

## ХИМИЯ ПОЛИМИКСИНОВ И РОДСТВЕННЫХ ИМ АНТИБИОТИКОВ

*З. Т. Синицына и С. М. Мамиофе*

### ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	211
1. Полимиксины	212
2. Циркулин	217
3. Колистин (колимицин)	218
4. Полипептические антибиотики	219

### ВВЕДЕНИЕ

Из многочисленных известных в настоящее время антибиотиков наиболее сильным и специфическим действием на грамотрицательные бактерии обладают полимиксины. Полимиксины хорошо зарекомендовали себя при лечении ряда заболеваний (дизентерия, гастроэнтериты, менингиты и др.), возбудителями которых являются грамотрицательные микроорганизмы. Весьма ценным свойством полимиксинов является их способность подавлять рост синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*), почти не поддающейся действию других антибиотиков и нередко вызывающей гнойные инфекции и поражения кишечника.

Полимиксины образуют группу очень сходных между собой как в биологическом, так и в химическом отношении антибиотиков, продуцируемых различными штаммами *Bac. polytuxa* и родственными видами<sup>1</sup>.

Полимиксины были открыты в 1947 г. одновременно и независимо друг от друга тремя различными группами ученых Америки и Англии<sup>2-6</sup>.

Выделенные вначале полимиксины А и D, наряду с высокой терапевтической активностью, обладали нефротоксичностью. Полученные позже полимиксины B, E и C обладали аналогичным терапевтическим действием и при этом первые два не оказывали токсического действия на почки<sup>7-10</sup>. Родственные антибиотики, обозначенные полимиксинами A, B, C, D и E были объединены в одну группу полимиксинов<sup>6, 10, 11</sup>.

В 1946 г. из почв Москвы был выделен штамм *B. polytuxa*, продуцирующий новый тип полимиксина, названный полимиксином M<sup>12, 13</sup>. Дальнейшими исследованиями было установлено, что полимиксин B состоит из двух очень близких между собой антибиотиков, полимиксинов B<sub>1</sub> и B<sub>2</sub><sup>14, 15</sup>. Кроме полимиксинов к этой группе антибиотиков могут быть отнесены также родственные им антибиотики циркулины A и B<sup>16, 17</sup>, колистины (колимицины) A, B и C<sup>18-20</sup> и полипептины<sup>21</sup>.

Поскольку все типы полимиксинов обладают большим сходством в строении и свойствах и их изучение проводилось почти всегда параллельно, представляется целесообразным рассматривать их одновременно, выделив в отдельные абзацы других представителей этой группы антибиотиков.

## 1. ПОЛИМИКСИНЫ

*Общая характеристика полимиксинов.* Полимиксины легко образуются в процессе выращивания *Bac. polymyxa* на среде, содержащей различные питательные вещества. Из ферментационной жидкости антибиотик может быть выделен методами, основанными на осаждении, экстракции или сорбции антибиотика<sup>22-28</sup>.

Близость химического строения антибиотиков описываемой группы обусловливает сходство их физико-химических свойств. Все полимиксины являются полипептидами основного характера, образующими с кислотами ряд солей<sup>3, 13, 14, 22, 26-34</sup>. Некоторые из этих солей получены в кристаллическом виде. Все они дают характерные биуретовую и нингидриновую реакции, не дают реакций Молиша, Сакагуши, Паули и Гопкинса-Коля<sup>3, 32-35</sup>. Все полимиксины оптически активны;  $[\alpha]_D^{25}$  для полимиксина  $B_1 = -85,1^\circ$  ( $C = 2,33$  в 75% этаноле)<sup>15</sup>, для полимиксина  $M$   $[\alpha]_D^{25} = -48,1^\circ$  ( $C = 2,505$  в воде)<sup>13</sup>. Наиболее хорошо изучены свойства аморфных солей хлоргидрата и сульфата полимиксинов, легко растворимых в воде и метаноле. Сульфат полимиксина  $M$  нерастворим в метаноле<sup>\*</sup><sup>26</sup>. Его хлоргидраты и сульфаты плохо растворимы в этаноле и других органических растворителях<sup>3, 14, 26, 34, 36, 37</sup>. Пикраты, нерастворимые в воде, лучше растворимы в метаноле, этаноле и ацетоне<sup>34</sup>. Описано соединение полимиксина  $B$  с формалином и  $NaHSO_3$ , обладающее значительно меньшей токсичностью, чем его сульфат и хлоргидрат. Аналогичные соединения получены и с другими альдегидами<sup>3, 38-40</sup>.

В сухом состоянии соли полимиксинов сохраняют свою активность в течение ряда лет. Водные растворы полимиксинов также довольно стабильны и сохраняют активность при комнатной температуре в течение длительного времени при  $pH$  3-5. Щелочные растворы значительно менее стабильны, чем кислые<sup>3, 33, 36</sup>.

При изучении химической природы полимиксина  $M$  было замечено, что выдерживание антибиотика в 0,1  $N$  растворе аммиака при 37-38° в течение трех суток приводит к почти полной потере биологической активности. Авторы сообщают также предварительные данные о механизме инактивации полимиксина  $M$ <sup>41</sup>. О степени разложения полимиксина  $B$  при термическом воздействии указывается в работе<sup>42</sup>.

