

Химическое модифицирование противогрибковых макролидных полиеновых антибиотиков

С.Е.Соловьева, Е.Н.Олсуфьева, М.Н.Преображенская

Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе

Российской академии медицинских наук

119021 Москва, ул. Б. Пироговская, 11, факс (499) 245–0295

Обзор посвящен достижениям за последние 15 лет в области изучения методов получения полиеновых антибиотиков (амфотерицина В, партрицина А и др.) и связи «структура–активность». Рассмотрены современные подходы, сочетающие химический синтез и генную инженерию. Особое внимание уделено созданию полусинтетических противогрибковых препаратов, активных в отношении резистентных к химиотерапии патогенов и имеющих лучший терапевтический индекс. Освещены последние результаты по изучению механизмов действия полиенов. Библиография — 62 ссылки.

Оглавление

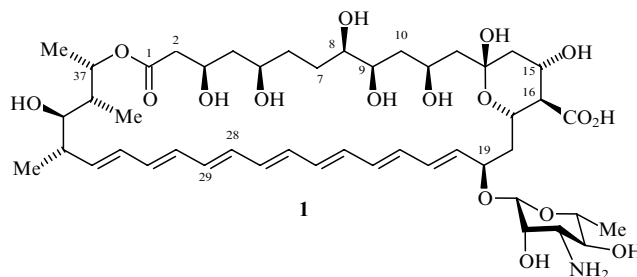
I. Введение	115
II. Природные и генно-инженерные полиеновые макролидные антибиотики	116
III. Полусинтетические производные полиеновых макролидных антибиотиков: получение и свойства	119
IV. Конъюгаты амфотерицина В с макромолекулами	133
V. Заключение	137

I. Введение

За последние 20 лет резко возросло число больных с грибковыми инфекциями (микозами), как поверхностными, так и инвазивными (системными). Это связано прежде всего со значительным увеличением числа пациентов с иммунодефицитом.^{1,2} Особую опасность представляют инвазивные микозы. Например, инвазивный кандидоз характеризуется тяжестью клинических проявлений и высокой (30–70%) смертностью, а смертность при инвазивном аспергиллезе превышает 50%.¹ Частота заболеваний инвазивным микозом в онкогематологических стационарах достигает 50%, и даже при интенсивной противогрибковой терапии смертность от микозов детей, больных лейкозом, составляет 29–39%.³

Арсенал средств для лечения системных грибковых инфекций ограничен. Уже более 50 лет для этой цели приме-

няются полиеновые макролидные антибиотики, среди которых наиболее важен амфотерицин В (AmB, **1**) благодаря его высокой эффективности и широкому спектру действия.



Успешное применение противогрибковых препаратов из класса азолов на какое-то время отодвинуло полиеновые макролиды на второй план, однако быстрое привыкание микроорганизмов к азолам^{1,2} стимулировало поиск новых лекарств.^{2,4}

Важным преимуществом полиенов перед другими типами противогрибковых препаратов является сравнительно низкая частота развития устойчивости к ним. В настоящее время AmB — единственный полиеновый макролид, разрешенный к применению при системных грибковых инфекциях. Однако его использование существенно ограничено вследствие выраженной нефротоксичности, гематотоксичности, очень низкой растворимости в воде и субоптимальной фармакокинетики, когда лечебные дозы препарата близки к максимально переносимым дозам.^{1,2}

Необходимость поиска новых противогрибковых средств среди полиенов связана с потребностью в новых перспективных препаратах, лишенных тяжелых побочных эффектов, для лечения инвазивных микозов. В мировой практике со-

С.Е.Соловьева. Научный сотрудник НИИИНА РАМН.

Телефон: (499)245–1056, e-mail: sv_solov@mail.ru

Е.Н.Олсуфьева. Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник того же института. Телефон: (499)246–0636, e-mail: eolsufeva@list.ru

М.Н.Преображенская. Доктор химических наук, профессор, заместитель директора по научной работе того же института. Телефон: (499)245–3753, e-mail: mpreo@hotmail.com
Область научных интересов авторов: химия антибиотиков, химическое модифицирование гликозидных и пептидных антибиотиков, связь структура–биологическая активность органических соединений.

Дата поступления 19 февраля 2010 г.

здание таких препаратов осуществляется главным образом путем химического модифицирования природных антибиотиков. За последние 15 лет были разработаны и предложены новые реагенты и методы, которые позволили получить серии неизвестных ранее полусинтетических производных на основе природных полиенов. Было изучено влияние отдельных элементов структуры антибиотиков на противогрибковую активность в модельных экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В ряде случаев удалось предложить препараты нового поколения для внедрения в клиническую практику.

Механизм действия полиенов, который мог бы помочь в целенаправленном поиске активных структур, еще недостаточно изучен. В настоящее время проводятся работы как по детальному исследованию механизма, так и по синтезу новых производных. В связи с развитием генной инженерии появилась также возможность создания биосинтетических аналогов полиеновых антибиотиков.⁴ Они могут быть использованы сами по себе или в качестве исходных соединений в синтезе новых противогрибковых препаратов с улучшенными фармакологическими характеристиками.

В последнее десятилетие опубликовано несколько обзоров, посвященных полиеновым антибиотикам. Однако либо они имеют общеознакомительный характер (см., например, работу⁵), либо в них сконцентрировано внимание на полном синтезе соединения **1** (см., например, работу⁶).

Настоящий обзор посвящен достижениям за последние 15 лет в области поиска неизвестных ранее аналогов AmB и других родственных полиенов с помощью современного химического дизайна. Особое внимание уделено новейшей тенденции в создании противогрибковых препаратов нового поколения, основанной на сочетании методов химического синтеза и генной инженерии.

II. Природные и генно-инженерные полиеновые макролидные антибиотики

1. Природные противогрибковые полиены

Помимо амфотерицина В среди полиеновых антибиотиков-макролидов для химического модифицирования наиболее часто используют нистатин A₁ (**2**) и партрицин A (**3**).

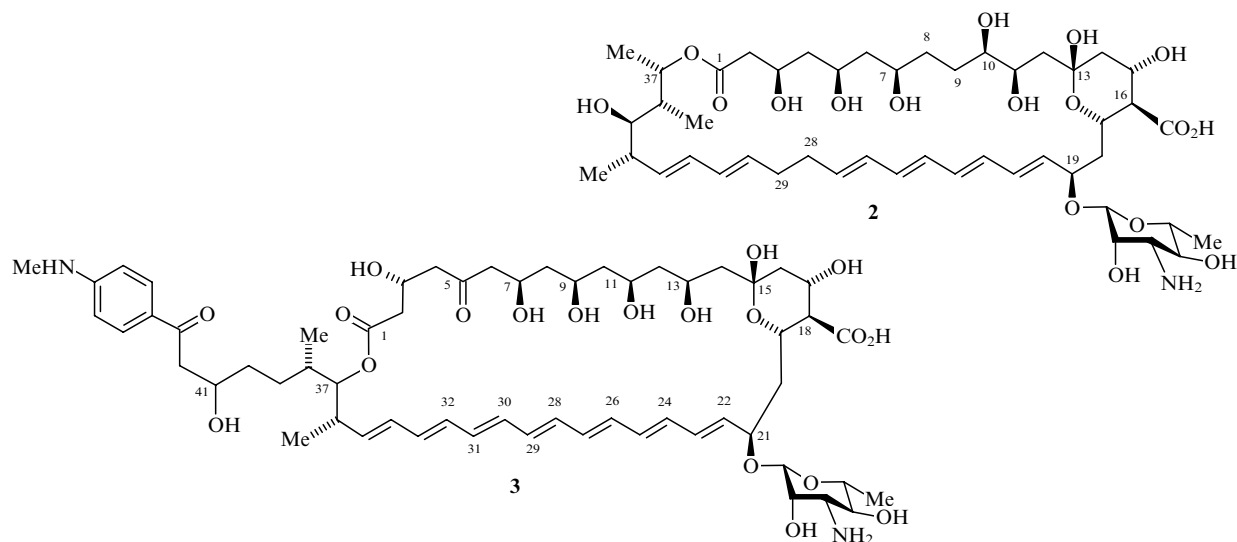
Нистатин A₁ активен преимущественно в отношении грибов рода *Candida*, он применяется местно и внутрь, практически не всасывается из желудочно-кишечного тракта и действует только при местном контакте. Амфотерицин В

обладает более широким спектром противогрибковой активности и используется в основном внутривенно для лечения тяжелых системных микозов. Это соединение применяют в виде комплекса с дезоксихолатом натрия (препарат Fungizone[®] производства компании Bristol Myers Squibb, США) и в липосомальной форме (препарат AmBisome[®], Astellas Pharma, США).

