьяк Л. И. // Антибиотики и медицинская биотехнология. 1987. Т. XXXII. № 2. С. 86-89.
4. Gomi S., Ikeda D., Nakamura H., Naganama H., Yamashita F., Hotta K., Kondo S., Okami Y., Umezawa H., Itaka Y. // J. Antibiot. 1984. V. 37. № 11. P. 1491-1494.
5. Singh U., Singh S. K., Gurusiddaiah S. // Actinomycetes. 1987. 1988. V. 20. № 1. P. 7-25.
6. Hopwood D. A. // The Future of Antibiotherapy and Antibiotic Research / Eds Ninet L., Bost P. E., Bouanchaud D. H., Florent J. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Acad. Press, 1981. P. 407-414.
7. Новоженков М. Ю., Лажко Э. И., Маланicheва И. А. // Тез. докл. Всесоюз. конф. «Молодые ученые - биотехнологии». Москва, апрель 1989. М., 1989. С. 84.
8. Vax A., Freeman R., Morris G. A. // J. Magn. Res. 1981. V. 42. P. 164-168.
9. Vax A. // J. Magn. Res. 1983. V. 53. P. 517-520.
10. Vax A., Morris G. A. // J. Magn. Res. 1981. V. 42. P. 501-505.
11. Shigihara Y., Koizumi Y., Tamamura T., Homma Y., Isshiki K., Dobashi K., Nagaiwa H., Takeuchi T. // J. Antibiot. 1988. V. 41. № 9. P. 1260-1264.
12. Maehr H., Liu C., Liu M., Perrotta A., Smaelheer J. M., Williams T. H., Blount J. F. // J. Antibiot. 1982. V. 35. № 12. P. 1627-1631.
13. Grabley S., Hammann P., Hutter K., Kluge H., Thiericke R., Wink J., Zeeck A. // J. Antibiot. 1991. V. 44. № 6. P. 670-673.
14. Kinns M., Sanders J. K. M. // J. Magn. Res. 1984. V. 56. P. 518-520.
15. Oka M., Konishi M., Oki T. // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 51. P. 7473-7474.
16. Hayakawa Y., Ha S. Ch., Kim Y. J., Furihata K., Scto H. // J. Antibiot. 1991. V. 44. № 11. P. 1179-1186.

Поступила в редакцию  
28.II.1992

После доработки  
28.IV.1992

E. I. LAZHKO, M. Y. NOVOZHENOV, I. A. MALANICHEVA

#### ANTIBIOTICS FROM STRAIN 34, OBTAINED BY PROTOPLAST FUSION OF TWO *Streptomyces fradiae* STRAINS

*Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow*

Several antibiotics, active against grampositive bacteria, were isolated by chloroform extraction from fermentation broth of strain 34 obtained by intraspecific protoplast fusion between two different *Streptomyces fradiae* strains, which produced aminoglycoside antibiotic neomycin and macrolide antibiotic tylosin. Four of them were obtained as individual substances. The structures were determined by 1D and 2D NMR techniques. They were found to be related to a benz[*a*]anthraquinone group. The structures of substances 34-2, 34-3, and 34-4 were identical to antibiotics - X-14881E, 6-deoxy-8-O-methylrabelomycin and 8-O-methylrabelomycin, respectively. Antibiotic 34-1 (1-dihydro-8-deoxy-8-O-methylrabelomycin) is new in this group.