Как уже указывалось выше, все антибиотики описываемой группы сходны между собой как в биологическом, так и в химическом отношении. Более детальное изучение позволило обнаружить некоторые отличия в их составе и свойствах. Общим для антибиотиков этой группы является то, что все они представляют собой полипептиды основного характера, благодаря присутствию в них значительного количества  $\alpha, \gamma$ -диаминомасляной кислоты ( $\alpha, \gamma$ -ДАМК); все они содержат треонин и жирную кислоту, идентифицированную, за редким исключением, как 6-метилоктановая кислота (МОК). Отсутствие свободных карбоксильных и  $\alpha$ -аминогрупп позволило приписать им циклическую структуру, которая пока доказана для наиболее исследованных в настоящее время полимиксинов  $B$  ( $B_1$  и  $B_2$ )<sup>14, 15, 43-46</sup>,  $D$ <sup>30</sup> и  $M$ <sup>13</sup>. Полимиксин  $A$ , ранее известный как аэроспорин \*\*, менее изучен<sup>30, 33, 49-53</sup>, а о полимиксинах  $C$  и  $E$  в литературе имеются лишь весьма ограниченные сведения<sup>10, 11, 29, 54, 55</sup>.

\* Подобным образом в тех же условиях ведет себя торговый образец сульфата полимиксина  $B$  (активность 7757  $ed/mg$ ). В связи с этим вызывают сомнения данные автора<sup>36</sup> о растворимости сульфата полимиксина в метаноле.

\*\* В настоящее время наименование «аэроспорин» является торговой маркой полимиксина  $B$ <sup>47, 48</sup>.

ТАБЛИЦА 1

## Сравнительный аминокислотный состав различных типов полимиксина и родственных ему антибиотиков

Название антибиотика	Аминокислотный состав						Жирная кислота	Ссылка на литературу
	лейцин	L-изолейцин	L-треонин	D-серин	фенилаланин	α, γ-дигидро-α, γ-дигидро-α, γ-дигидро-		
Полимиксины								
A	+D	—	+	—	—	L+D, L	МОК	25, 30, 33, 49, 52, 56
B <sub>1</sub>	1L	—	2	—	1D	6 (1D+5L)	МОК	15, 25, 56
B <sub>2</sub>	1L	—	2	—	1	6	Изооктановая	
C	—	—	+	—	+L	+	+	10, 25, 56
D	1D	—	3	1	—	5L	МОК	25, 30, 56
E	+D	—	+	—	—	+L	+	20, 25, 56
M	1D	—	3	—	—	6	1	13, 57
Циркулин А	1D	1	2	—	—	6L	МОК	17, 58
Колистин	2(L+D)	—	1	—	—	5	МОК	20, 59
Полипептин *	2L	1	1	—	1D	3L	Оксигептанская кислота	21, 25, 56

\* В полипептине кроме указанных кислот содержится еще 1 моль D-валина.

Примечание: 1. Цифры в графах обозначают количество остатков соответствующих аминокислот в указанных антибиотиках.

2. Знак + указывает на наличие данной аминокислоты или неизвестной жирной кислоты, когда количество остатков не установлено.

3. Знак — указывает на отсутствие остатков аминокислоты или неизвестной жирной кислоты.

В настоящем обзоре более подробно будут рассмотрены работы последних лет, касающиеся строения полимиксинов В, М и циркулина А, и кратко разобраны данные, относящиеся к другим антибиотикам этой группы.

Полимиксины различаются между собой как качественным, так и количественным аминокислотным составом (табл. 1), инфракрасными спектрами поглощения <sup>60</sup>, скоростью движения на бумаге при хроматографировании и рядом других свойств <sup>11, 13, 61-63</sup>. Вследствие различной степени основности полимиксины В и Е осаждаются из водных растворов солей при их подщелачивании, а полимиксины А, С, Д и М в аналогичных условиях остаются в растворе \*.

Изучение свойств и химического состава этой группы веществ проводилось методами противоточного распределения, спектрального анализа, различных видов хроматографии и т. д. Следует подчеркнуть особую роль хроматографических методов, которые были широко использованы при обнаружении как отдельных аминокислот, входящих в состав молекулы полимиксинов, так и более крупных фрагментов низкомолекулярных пептидов, образующихся при частичном гидролизе. Близкие по своему составу вещества при хроматографировании на бумаге в некоторых системах растворителей вели себя совершенно отлично, что позволило например, разделить полимиксины А и D <sup>30</sup>. Различную скорость движения проявляли полимиксины А, В, С, Д и Е в системе бутанол-1—15%-ная уксусная кислота (1:1) <sup>64</sup>. Полимиксины В и М обнаруживают отличия в скорости их движения в системе бутиловый спирт—уксусная кислота—вода (2:1:1) <sup>13, 57</sup> и т. д.

\* В более ранних работах указывалось, что полимиксины А и D также могут осаждаться в виде оснований <sup>22, 30</sup>.

*Определение молекулярного веса* довольно крупной молекулы полимиксинов производилось разными методами. В среднем молекулярный вес приближается к 1200. Измерением осмотического давления группа английских ученых установила молекулярные веса полимиксинов А и D, соответственно равными 1293 и 1115<sup>30</sup>. При изучении мономолекулярных пленок четырех полимиксинов А, В, D и Е на поверхности раздела воздух — вода исследователи пришли к заключению, что молекулярные веса антибиотиков полимиксиновой группы мало отличаются между собой и составляют в среднем 1250<sup>65</sup>. Гаусман и Крейг для определения молекулярного веса полимиксина В<sub>1</sub> применили использованный ранее для изучения полипептина и других пептидов<sup>66, 67</sup> метод частичного динитрофенилирования<sup>15</sup>. При определении молекулярного веса полимиксина М был использован метод неполного динитрофенилирования с последующим разделением продуктов реакции электрофорезом на бумаге. Установлен молекулярный вес полимиксина М, равный  $1185 \pm 25$ <sup>68</sup>. Близкие результаты получены и другими авторами<sup>69</sup> при определении эквивалентного веса полимиксина М методом ионообменной сорбции. Показано, что в данном случае антибиотик ведет себя как 4-валентный ион, а эквивалентный вес его равен 280.