Антибиотики данного класса в качестве основной структурной единицы содержат макроциклический лактон, состоящий из полиольного участка, внутреннего циклического полукетала с карбоксильной группой и полиенового фрагмента, к которому присоединен аминсахар — микозамин (3-амино-3,6-дидезокси-D-манноза). Наличие карбоксильной группы в агликоновом фрагменте и 3'-аминогруппы в углеводном остатке придает молекуле амфотерный характер. Соединения **1** и **2** включают одинаковый по размерам 38-членный лактонный цикл, но гидроксильные группы в нем расположены по-разному. Агликон AmB содержит линейную *транс*-гептаеновую систему, а в структуре нистатина A₁ связь в положении C(28)—C(29) одинарная, поэтому соединение **2** относится к группе тетраеновых полиенов 4 + 2.

Партрицин A идентичен одному из компонентов антибиотика аурефацина — гедамицину A — и относится к группе гептаенов. В ранней работе⁷ в структуре антибиотика фрагмент C(28)—C(31) изображен в *транс*-конфигурации, в то время как в других его производных, описанных в более поздних работах (см. ниже), данный фрагмент имеет *цис*-конфигурацию. Для гептаеновых антибиотиков известно, что в определенных условиях диеновый фрагмент из *транс*-формы может обратимо превращаться в *цис*-форму. Так, для AmB энергия перехода одной диеновой группы из *транс*-конфигурации в *цис*-форму достаточно низка и составляет 16,4 ккал·моль⁻¹ (см.⁸).

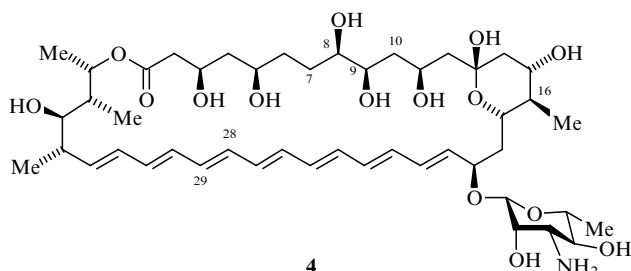
В соединении **3** в 38-членном лактоном цикле при атоме C(37) присутствует дополнительный *n*-метиламинобензоил-алкильный заместитель. Структуры полигидроксированного фрагмента антибиотиков **1** и **3** также различны. В амфотерицине фрагмент C(1)—C(12) содержит 12 атомов углерода и 5 гидроксильных групп, в то время как в партрицине A он длиннее на два атома углерода (C(1)—C(14)) и помимо пяти гидроксильных групп содержит кетогруппу при атоме C(5). Карбонильная группа при атоме C(13 или 15) и гидроксильная группа при атоме C(17 или 19) в антибиотиках **1—3** образуют внутренний циклический полукеталь, имеющий конформацию кресла.



2. Генно-инженерные аналоги полиенов

Создание аналогов полиеновых антибиотиков с помощью генной инженерии стало в последние годы одним из перспективных направлений поиска новых производных макролидов с улучшенными фармакологическими свойствами.^{4, 9–12} Методы генной инженерии базируются на данных, которые получены при полной расшифровке генных кластеров, ответственных за биосинтез антибиотика штаммом-продуцентом.

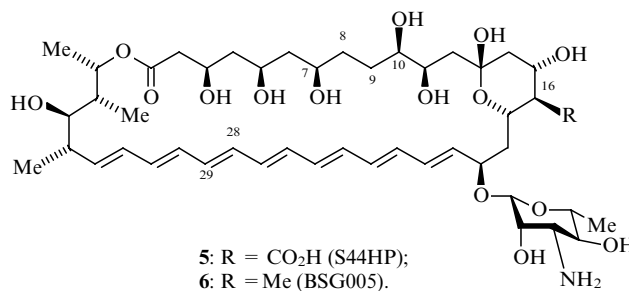
Основные стадии биосинтеза таких полиеновых макролидов, как амфотерицин В и нистатин А₁, включают: образование 38-членного макролактонного кольца, в процесс сборки которого вовлечены шесть поликетидсинтетаз (ПКС); окисление метильной группы в положении 16 под действием метилоксидазы; биосинтез и присоединение микозамина, контролируемое трансферазой; завершающее гидроксилирование гидроксилазой положения C(8) или C(10). Для изменения пути биосинтеза антибиотика может быть использован генетический материал исходных штаммов, клонированный в специально сконструированный вектор, который позволяет производить замену фрагментов генов, кодирующих ферменты биосинтеза. В результате такой замены получают мутантные штаммы с измененным путем биосинтеза, производящие искомые производные антибиотика. Например, генное конструирование мутантного штамма бактерии *Streptomyces nodosus*, у которого «выключена» стадия окисления C(16)-метильной группы до карбоксильной под действием соответствующей оксидазы, позволило получить 16-декарбокси-16-метиламфотерицин В (4).¹² Соединение 4 было также получено многостадийным химическим синтезом (см. ниже).¹³



Благодаря клонированию и анализу генных кластеров был установлен путь биосинтеза нистатина А₁. На основе генных манипуляций с продуцентом соединения 2 — бактерией *Streptomyces noursei* ATCC 11455 — была получена серия новых генно-инженерных полиеновых макролидов.^{9, 10} Пути биосинтеза нистатина А₁ и АмВ отличаются тем, что в первом случае один из генов ПКС, помимо домена с кеторедуктазной активностью, дополнительно содержит еноилредуктазу. Работа данного фермента приводит к образованию одинарной связи C(28)–C(29), в то время как при биосинтезе АмВ двойная связь в этом положении не восстанавливается.

Методом генной инженерии авторам работы¹⁰ удалось создать рекомбинантный штамм *S. noursei* с генетически измененной ПКС NysC, который продуцировал гептаеновый аналог нистатина А₁ — 28,29-дидегидронистатин А₁ (S44HP, 5).

Соединение 5 превосходит исходный препарат 2 по противогрибковой активности в 2–10 раз в большинстве тестов *in vitro* и имеет более широкий интервал между максимальной переносимой дозой (МПД) и средней летальной дозой (LD₅₀) в экспериментах на животных по сравнению с антибиотиком 1.¹⁴



Появление дополнительной двойной связи C(28)–C(29) в полиеновой части молекулы нистатина А₁ увеличивает его противогрибковую активность в отношении большинства изученных штаммов, что может быть объяснено повышением эффективности взаимодействия антибиотика с мишенью микроорганизмов (см. ниже раздел II.3).

Важность конфигурации линейного гептаенового гидрофобного фрагмента антибиотика для взаимодействия с мишенью была продемонстрирована на примере новых генно-инженерных аналогов нистатина А₁, содержащих дополнительную гидроксильную группу в полиеновой части молекулы, — 31-гидроксинистатина и 33-гидроксинистатина. Эти производные в 2000 раз лучше растворяются в воде, чем соединение 2, однако полностью лишены противогрибковой активности.⁹ Следовательно, введение гидроксильной группы в полиеновую часть молекулы приводит к изменению конфигурации линейного гидрофобного фрагмента антибиотика (см. ниже механизм действия).

Структура полиольного участка молекулы антибиотика также влияет на его активность. Были получены производные полиенов 5¹⁴ и 1,^{11, 12} отличающиеся количеством и расположением гидроксильных групп в агликоновой части (C(5)–C(10)) молекулы, а также соединения, в которых гидроксильные группы при атомах C(5) и C(7) были заменены на карбонильные. Показано, что при введении кетогруппы вместо гидроксильной, как правило, снижаются активность и токсичность антибиотика (см. раздел II.3).

Инактивация гена, который ответственен за работу оксидазы, превращающей C(16)-метильную группу в C(16)-карбоксильную, в рекомбинантном штамме-продуценте соединения 5 (*S. noursei*), привела к образованию высокоактивного 16-декарбокси-16-метил-28,29-дидегидронистатина А₁ (BSG005, 6). При сохранении высокой противогрибковой активности (на уровне активности S44HP) соединение 6 обладало существенно меньшей токсичностью по сравнению с соединениями 1 и 5.¹⁵

Генно-инженерные методы были применены в основном для модифицирования полиеновой и гидроксильрованной частей макролидного кольца, а также для специфического модифицирования карбоксильной группы. Для превращения функциональных групп (карбоксильной группы и/или аминогруппы в положении 3' микозамина) использовали преимущественно химические методы.