*Изучение аминокислотного состава* полимиксинов производилось на кислых гидролизатах, из которых предварительно исчерпывающе удалялась жирная кислота. При изучении полимиксина В (В<sub>1</sub>+В<sub>2</sub>)<sup>15</sup> остаток после выпаривания в вакууме подвергался противоточному распределению в системе бутанол-1 — бутанол-2 — 5%-ная HCl (1 : 1 : 2). Фракции, содержащие фенилаланин и лейцин, анализировались спектрофотометрически при  $\lambda = 259$   $m\mu$ . Дальнейшим противоточным распределением смеси этих аминокислот была разделена на отдельные компоненты  $\alpha, \gamma$ -ДАМК и треонин, двигавшиеся при распределении вместе, при повторном распределении также разделились нацело. Все четыре аминокислоты были перекристаллизованы и получены в аналитически чистом виде. Таким образом, в результате фракционирования гидролизатов было установлено, что полимиксин В<sub>1</sub> содержит  $\alpha, \gamma$ -ДАМК, треонин, лейцин, фенилаланин и жирную кислоту, идентифицированную как 6-метилоктановая. Принадлежность аминокислот к L или к D-ряду определялась при помощи кислотной D-аминодегидразы, избирательно разрушающей D-аминокислоты. После воздействия на гидролизат ферментом, на хроматограмме не обнаруживался фенилаланин, а содержание  $\alpha, \gamma$ -ДАМК относительно снижалось (с 6 до 5 остатков). Так было установлено, что все входящие в молекулу полимиксина В аминокислоты принадлежат к L-ряду, за исключением фенилаланина и одного остатка  $\alpha, \gamma$ -ДАМК, которые имеют D конфигурацию<sup>46</sup>. Подобным образом была выяснена конфигурация остатка лейцина и в полимиксинге А<sup>33, 51</sup>.

Изучение аминокислотного состава полимиксина М методом качественной и количественной хроматографии на бумаге с последующим выделением и идентификацией образовавшихся в результате гидролиза аминокислот показало, что молекула полимиксина М содержит один остаток D-лейцина, 3 остатка L- треонина и 6 остатков  $\alpha, \gamma$ -ДАМК<sup>13, 57</sup>. Подтверждением этих данных служили и результаты противоточного распределения продуктов динитрофенилирования гидролизатов полимиксина М<sup>13</sup>. Таким образом, полимиксин М по своему аминокислотному составу (табл. 1) отличается от всех известных типов полимиксина и от близких им антибиотиков, за исключением полимиксинов Е и А. От последнего полимиксин М резко отличается отсутствием токсического действия на почки, а от полимиксина Е — отсутствием способности осаждаться при щелочном значении рН<sup>13</sup>.

*Изучение характера свободных групп.* Характер свободных (концевых) групп в молекуле полимиксина и родственных ему антибиотиков изучался обычными методами исследования пептидов. Обычным и фор-

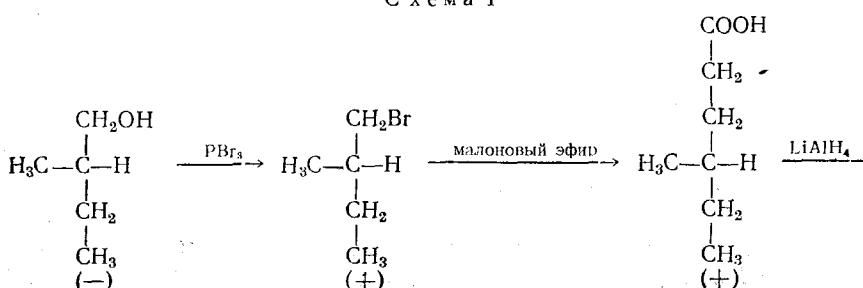
мольным титрованиями было доказано отсутствие свободных карбоксильных групп в молекуле полимиксина D<sup>30</sup>. К тем же результатам привела попытка обнаружить карбоксильные группы в молекуле полимиксина В тиогидантоновым методом<sup>46</sup> и действием диазометана на молекулу полимиксина B<sub>1</sub><sup>43</sup>. Электрофоретическое поведение полимиксина M и его ДНФ-производного также указывает на отсутствие свободных карбоксильных групп в молекуле. Этот факт подтвердился и при воздействии на полимиксин M гидразином<sup>13, 57</sup>. Во всех случаях было определено установление отсутствие свободной карбоксильной группы. Характер свободных аминогрупп в молекуле полимиксинов изучался путем перевода их в динитрофенильные производные, которые затем подвергались гидролизу<sup>13, 30, 43, 57, 70</sup>. Из гидролизатов были выделены  $\gamma$ -2,4-динитрофенильные (ДНФ) производные  $\alpha, \gamma$ -ДАМК, идентифицированные сравнением с ДНФ-производными синтетического образца  $\alpha, \gamma$ -ДАМК. Отсутствие в гидролизатах ДНФ-производных полимиксинов каких-либо других ДНФ-аминокислот свидетельствует о том, что в молекуле полимиксина свободными аминогруппами являются  $\gamma$ -аминогруппы  $\alpha, \gamma$ -ДАМК. Однако Бэллом и сотрудниками<sup>30</sup> впервые в общем гидролизате полимиксина D наряду с ДНФ-производными обнаружено небольшое количество незамещенной L- $\alpha, \gamma$ -ДАМК и, поскольку при количественном анализе гидролизата (хроматографически) были получены 4 моля  $\gamma$ -ДНФ  $\alpha, \gamma$ -ДАМК, то был сделан вывод об ацилировании  $\gamma$ -аминной группы этой кислоты 6-метилоктановой кислотой.