Генно-инженерные антибиотики S44HP и BSG005 являются наиболее перспективными соединениями для дальнейшего изучения с целью продвижения их в медицинскую практику. Кроме того, они могут быть использованы в качестве исходных соединений для получения новых производных.

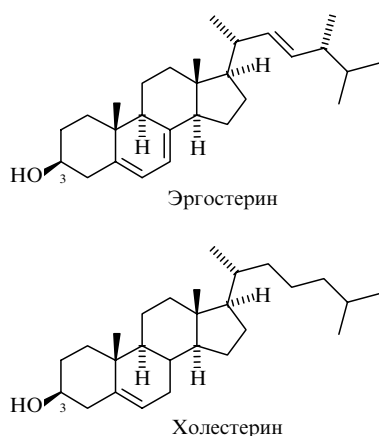
3. Механизм действия полиеновых макролидов

Механизм действия полиеновых макролидов обусловлен их способностью взаимодействовать с цитоплазматическими

стеринсодержащими мембранами и образовывать в них поры (каналы), по которым происходит выброс ионов из клетки, приводящий ее к гибели.^{4, 16–18}

Экспериментально было показано, что полиеновые макролиды связываются с липосомами различных типов клеток как грибов, так и млекопитающих, а присутствие стерина усиливает это взаимодействие. Однако оставался невыясненным вопрос: образует ли антибиотик комплекс со стеринами или только опосредованно влияет на процесс формирования каналов? Теоретически антибиотик может взаимодействовать с двухслойной липидной мембраной и изменять ее структуру так, что образование каналов в этой мембране облегчается и в присутствии стерина, и в его отсутствие.

Неоднократно отмечалось, что микроорганизмы, содержащие в липидной оболочке стерина, более чувствительны к действию полиеновых антибиотиков, чем микроорганизмы, у которых стерина отсутствуют.¹⁷ Изучение динамики связывания антибиотика с мембраной в присутствии стерина также подтверждает возможность прямого взаимодействия антибиотика со стеринами,¹⁷ что недавно было показано с помощью спектроскопии ЯМР ^2H на примере взаимодействия AmB с эргостерином в липидной двухслойной мембране.¹⁶



Избирательность действия полиенов в отношении грибковых патогенов определяется их более прочным связыванием с эргостерином, входящим в состав грибковой мембраны, чем с холестерином, присутствующим в мембране клеток человека и животных. Молекула эргостерина содержит на две двойные связи больше, чем молекула холестерина, что делает ее структуру более плоской и более жесткой по сравнению с холестерином.

В модельных экспериментах показано, что в AmB увеличивает прохождение ионов K^+ по каналу через эргостеринсодержащую липосому в 4 раза по сравнению с холестеринсодержащей липосомой, а через липосому без стерина — примерно в 4.5 раза.¹⁷

Таким образом, нежелательные побочные токсические явления при лечении грибковых инфекций полиеновыми макролидами обусловлены сравнительно низкой избирательностью действия полиенов на эргостеринсодержащие патогенные грибы по сравнению с их действием на холестеринсодержащие клетки млекопитающих. Устойчивость микроорганизмов к полиенам развивается очень медленно.¹ Снижение чувствительности грибов к полиеновым антибиотикам связана, прежде всего, со снижением содержания эргостерина в цитоплазматической мембране.^{4, 17}

Большинство исследователей придерживается молекулярной модели ионного канала «barrel stave» («бочарная клепка»), которая была предложена в 1974 г. независимо японскими¹⁸ и американским¹⁹ исследователями. Восемь молекул AmB и восемь молекул стерина образуют пору с внутренним диаметром $\sim 8 \text{ \AA}$ (рис. 1).

Молекула полиенового антибиотика амфифильна, т.е. обладает сродством к двум фазам — водной и органической, — и может быть условно разделена на гидрофобную и гидрофильную части. Линейный полиеновый участок AmB, связываясь за счет гидрофобных взаимодействий с ацильными цепями фосфолипида, образует прочный комплекс антибиотика с клеточной мембраной, а полиольная часть — гидрофильную пору внутри мембраны. Плоская молекула стерина, которая соответствует по размеру гидрофобной части полиена, встраивается в этот комплекс, увеличивая

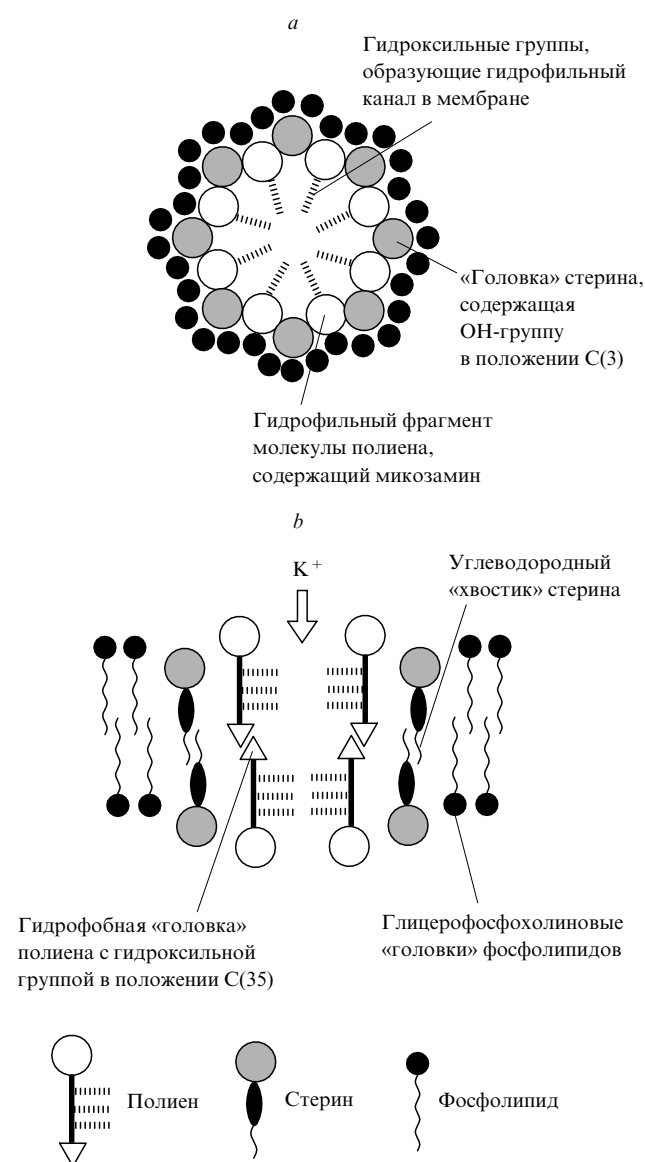


Рис. 1. Модель «barrel stave» образования ионного канала полиеновым макролидом в фосфолипидной мембране в присутствии стерина.

a — вид сверху, b — вид сбоку.

прочность стенки ионной поры. Показано, что для взаимодействия с антибиотиком в молекуле стерина необходима абсолютная *S*-конфигурация атома C(3), связанного с гидроксильной группой. Для формирования сквозного ионного канала в мембране должно образоваться две такие поры с противоположных сторон мембраны. Стенка канала состоит из димеров AmB. Две молекулы **1** вытянуты вдоль канала таким образом, что между гидроксильными группами при атомах C(35), расположенными в «головке» каждой молекулы AmB, образуется водородная связь. Димерный комплекс антибиотик–стерин погружен в гидрофобную часть липидного бислоя, в то время как аминокислотный фрагмент обращен наружу в водную среду, окружающую мембрану (см. рис. 1).^{17–20}

Способная к протонированию аминогруппа микозамина очень важна для образования комплекса AmB с мишенью.²⁰ Наличие же карбоксильной группы при атоме C(16), способной нести отрицательный заряд, необязательно.^{12, 15} Установлено, что введение в положение 16 нейтральных групп или заместителей, содержащих аминогруппу, не только не приводит к потере активности, но и придает молекуле антибиотика ряд преимуществ перед природными полиенами.

К действию полиенов особенно уязвимы мембраны клеток с высоким содержанием холестерина (эритроциты, клетки печени, надпочечников, нервной системы и др.). Отрицательным фактором является также низкая растворимость антибиотика в воде и связанное с этим затрудненное выведение препарата из организма. По-видимому, данную проблему можно решить путем введения в молекулу дополнительных гидрофильных групп.¹⁷

При создании новых препаратов особенно важно найти оптимальное сочетание высокой противогрибковой активности и низкого побочного токсического действия. Основным инструментом отбора перспективных соединений по-прежнему остается тестирование их действия *in vitro* на панели тест-культур грибов с последующим изучением наиболее активных производных в экспериментах на животных.

III. Полусинтетические производные полиеновых макролидных антибиотиков: получение и свойства

Химическое модифицирование полиеновых макролидов сильно осложняется их лабильностью в кислых и щелочных средах, агрегацией (димеризацией), легкостью окисления кислородом воздуха, а также склонностью к изомеризации *транс*-диеновых фрагментов в *цис*-форму под действием света. Основные направления функционализации природных полиенов — AmB (**1**) и нистатина A₁ (**2**) — были разработаны в 80–90-х гг. прошлого века и описаны в обзорах Шенина и соавт.^{21, 22} Первые полусинтетические производные партрицина (**3**) описаны в работе⁷ (см. ниже). Однако за последние 15 лет появились публикации, посвященные синтезу и химическому модифицированию новых полиеновых структур, а также изучению механизма их действия. Кроме того, поскольку в указанных обзорах некоторые важные аспекты освещены недостаточно, мы считаем целесообразным рассмотреть и более ранние работы. В ряде случаев описанные ранее полусинтетические полиены позднее использовались для повторной функционализации с целью изучения механизмов действия или для более тщательного изучения биологических свойств.

1. Функционализация амфотерицина В по внутреннему полукетальному кольцу

В работе²³ представлен синтез ряда 16-декарбокسي-16-ацильных аналогов AmB (схема 1).

На первом этапе для защиты 3'-аминогруппы соединения **1** обрабатывали этиловым эфиром трифторуксусной кислоты, а полуацетальную гидроксильную группу в положении 13 превращали в метоксигруппу действием метанола и пиридиниевой соли *n*-толуолсульфокислоты (PPTS). В результате образовывался соответствующий интермедиат **7**. Дальнейшее исчерпывающее силилирование вторичных гидроксильных групп с использованием триэтилсилилтрифторметансульфоната (TESOTf) приводило к продукту элиминирования метанола **8** и 13-О-метилпроизводному **9**, пригодным для дальнейшего модифицирования. Соотношение продуктов зависело от применяемого растворителя: при использовании дихлорметана образовывалась смесь соединений **8** и **9** с выходами 21 и 38% соответственно; при замене растворителя на тетрагидрофуран преимущественно получалось соединение **9** (выход 61%). Дальнейшая активация карбоксильной группы при атоме C(16) 2-пиридилтиохлорформиадом приводила к соответствующим 2-пиридилтиоаналогам **10** и **11**, которые при взаимодействии с реактивами Гриньяра давали соответствующие защищенные кетопроизводные **12a–c** и **13**. После удаления защитных групп был получен ряд кетопроизводных AmB — соединения **14a–d** (см. схему 1).

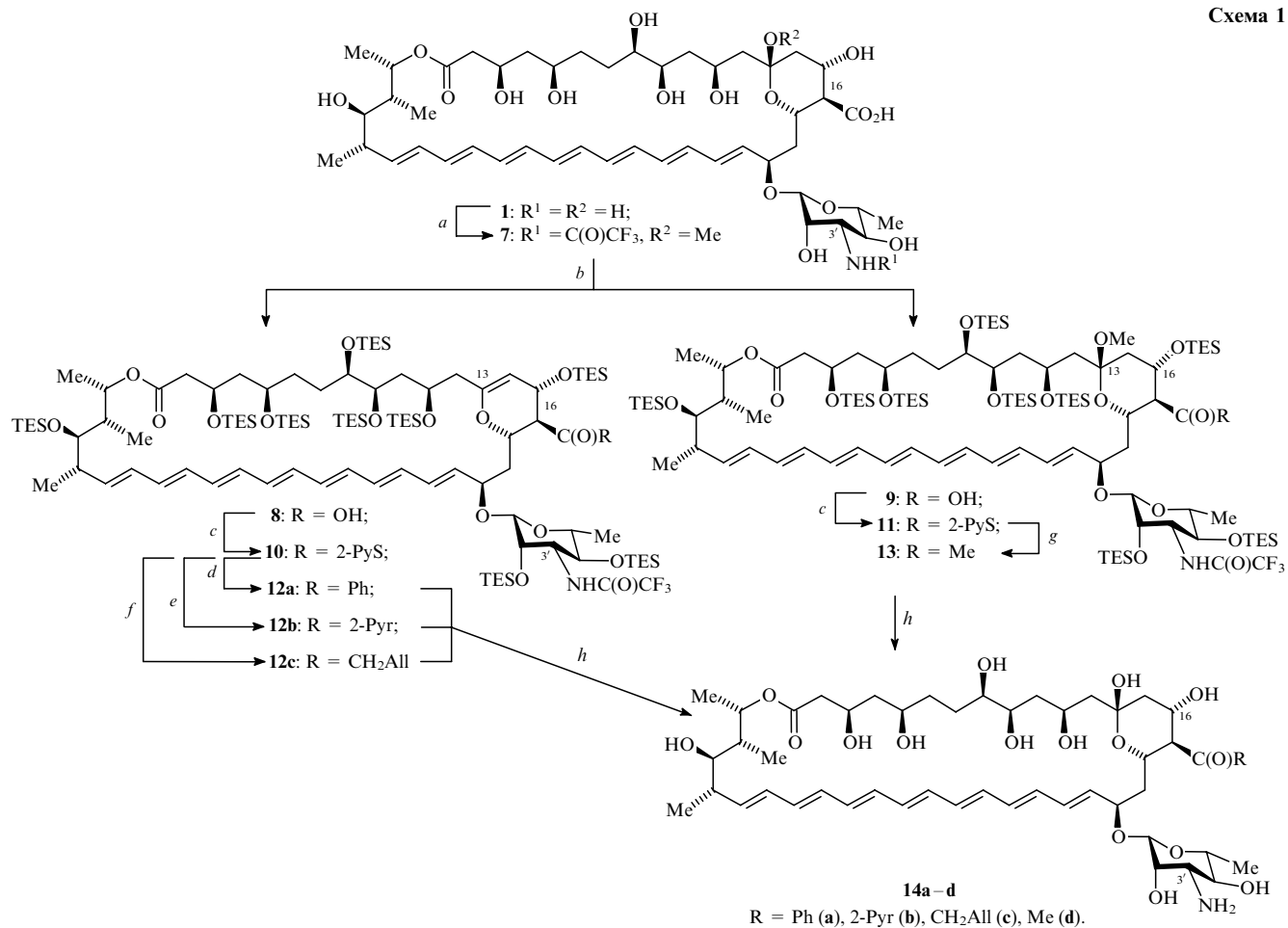
Кетоаналоги **14a–d** проявляли достаточно высокую противогрибковую активность и относительно низкую нефротоксичность.

Была синтезирована серия производных AmB, не содержащих ацильной группы при атоме C(16). На схеме 2 приведен путь синтеза 16-декарбокسي-16-метиламфотерицина В (**4**), полученного ранее методом генной инженерии,¹² исходя из защищенного AmB — соединения **15**.¹³ Последний сначала превращали в промежуточный тиоэфир **16**, а затем восстанавливали действием LiBH₄ в 16-декарбокسي-16-гидроксиметильное производное **17**. При замещении гидроксильной группы на атом иода в соединении **17** обработкой смесью I₂–PPh₃ образовалось иодметильное производное, которое десилилировали. Последующее восстановление иодметильной группы в соединении **18** до метильной действием NaBH₄ привело к защищенному 16-декарбокسي-16-метилпроизводному **19**. Последовательное отщепление защитных групп в соединении **19** дало целевой продукт **4**.

Аналогичная схема получения 16-декарбокسي-16-гидроксиметиламфотерицина В (**20**), но без использования триэтилсилильных защитных групп, описана в работе²⁴ (схема 3). Вначале соединение **1** превращали в N-Fmoc-производное **21**, затем карбоксильную группу в положении 16 этерифицировали диазометаном или метилиодидом с образованием дважды замещенного аналога **22**. Превращение гидроксильной группы при атоме C(13) в метоксигруппу проводили действием MeOH в присутствии PPTS. Ключевое 13-О-метилпроизводное **23** восстанавливали избытком NaBH₄ в метаноле в 16-гидроксиметильное производное **24**. Гидролиз ацетата **24** через образование промежуточного N-Fmoc-полукетала **25** привел к целевому 16-декарбокسي-16-гидроксиметиламфотерицину (**20**).