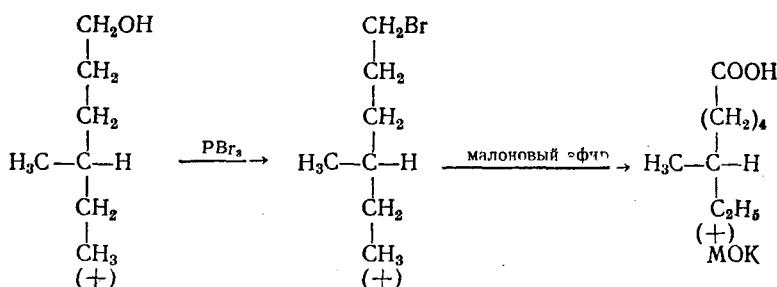
Аналогичным образом установлено присутствие в гидролизате ДНФ полимиксина и одного моля незамещенной  $\alpha, \gamma$ -ДАМК, которая участвует в образовании амидных связей не только  $\alpha$ -, но и  $\gamma$ -аминогруппой. Возможно в полимиксине M<sup>57</sup> имеется разветвление пептидной цепи с участие одной из аминогрупп  $\alpha, \gamma$ -ДАМК, аналогичное тому, какое есть в полимиксине B<sup>43</sup>.

**Жирная кислота.** В состав всех полимиксинов, как уже указывалось выше, входит жирная кислота, которая была извлечена из кислого гидролизата эфиром и очищена перегонкой в вакууме или при помощи ее бромтиурониевой соли<sup>13, 15, 30, 32</sup>. Сопоставление инфракрасных спектров, а также аналитических данных, полученных при изучении амидов и серебряных солей этой кислоты с синтетическим образцом показало, что в молекуле всех известных типов полимиксина и родственных им антибиотиков входит L-(+) 6-метилоктановая (изопеларгоновая) кислота, и только в состав полимиксина B<sub>2</sub> входит изооктановая кислота<sup>15</sup>, идентичная кислоте, ранее обнаруженной в жире, выделенном из шерсти<sup>14, 30, 31, 33, 52, 71-75</sup>.

В литературе описано несколько методов синтеза рацемической и оптически активной МОК. Особого внимания заслуживают синтезы<sup>71, 76</sup> ее из L-(-)-2-метилбутанола-1, подтверждающие ее принадлежность к L-ряду<sup>71</sup>. Синтез, опубликованный в 1960 г.<sup>75</sup>, отличается от ранее описанного большей простотой и может быть представлен схемой 1.

Схема 1

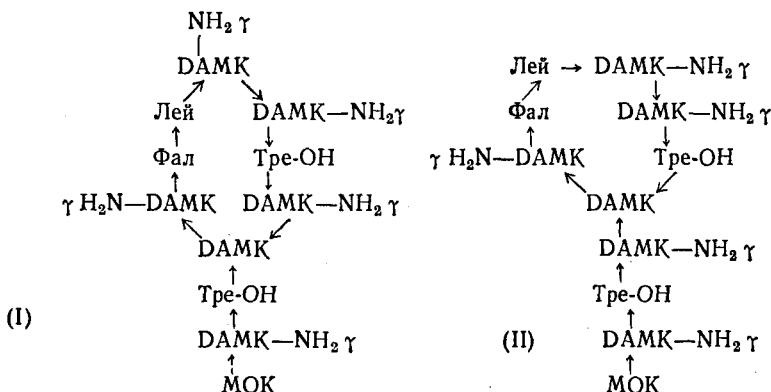




*Последовательность аминокислот в молекуле полимиксина В (В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub>).* Изучением последовательности аминокислотных остатков, входящих в молекулу полимиксина В, занимались одновременно и независимо друг от друга две группы ученых. В сообщении Гаусмана<sup>43</sup> подробно изложен путь этих исследований, который кратко сводится к следующему. Полностью замещенный ДНФ-полимиксин В<sub>1</sub> подвергался частичному гидролизу кислотой и, полученная в результате гидролиза, смесь пептидов фракционировалась посредством многочисленных диализов и противоточным распределением в различных системах растворителей. Были выделены в чистом виде 14 ДНФ замещенных пептидов. Последующее детальное изучение этих пептидов и их ДНФ производных до и после гидролиза при помощи противоточного распределения, электрофореза и хроматографии на бумаге позволило определить положение всех аминокислот. На основании полученных данных автор предлагает эмпирическую формулу и два возможных варианта структурной формулы полимиксина В<sub>1</sub> (схема 2).

Схема 2

Предположительная структура полимиксина В<sub>1</sub> (C<sub>56</sub>H<sub>99</sub>O<sub>14</sub>N<sub>16</sub>)<sup>43</sup> (стрелкой показано направление от CO к NH-группе).



Условные обозначения: ДАМК NH<sub>2</sub>-γ — остаток α,γ-диаминомасляной кислоты; Лей — остаток лейцина; Фал — остаток фенилаланина; Тре — остаток треонина; МОК — остаток 6-метилоктановой кислоты.