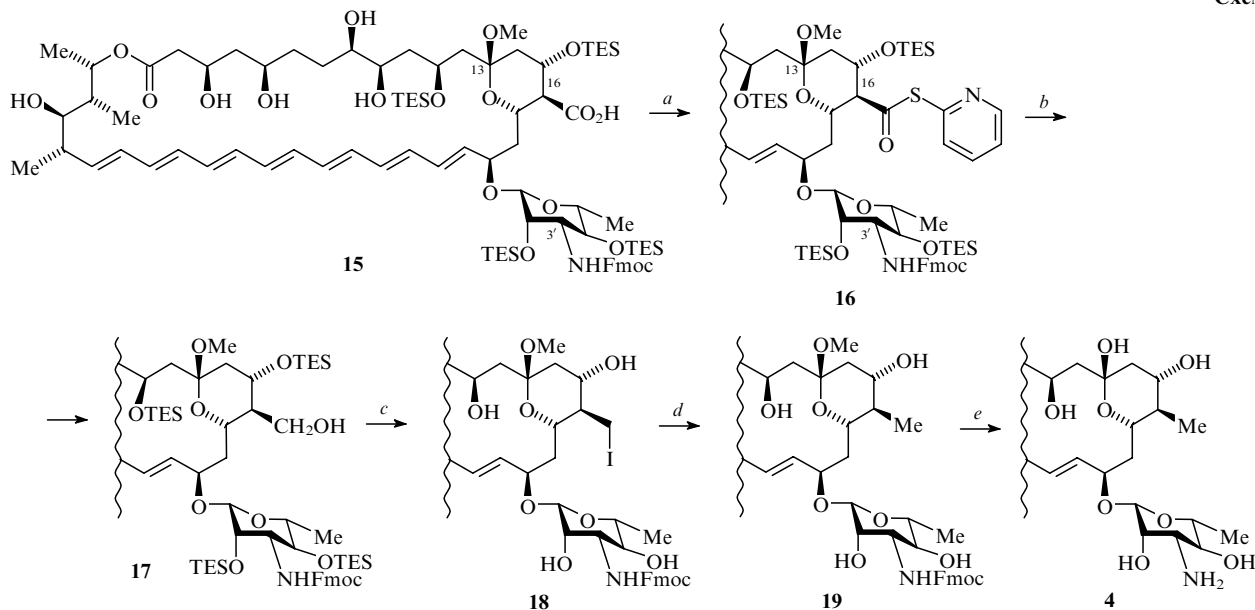
Соединение **20** проявляет незначительную нефротоксичность, в то время как его противогрибковая активность сохраняется на уровне активности исходного антибиотика.

Схема 1



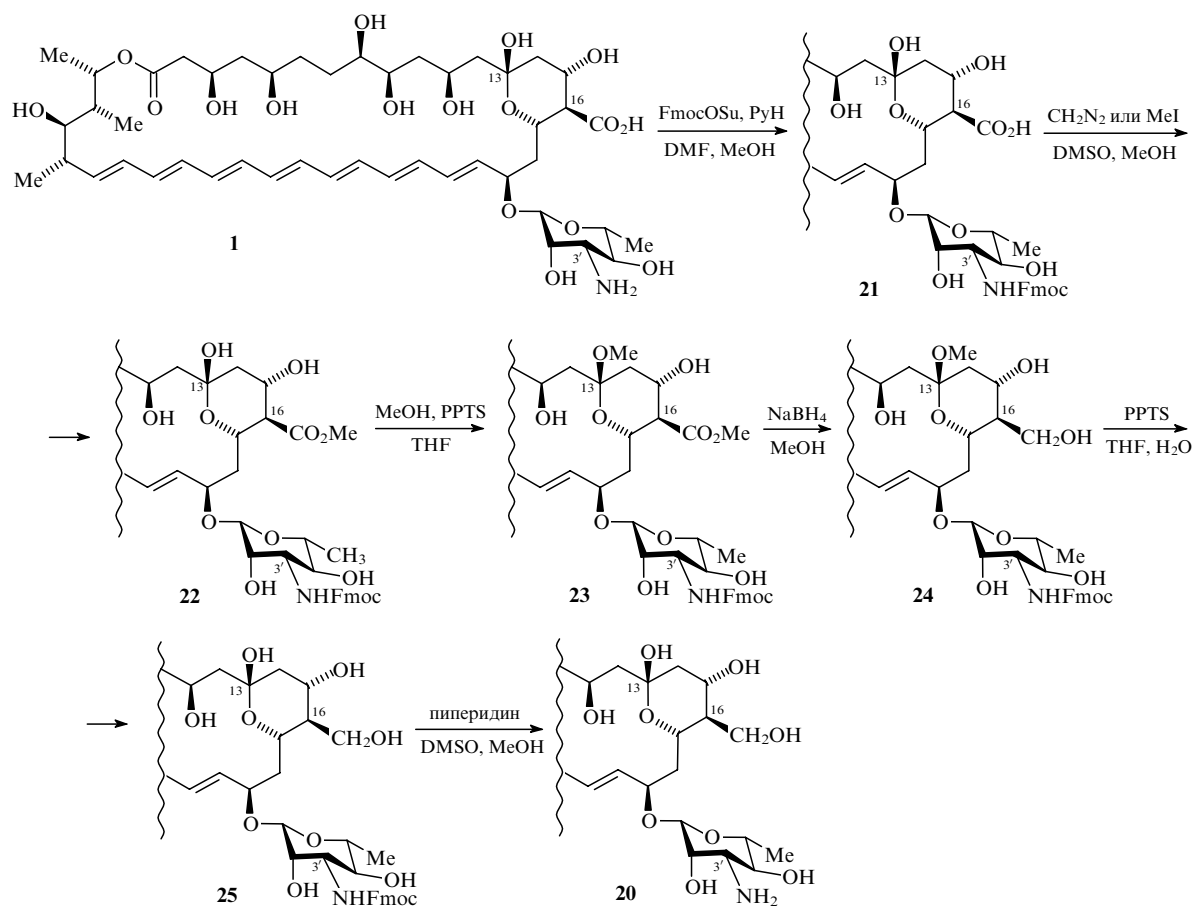
a — 1) CF_3CO_2Et , Pr^iNEt_2 , DMF; 2) MeOH, PPTS, THF; b — TESOTf, 2,6-лутидин, CH_2Cl_2 или THF; c — 2-PySC(O)Cl, Et_3N , Et_2O ; d — 1) $PhMgBr$, THF; 2) $(CF_3CO)_2O$, Et_3N , CH_2Cl_2 ; e — 2-PyrMgBr, THF; f — 1) $AllCH_2MgBr$, THF; 2) $(CF_3CO)_2O$, Et_3N , CH_2Cl_2 ; g — $MeMgBr$, THF; h — 1) HF–PyH, THF, MeOH; 2) PPTS, THF, H_2O ; 3) NH_3 , THF, MeOH; Py — пиридил, Pyr — пирролил.

Схема 2



a — 2-PySC(O)Cl, Et_3N , Et_2O , 0°C, 30 мин; b — $LiBH_4$, Et_2O , 23°C, 2 ч; c — 1) I_2 , PPh_3 , имидазол, THF, 0°C, 6 ч; 2) HF–PyH, THF–PyH (5:3), 0→23°C, 6,5 ч; d — $NaBH_4$, DMSO, 23°C, 8 ч; e — 1) CSA, THF– H_2O (2:1), 23°C, 30 мин; 2) пиперидин, DMSO–MeOH (4:1), 23°C, 3 ч; 3) ВЭЖХ; Fmoc — 9-флуоренилметоксикарбонил, CSA — камфорсульфоукислота.

Схема 3

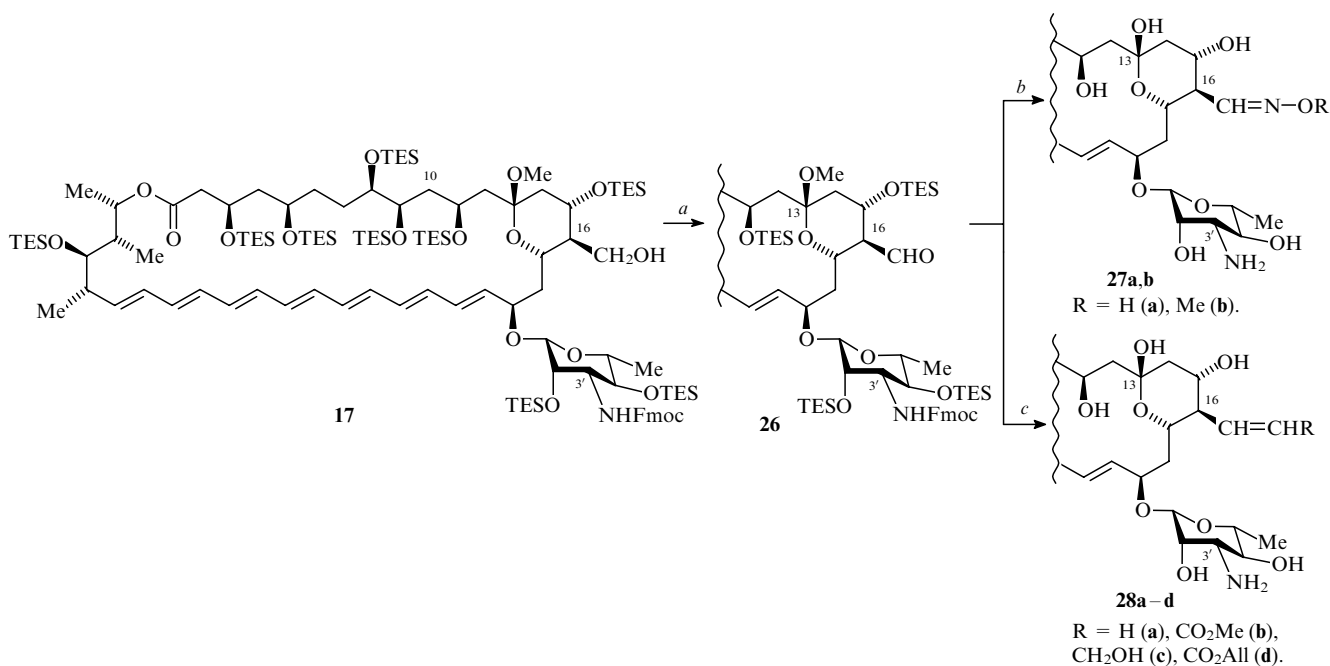


FmocOSu — *N*-(9-флуоренилметоксикарбонил)оксисукцинимид.

Пер-*O*-триэтилсилил-*N*-Фмос-16-декарбокси-16-гидро-ксиметиламфотерицин В (17) явился удобным исходным соединением в синтезе C(16)-карбальдегида 26, и из него —

C(16)-карбальдоксимов 27a,b и C(16)-винильных аналогов АмВ 28a–d (схема 4).²⁵

Схема 4



a — окисление по Сверну, *b* — 1) $NH_2OR \cdot HCl$ ($R = H, Me$); 2) снятие защитных групп; *c* — 1) реакция Виттига; 2) снятие защитных групп.

Гидроксиметильная группа в положении 16 соединения **17** была окислена по методу Сверна до альдегидной с образованием полностью защищенного C(16)-формильного аналога **26**. Реакция соединения **26** с гидросиламином или с метоксиамином с последующим удалением всех защитных групп привела к образованию соответствующих C(16)-карбальдоксимов **27a,b**. C(16)-Винильные аналоги **28a–d** были получены из соединения **26** под действием соответствующих реагентов Виттига (фосфоранов).

Биологические испытания оксимов **27a,b** и винильных аналогов **28a–d** *in vitro* показали, что эти соединения обладают противогрибковым действием на уровне активности AmB, однако они проявляют выраженную гемолитическую активность.

C(13)-Алкоксипроизводные **29** были получены взаимодействием аллилового эфира N-защищенного AmB **30** с

соответствующим спиртом в кислой среде и последующим отщеплением защитных групп (схема 5).²⁶

Соединения **29** оказались значительно менее токсичными по сравнению с исходным антибиотиком **1** и хорошо растворялись в воде (≥ 30 мг·мл⁻¹ для R = OMe). Однако их противогрибковая активность была приблизительно в 2 раза ниже, чем активность AmB.

Чтобы исключить возможность гидролиза C(13)-алкоксигруппы до гидроксильной в условиях *in vivo* под действием гидролитических ферментов, был получен более устойчивый полутиоацеталь **31** (см. схему 5). С этой целью в промежуточном соединении **30** все гидроксильные группы подвергали силилированию действием TESOTf, а замещение полукетальной гидроксильной группы на этилтиоацетальную проводили обработкой избытком этантиола в присутствии твердого MgBr₂. Последующее снятие защитных групп в полученном полностью защищенном C(13)-этилтиопро-

Схема 5

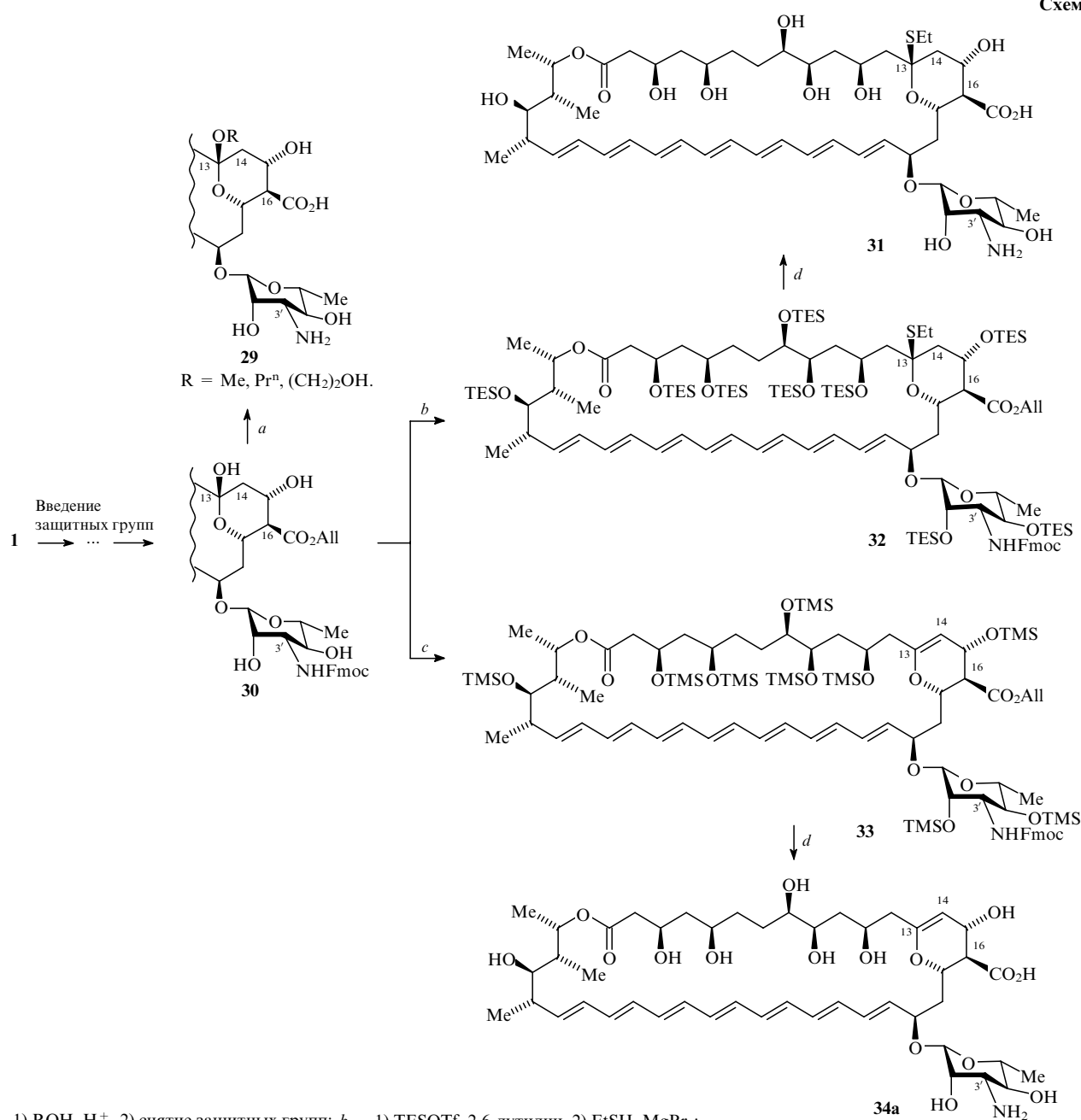
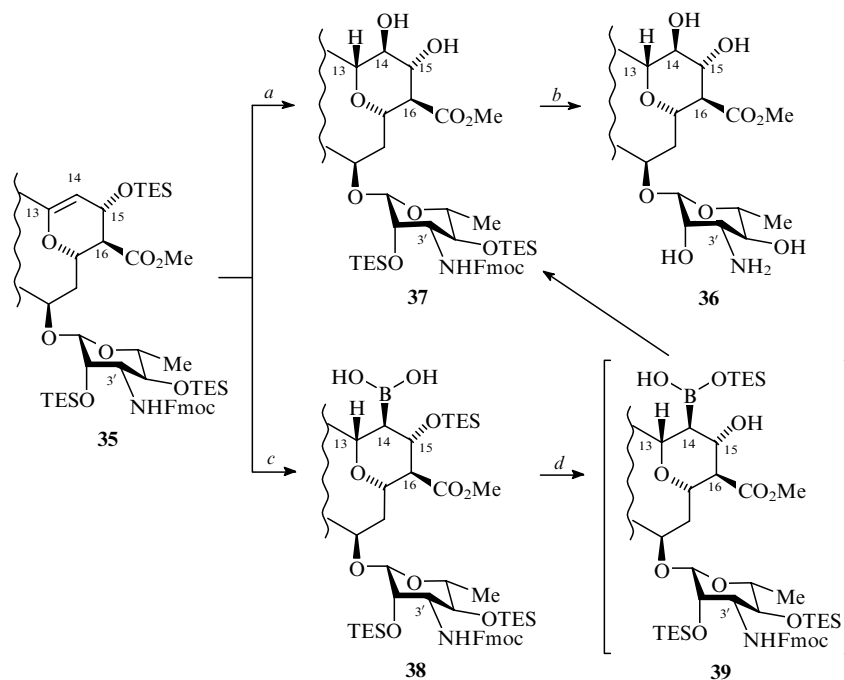