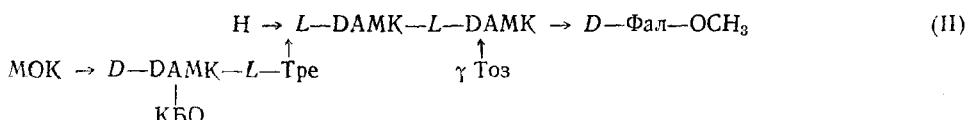
Структура (I) схемы 2 представляет собой большое кольцо, состоящее из 8 аминокислот и бокового пептидного разветвления, заканчивающегося остатком 6-метилоктановой кислоты. Отличием структуры (II) является только то, что один остаток ДАМК вместо кольца, которое теперь становится семичленным, выделен в боковую цепочку. Чтобы выбрать одну из двух предлагаемых структур нужно было выделить пептид: МОК → ДАМК → Тре → ДАМК → ДАМК → Фал. Однако пептидная

связь, включающая аминогруппу треонина, неустойчива к кислотам и поэтому не удалось выделить пептид, в котором бы треонин не был N-концевым.

Французские авторы<sup>46, 76-78</sup> с целью разделения продуктов частичного гидролиза полимиксина В применили сильно кислый катионит Дауэкс-50. Вымывание проводили фракционно семью различными буферными растворами. Качественный и количественный состав выделенных пептидов определялся методом одно- и двумерной хроматографии. Пептиды, содержащие фенилаланин, были выделены из кислого гидролизата при помощи хроматографии на особым образом обработанном активированном угле. Фракции, элюированные с угля дистиллированной водой, насыщенной этилацетатом и сероводородом были изучены при помощи электрофореза на бумаге. Определив строение выделенных пептидов, большинство из которых были идентичны пептидам, выделенным и изученным Гаусманом, а также установив отсутствие свободных  $\alpha$ -амино- и карбоксильной групп, авторы также пришли к 8- или 7-членной структурам с той же последовательностью аминокислотных остатков, какие предложили и американские авторы.

Основным затруднением в выборе той или иной структуры является отсутствие фермента<sup>43-46</sup>, который бы мог избирательно расщеплять пептид в нужном звене. Осталось также неясным, за счет какой из двух  $\alpha$ - или  $\gamma$ -аминогруппы диаминомасляной кислоты цепь разветвляется.

Для подтверждения предложенной структуры рядом исследователей была предпринята попытка синтезировать молекулу полимиксина В. В 1959 г. был опубликован синтез полимиксина В<sub>1</sub><sup>75-79, 80</sup>. С этой целью был получен ряд низкомолекулярных пептидов, включая пентапептиды (I и II).



Часть пептидов была ранее известна и описана, а некоторые впервые получены авторами и характеризованы как новые вещества. Из двух пентапептидов (I) и (II), аминогруппы которых были защищены различными остатками такими, как формил (Фор), карбобензилокси (Кбо) и остаток *p*-толуолсульфокислоты (Тоз), путем циклизации карбодиимидным методом был получен циклопептид, не дающий нингидриновой реакции и содержащий все составные аминокислоты. Свободный декапептид получен снятием защитных групп при воздействии натрием в жидким аммиаке. Строение полипептида полностью совпало с предложенной структурой (I) (схема 2). Сравнительное хроматографирование на бумаге, а также сопоставление биологической активности препаратов синтетического и природного образцов сульфата полимиксина В показало, что скорости их движения на бумаге близки между собой, но первый обладает меньшей биологической активностью. В связи с этим авторы считают необходимой дальнейшую очистку полученного синтетического препарата и сравнение его с полимиксином В<sub>1</sub>.

## 2. ЦИРКУЛИН

Переходим к описанию близких полимиксину антибиотиков полипептидной природы, из которых наиболее широко изучен циркулин, впервые описанный в 1948 г.<sup>16, 81-86</sup>. Подобно полимиксинам, циркулин

является полипептидом основного характера, образующим соли с кислотами. Он избирательно действует на грамотрицательные микроорганизмы, но отличается аминокислотным составом (табл. 1), а также отношением к липазе и щелочи<sup>81, 82, 85, 86</sup>. В присутствии последних циркулин полностью инактивируется, что не наблюдалось у полимиксинов<sup>87, 88</sup>.

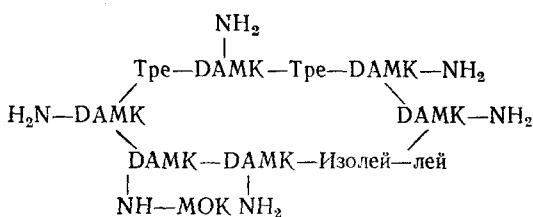
Изучению химического состава и строения циркулина посвящен ряд работ<sup>82, 83, 86</sup>. Однако эти данные не вполне достоверны, так как исследования проводились на недостаточно однородных образцах антибиотика. Позднее при помощи хроматографии на бумаге было показано, что циркулин состоит из двух очень близких антибиотиков — циркулина А и циркулина В<sup>17</sup>.