Схема 6



a — 1) BH_3 , THF; 2) $\text{NaBO}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, KOH, THF, H_2O ; *b* — снятие защитных групп;

c — 1) BH_3 , THF; 2) H_2O ; *d* — $\text{NaBO}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, KOH, THF, H_2O .

изводном **32** привело к целевому соединению **31** с выходом 74%. Однако, вопреки ожиданиям, замена C(13)-алкокси-группы на тиоэтильную сопровождалась значительным снижением активности.²⁷

При использовании триметилсилильной защиты гидроксильных групп (применение триметилсилитрифторметансульфоната (TMSOTf) вместо триэтилсилильного производного) преимущественно протекала реакция дегидратации по положениям 13 и 14. Удаление защитных групп в продукте дегидратации **33** привело к 13-дезоксидегидроамфотерицину В (**34a**) (см. схему 5) — малотоксичному соединению с низкой противогрибковой активностью.²⁶

Исходя из полностью защищенного метилового эфира — пер-*O*-триэтилсилил-*N*-Fmoc-13-дезоксидегидроамфотерицина В (**35**), — был получен метиловый эфир 13-дезоксидегидро-14(*S*)-гидроксиамфотерицина В (**36**) (схема 6).²⁸ Превращение включало стереоспецифическое гидроборирование соединения **35**, окисление пероксидом натрия в щелочной среде и отщепление защитных групп. Однако суммарный выход промежуточного защищенного соединения **37** составил всего ~20%, хотя все последующие реакции деблокирования протекали с количественным выходом.

Чтобы изучить, какая стадия — гидроборирование или окисление — является лимитирующей, продукт реакции гидроборирования подвергли гидролизу. В результате было выделено соответствующее производное бороновой кислоты **38** (выход 17%). Несмотря на варьирование условий проведения реакций, авторам удавалось выделить только соединения **37** и **38**. Низкий выход продукта гидроборирования был объяснен протеканием конкурирующей реакции образующегося *in situ* промежуточного борана **39** (или алкилборанов) с полиеновым фрагментом молекулы антибиотика. Стадия окисления соединения **38** пероксидом натрия в щелочной среде приводила к продукту с выходом 80% и сопровождалась миграцией триэтилсилильной защитной группы из

положения 15 на остаток бороновой кислоты при атоме C(14).

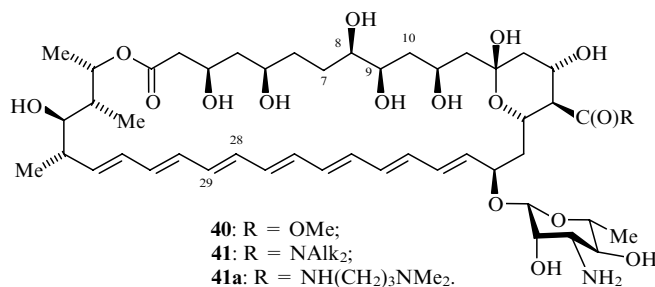
Противогрибковая активность соединения **36** оказалась ниже, чем у AmB, но гемолитические свойства при модифицировании были улучшены.

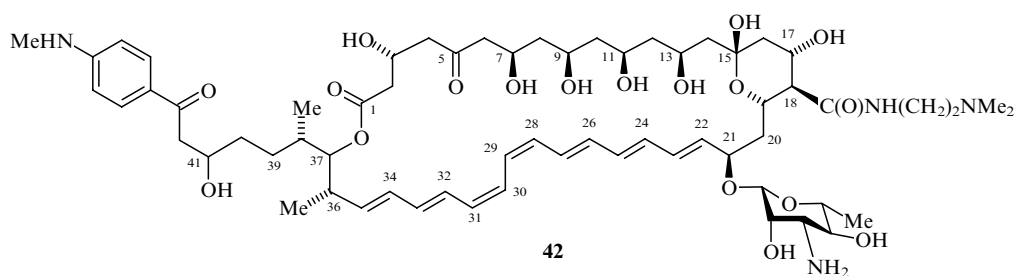
Таким образом, ни одна из функционализаций положений C(13) и C(14) не привела к существенному улучшению противогрибковых свойств антибиотика, хотя в некоторых случаях удалось получить производные, обладающие активностью, сопоставимой с активностью AmB (**1**), и более низкой токсичностью.

Важно также учитывать тот факт, что создание нового препарата путем многоступенчатого синтеза с экономической точки зрения часто оказывается нерентабельным. В связи с этим наибольший интерес для получения новых производных полиеновых антибиотиков представляет модифицирование карбоксильной группы и аминогруппы, которое осуществляется, как правило, в 1–3 стадии.

2. Функционализация полиенов по карбоксильной группе

При этерификации карбоксильной группы соединения **1** ди-азоалканами с количественным выходом образуются сложные эфиры, сохраняющие противогрибковую активность.²⁹ Среди таких производных необходимо отметить метиловый эфир AmB (**40**).





Гидрохлорид метилового эфира AmB хорошо растворим в воде, менее токсичен в опытах на животных как при внутривенном, так и при внутривнутреннем введении по сравнению с исходным антибиотиком. Однако при клиническом исследовании обнаружилось его нейротоксическое действие.²¹ Соединение **40** неоднократно использовали для последующих превращений.

Была получена серия алифатических амидов AmB (**41**). Амиды содержали как прямую, так и с разветвленную алкильную цепь с числом атомов углерода до от 1 до 18, а также функциональные заместители на конце алкильного радикала. В ранних работах амиды **41** синтезировали азидным методом с использованием дифенилфосфорилиазида (DPPA) в присутствии триэтиламина.³⁰

Оказалось, что с увеличением длины алкильного заместителя в амидах **41** противогрибковая активность производного уменьшается. Амиды, содержащие небольшие алкильные заместители, в опытах *in vitro* были активнее амфотерицина В и имели ту же токсичность. Кроме того, такие производные были плохо растворимы в воде. Введение дополнительных функций, например amino-, карбокси- и диалкиламиногрупп, приводило к снижению противогрибкового действия. Все синтезированные амиды **41** проявляли более низкую гемолитическую активность по сравнению с исходным AmB. Среди полученных амидов следует отметить 3-(*N,N*-диметиламино)пропиламид (**41a**), который подавляет развитие грибов с множественной лекарственной устойчивостью.³¹

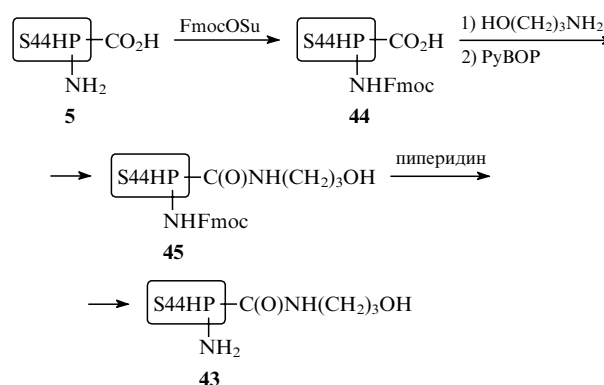
Из антибиотика партрицина А с использованием DPPA были получены соединения, содержащие карбоксамидную группу в положении 18.³² При их исследовании в экспериментах *in vitro* оказалось, что производные с небольшими алкильными заместителями при амидном атоме азота активнее AmB, но обладают близкой токсичностью и плохо растворяются в воде. Аналогичные соединения, содержащие в составе амидного заместителя дополнительную аминогруппу, проявляли высокую активность, к тому же могли образовывать водорастворимые соли, но имели довольно высокую токсичность. Среди амидов партрицина А наибольшей активностью, сопоставимой с активностью амфотерицина В, обладал 2-(*N,N*-диметиламино)этиламид **42**.³³

В настоящее время для амидирования применяют современные реагенты, в частности гексафторофосфат бензотри-

азол-1-илокситрис(пирролидино)фосфония (PyBOP), что позволяет получать амиды с лучшими выходами и более высокой чистотой. В работе³⁴ описан синтез серии амидов генно-инженерного полиенового антибиотика S44HP (**5**). Карбоксамиды содержали различные заместители алкильного типа, с функциональными полярными группами, в том числе с остатками аминокислот.