Окончательно аминокислотный состав и строение циркулина А были установлены Коффлером и сотрудниками. Результаты исследований были сообщены в 1958 г. на IV Биохимическом конгрессе в Вене<sup>58</sup>. По этим данным, из шести  $\gamma$ -аминогрупп  $\alpha, \gamma$ -ДАМК пять оказались свободными. Авторы убедительно показали, что остаток жирной кислоты присоединен к циклопептиду не посредством гидроксильной группы треонина, как это предполагали ранее<sup>86, 87</sup>, а N-ацильной связью с  $\gamma$ -аминогруппой ДАМК<sup>89</sup>. Это хорошо согласуется с тем фактом, что: 1) при воздействии гидроксиламина на хлоргидрат циркулина А не было получено гидроксамовой кислоты; 2) ДНФ-производное циркулина А при гидролизе дает наряду с ДНФ-замещенными аминокислотами и жирной кислотой одну молекулу незамещенной  $\alpha, \gamma$ -ДАМК; последняя не была обнаружена после гидролиза ДНФ-замещенного циклопептида, лишенного остатка жирной кислоты; 3) фрагмент, выделенный при частичном гидролизе хлоргидрата циркулина А, содержал ДАМК и МОК в отношении 3 : 1. Из ДНФ производного этого пептида выделены  $\alpha$ -амино- $\gamma$ - (2,4-динитроанилин)-масляная кислота и ДАМК в отношении 2 : 1.

С целью выяснения последовательности сцепления тех остатков аминокислот, из которых построена молекула циркулина, последний, подобно полимиксину В<sub>1</sub>, подвергался частичному гидролизу. Структура низкомолекулярных пептидов была определена при помощи динитрофенилирования и фермента карбоксипептидазы.

Исходя из полученных результатов для циркулина А была предложена следующая структура (схема 3):

Схема 3  
Структурная формула циркулина



Теми же авторами показано, что циркулин является липопептидным антибиотиком, разрушающим на клеточные оболочки или цитоплазматические мембранны чувствительных к нему микроорганизмов. С целью выяснения зависимости бактерицидного действия циркулина от строения его молекулы, последняя подвергалась частичным изменениям, и выделенные отдельные фрагменты испытывались на антибактериальную активность параллельно с неповрежденным циркулином. Было показано, что циклопептид, лишенный жирной кислоты, также как и другие фрагменты молекулы, обладают во много раз меньшей активностью, чем неповрежденный антибиотик<sup>90</sup>.

### 3. КОЛИСТИН (КОЛИМИЦИН)

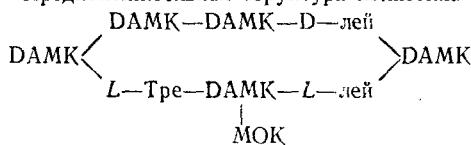
Антибиотик колистин описан японскими авторами в 1950 г.<sup>18, 20</sup>. Под названием колистина и колимицина он широко изучался в Японии, Италии и Франции. Описаны соли колистина с различными кислотами, а также его производное с формальдегидом и  $\text{NaHSO}_3$  — так называемый натрий колистинметансульфонат<sup>20, 91–95</sup>. Антибиотик характеризуется термостабильностью и весьма высокой устойчивостью к действию кислот, пепсина и панкреатина<sup>96</sup>.

Японские авторы при помощи хроматографии на бумаге установили наличие в образцах колистина трех компонентов, обозначенных как колистины А, В и С<sup>19</sup>. Последние характеризовались различными значениями *Rf*. Изучением кислотного гидролизата методом хроматографии на бумаге был установлен качественный аминокислотный состав колистина и характер жирной кислоты<sup>94, 97</sup>. Дальнейшие исследования с применением различных новейших методов позволили установить количественный аминокислотный состав этого антибиотика. Колистин содержит *L*-*a*,  $\gamma$ -ДАМК, *L*-треонин, *D*-лейцин, *L*-лейцин и МОК в соотношениях 5 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 (табл. 1). В колистине обнаружены свободные четыре аминогруппы и одна оксигруппа. Молекула не имеет концевых карбоксильных и аминогрупп и, как другие члены этой группы антибиотиков, имеет циклопептидное строение.

При помощи ионообменной хроматографии, электрофореза на бумаге и других методов из частичного гидролизата были выделены и охарактеризованы 7 пептидов<sup>59, 91</sup>. На основании полученных данных была установлена последовательность аминокислот, составляющих молекулу<sup>63</sup>, и предложена следующая структурная формула колистина (схема 4)<sup>20</sup>.

Схема 4

### Предположительная структура колистина



#### 4. ПОЛИПЕТИН

Из описанной группы антибиотиков полипептидов следует несколько выделить антибиотик полипептин, который наряду с компонентами, общими для всех членов этой группы, содержит характерную для него аминокислоту: *D*-валин<sup>66</sup>. Методом противоточного распределения антибиотик был разделен на два полипептида, обладающих близким аминокислотным составом<sup>67</sup>. Один из них изучен более детально, в результате чего установлены его молекулярный вес и аминокислотный состав (табл. 1). Полипептин отличается от антибиотиков рассматриваемой группы не только аминокислотным составом, но и характером остатка жирной кислоты, которая, по данным Крейга, является, вероятно, оксигентановой кислотой<sup>25, 56</sup>.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. М. Шемякин, А. С. Хохлов, Химия антибиотических веществ, Госхимиздат, 1953.
  2. R. G. Benedict, A. P. Langlykke, *J. Bact.*, **54**, 24 (1947).
  3. R. G. Stansly, H. G. Shepherd, H. White, *J. Bull Johns Hopkins Hosp.*, **81**, 43 (1947).
  4. G. C. Ainsworth, A. M. Brown, *G. Brownlee, Nature*, **160**, 263 (1947).
  5. P. G. Stansly, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 855 (1949).
  6. G. Brownlee, *там же*, **51**, 875 (1949).
  7. P. N. Swift, S. R. M. Bushby, *Lancet*, **264**, 110 (1953).

8. G. Brownlee, S. R. M. Bushby, там же, 254, 127 (1948).
9. G. Brownlee, S. R. M. Bushby, E. J. Short, Brit. J. Pharmacol. a. Chemother., 7, 170 (1952).
10. T. S. G. Jones, Ann. N. Y. Acad. Sci., 51, 909 (1949).
11. P. G. Stansly, G. Brownlee, Nature, 163, 611 (1949).
12. С. А. Ильинская, В. С. Россовская, Антибиотики, 4, 10 (1958).
13. А. С. Хохлов, А. Б. Силаев, В. М. Степанов, Е. П. Юликова, Е. В. Трошко, Е. Д. Левин, С. М. Мамиофе, З. Т. Синицына, Чи Чан-цин, Н. К. Соловьева, С. А. Ильинская, В. С. Россовская, В. С. Дмитриева, С. М. Семенов, Р. А. Вейс, Е. К. Березина, Л. К. Рубцова, Антибиотики, 1, 3 (1960).
14. P. P. Regna, I. A. Solomons, B. K. Forscher, A. E. Timreck, J. Clin. Invest., 28, 1022 (1949).
15. W. Hausmann, L. C. Craig, J. Am. Chem. Soc., 76, 4892 (1954).
16. E. J. Myrray, P. A. Tefraut, O. W. Kaufmann, H. Koffler, D. H. Peterson, D. R. Colingsworth, J. Bact., 57, 305 (1949).
17. I. H. Dowling, H. Koffler, H. C. Reitz, D. H. Peterson, P. D. Tefraut, Science, 116, 147 (1952).
18. J. Коуати, Яп. пат. 1946 (1952); С. А., 47, 6097g (1953).
19. T. Oda, M. Kinoshita, O. Yamamoto, F. Ueda, J. Pharm. Soc. Japan, 74, 1243 (1954); С. А., 49, 4785d (1955).
20. B. S. Schwartz, M. R. Warren, F. A. Barkley, L. Landis, Antibiotics Annual, 1959—1960.
21. S. F. Howell, J. Biol. Chem., 186, 863 (1950).
22. J. N. Porter, R. Brochard, G. Krupka, P. Little, J. Zellat, Ann. N. Y. Acad. Sci., 51, 857 (1949).
23. P. G. Stansly, M. E. Schlosser, N. H. Ananenko, M. H. Cook, J. Bact., 55, 573 (1948).
24. M. Нерольд, Antibiotika, Berlin, 1956.
25. Therapie, 11, 961 (1956).
26. С. М. Мамиофе, З. Т. Синицына, А. С. Хохлов, Антибиотики, 4, 6 (1958).
27. С. М. Мамиофе, З. Т. Синицына, А. С. Хохлов, Там же, 1, 10 (1959).
28. J. B. Dianond, Англ. пат. 742589; РЖХим., 1959, 43509.
29. S. R. M. Bushby, Ам. пат. 2759868; С. А., 50, 17345b (1956).
30. P. H. Bell, I. F. Bone, I. P. English, C. F. Fellows, K. S. Howard, M. M. Rogers, R. G. Shepherd, R. Winterbottom, A. C. Dornbush, S. Kushner, Row Subba, J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 51, 897 (1949).
31. S. Wilkinson, Nature, 164, 622 (1949).
32. Handbook of toxicology, v. II. Antibiotics. Ed. Spector, Philadelphia a. London, 1957, стр. 147.
33. J. R. Catch, T. S. G. Jones, S. Wilkinson, Ann. N. Y. Acad. Sci., 51, 917 (1949).
34. R. G. Shepherd, P. G. Stansly, R. Winterbottom, I. P. English, C. E. Fellows, N. H. Ananenko, G. L. Guillet, J. Am. Chem. Soc., 70, 3771 (1948).
35. H. Fischbach, I. Levine, Antibiot. a. Chemother., 3, 1159 (1953).
36. F. H. Buckwalter, J. Am. Pharm. Assoc., Pract. Ed., 15, 694 (1954).
37. P. J. Weiss, M. L. Andrew, W. W. Wright, Antib. a. Chemother., 7, 374 (1957).
38. P. G. Stansly, R. G. Shepherd, R. Winterbottom, Ам. пат. 2599950; С. А., 47, 276e (1953).
39. F. F. Gavarro, A. R. Perez, Ciencia, 4, 145 (1954); С. А., 49, 5685e (1955).
40. P. Соорег, Chem. a. Drug., 164, 94 (1955); РЖБх., 1957, 3760.
41. А. Б. Силаев, Антибиотики, 6, 3 (1960).
42. W. Wendlandt, M. Zief, Naturwiss., 45, 467 (1958).
43. W. Hausmann, J. Am. Chem. Soc., 78, 3663 (1956).
44. E. J. Short, Biochem. J., 43, LXII (1948).
45. G. G. F. Newton, A. M. Abraham, J. Pharm. a. Pharmacol., 10, 401 (1958).
46. G. Biserte, M. Dautrevaux, Bull. Soc. chim. biol., 39, 795 (1957).
47. Antibiot. a. Chemother., 4, 477 (1954).
48. Lancet, Gener. advertiser., 266, 25 (1954).
49. T. S. G. Jones, Biochem. J., 42, XXXV (1948).
50. J. R. Catch, T. S. Jones, Biochem. J., 42, LII (1948).
51. T. S. G. Jones, Biochem. J., 42, LIX (1948).
52. J. R. Catch, T. S. G. Jones, S. Wilkinson, Biochem. J., 43, XXVII (1948).
53. S. Wilkinson, J. Chem. Soc., 1951, 104.
54. R. E. A. Drey, G. E. Foster, G. A. Stewart, J. Pharm. a. Pharmac., 7, 707 (1955).
55. G. Brownlee, S. R. M. Bushby, Ann. N. Y. Acad. Sci., 51, 952 (1949).
56. L. S. Craig, в кн. Proc. 3th International Congress of Biochemistry, Brussels, 1955, стр. 418.
57. А. Б. Силаев, В. М. Степанов, Е. П. Юликова, Е. В. Трошко, Е. Д. Левин, ЖОХ, 31, 297 (1961).
58. H. Koffler, T. Kobayashi, в кн. 4th International Congress of Biochemistry Abstracts of Papers, Vienna, 1958.

59. K. Suzuki, Tohoku Vakka Daigaku Kiyo, **4**, 117 (1957); C. A., **52**, 8235f (1952).
60. R. C. Gore, E. M. Peterson, Ann. N. Y. Acad. Sci., **51**, 924 (1949).
61. A. G. Mistretta, Antibiot. a. Chemother., **6**, 196 (1956).
62. C. R. Rehm, S. C. Slack, W. J. Mader, Analyt. Chem., **31**, 749 (1959).
63. G. Biserte, M. Dautrevaux, Compt. rend. soc. biol., **151**, 1888, 1957 (1958).
64. T. S. G. Jones, Brit. Med. Bull., **10**, 226 (1954).
65. A. Y. Few, J. H. Schulman, Biochem. J., **54**, 171 (1953).
66. W. Hausmann, L. C. Craig, J. Biol. Chem., **198**, 405 (1952).
67. A. R. Battersby, L. C. Craig, J. Am. Chem. Soc., **74**, 4023 (1952).
68. В. М. Степанов, А. Б. Силаев, Г. С. Катруха, Биохимия, **25**, 749 (1960).
69. Л. Ф. Яхонтова, Б. П. Бруис, С. Н. Ковардыкова, Антибиотики, **2**, 6, (1960).
70. F. Sanger, Biochem. J., **39**, 509 (1945).
71. L. Crombie, S. H. Horper, J. Chem. Soc., **1950**, 2685.
72. P. A. Levene, R. E. Marker, J. Biol. Chem., **95**, 153 (1932).
73. R. A. Levene, R. E. Marker, J. Biol. Chem., **103**, 299 (1933).
74. J. Cason, F. S. Prout, J. Am. Chem. Soc., **66**, 46 (1944).
75. K. Vogler, L. H. Chopard-dit-yean, Helv. Chim. Acta, **43**, 279 (1960).
76. C. Biserte, M. Dautrevaux, C. r., **243**, 923 (1956).
77. G. Biserte, M. Dautrevaux, C. r., **242**, 1801 (1956).
78. M. Dautrevaux, G. Biserte, Bull. Soc. Chim. Biol., **39**, 353 (1957).
79. K. Vogler, P. Lanz, W. Lergier, Experientia, **15**, 334 (1959).
80. K. Vogler, P. Lanz, Helv. Chim. Acta, **43**, 270 (1960).
81. C. Mc Leod, J. Bact., **56**, 749 (1948).
82. P. A. Tetrault, H. Koffler, O. W. Kaufmann, L. V. Quinn, J. Clin. Invest., **28**, 1053 (1949).
83. D. H. Peterson, L. M. Reineke, J. Clin. Invest., **28**, 1053 (1949).
84. D. K. Colingsworth, Ам. пат. 2686753; РЖХим., **1956**, 10980 п.
85. P. A. Tetrault, Ам. пат. 2676133; РЖХим., **1956**, 2059 п.
86. D. H. Peterson, L. M. Reineke, J. Biol. Chem., **181**, 95 (1949).
87. D. H. Peterson, H. Koffler, P. A. Tetrault, H. C. Reitz, Science, **116**, 123, (1952).
88. P. G. Stansly, N. H. Ananeko, Arch. Biochem., **15**, 473 (1947); C. A., **42**, 3847i (1948).
89. J. E. Grady, H. Koffler, J. L. Parsons, T. Kobayashi, P. A. Tetrault, Fed. Proc., **17**, 233 (1958).
90. H. Koffler, T. Kobayashi, В кн. 4th International Congress of Biochemistry, Abstracts of Papers, Vienna, 1958.
91. T. Kurihara, K. Suzuki, J. Pharm. Soc. Japan., **73**, 414 (1953); РЖБх., **1956**, 16416.
92. W. W. Wright, H. Welch, Antibiotics Annual, 1959—1960.
93. Я. Кояма, А. Курасава, Д. Токайрин. Яп. пат. 4898; РЖХим., **1960**, 49037н.
94. J. Shoji, M. Hamada, S. Watanabe, K. Chiba, A. Kurozawa, Y. Koyama, J. Antib. (Japan) Ser B, **12**, 365 (1959), C. A., **54**, 9205c (1960).
95. К. Фудзиока, С. Намики, (Ясима караку кабусики кайся), Яп. пат. 6624; РЖХим., **1960**, 49036н.
96. G. Biserte, M. Dautrevaux, C. r. Soc. Biol., **153**, 1346 (1959).
97. T. Oda, F. Ueda, J. Pharm. Soc. Japan, **74**, 1246 (1954); РЖБх., **1956**, 11253.

Всес. Н.-И. ин-т антибиотиков СССР