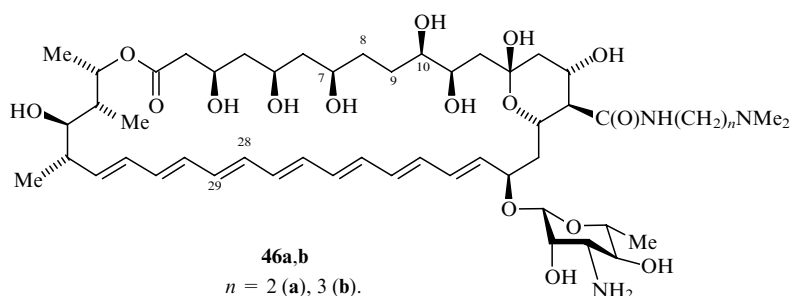
В ряде случаев для получения гидрофильных производных (например, соединения **43**) из-за сложности процесса их очистки был использован другой подход. Первоначально 3'-аминогруппу остатка микоамина S44HP (**5**) блокировали Fmoc-защитой, используя для этой цели FmocOSu. Полученный *N*-Fmoc-S44HP (**44**) подвергали амидированию под действием гидрохлорида амина в присутствии PyBOP. После удаления защитной группы в соединении **45** получали соответствующий амид **43** с высокой степенью чистоты (схема 7).³⁴

Схема 7



(Рамка обозначает макролид, реагирующие группы указаны снаружи.)

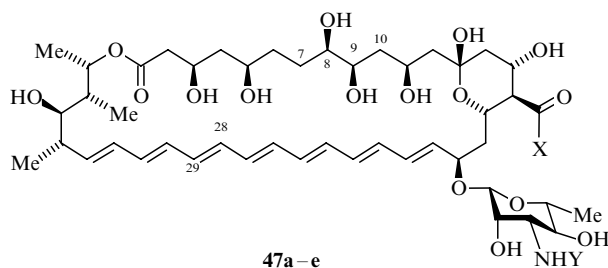
Противогрибковая активность всех полученных из S44HP амидов была изучена в экспериментах *in vitro* в отношении ряда культур дрожжей (*Candida albicans*, *Cryptococcus humicola*) и несовершенных грибов (*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*). Наиболее активными (минимальная подавляющая концентрация (МПК) 1–2 мкг·мл⁻¹) по сравнению с амфотерицином В и исходным соединением **5** (так же, как и в случае амида **41a**) оказались 2-(*N,N*-диметиламино)этиламид **46a** и 3-(*N,N*-диметиламино)пропиламид **46b**.



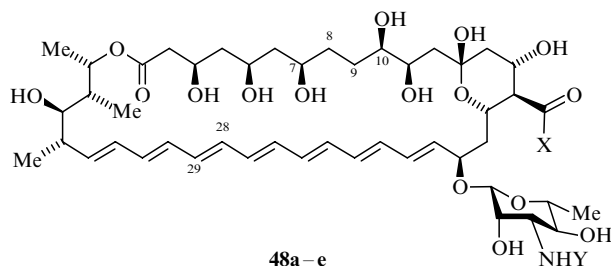
Производное **46b** было значительно менее токсично ($LD_{50} = 16.4 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$) по сравнению с AmB и S44HP (2.8 и $2.2 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ соответственно) и более эффективно при защите животных от гибели на модели экспериментального кандидозного сепсиса мышей.³⁴

Химиотерапевтическая активность соединения **46a** (в виде водорастворимой L-глутаматной соли) в экспериментах на мышах с иммунодефицитом, вызванным предварительным назначением циклофосфида, оказалась существенно выше активности AmB. Высокая эффективность этого препарата на модели кандидозного сепсиса у животных с искусственно ослабленным иммунитетом представляет интерес для лечения больных с иммунодефицитом.³⁵ Соединение **46a** является одним из перспективных аналогов S44HP, рекомендованных для дальнейшего изучения.

Проведение однотипных реакций по функциональным группам (C(16)-карбоксильной группе и 3'-аминогруппе) полиеновых антибиотиков, различающихся расположением гидроксильных групп, позволило выявить роль полиольного фрагмента в проявлении противогрибковой активности. Ниже для примера представлены некоторые производные антибиотиков AmB и S44HP, содержащие одинаковые заместители. Авторы сравнивали четыре пары синтезированных карбоксамидов (**47a–d**, **48a–d**) и одну пару углеводсодержащих N-алкильных производных (**47e**, **48e**).^{34, 36}

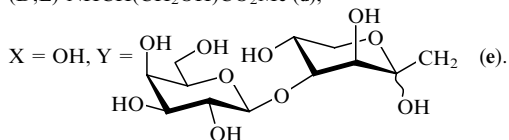


47a–e



48a–e

Y = H; X = NH(CH₂)₂OH (a), NHMe (b), NHCMc(CH₂OH)₂ (c), (D,L)-NHCH(CH₂OH)CO₂Me (d);

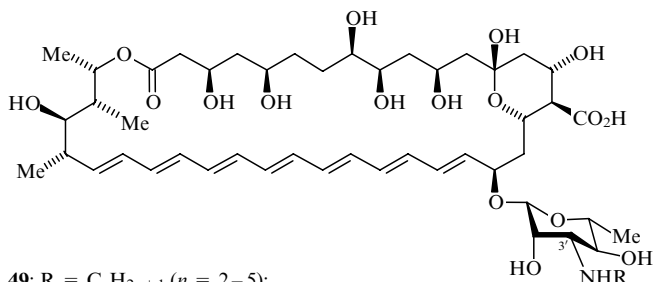


Оказалось, что противогрибковая активность *in vitro* однотипных производных AmB и S44HP очень близка между собой. Так, для штаммов *C. albicans*, *C. humicola* и *A. niger* МПК составляла 2–4 $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$, а для штамма *F. oxysporum* — 4–8 $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$, но при этом немного уступала МПК соответствующих исходных антибиотиков. Следовательно, различия в структуре полиольной части молекул **1** и **5** не влияют на противогрибковую активность соединений в экспериментах *in vitro*. Имеются предварительные данные о том, что аналоги S44HP с иным расположением гидроксильных групп в полиольной части имеют более низкую противогрибковую активность, чем соединение **1** или **5**. Дополни-

тельное модифицирование карбоксильной группы в таких случаях не усиливает противогрибкового действия.³⁷

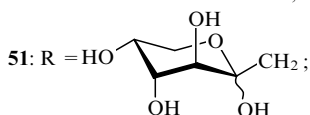
3. Функционализация полиенов по аминогруппе остатка микозамина

Синтез производных по 3'-аминогруппе остатка микозамина является важным направлением химического модифицирования полиенов. Реакцией восстановительного алкилирования были получены N-алкильные производные AmB (**49**), содержащие в качестве заместителя алкильную цепь (от C₂ до C₅). С увеличением длины углеводородной цепи заместителя снижаются активность и токсичность производного.²¹



49: R = C_nH_{2n+1} (n = 2–5);

50: R = H₂C--R' (R' = H, Cl, Br, I, OH, NO₂, OMe, OEt, NMe₂, Me, Et);



52: R = CH(NP(O)OH)C₆H₄R' (R' = H, OH, OMe, NO₂, NMe₂);

53: R = C(O)R' (R' = Me, Et и др.).

Аналогичным методом были синтезированы N-бензильные производные AmB (**50**) и испытаны на противогрибковое действие.³⁸

Для таких соединений определяли острую токсичность и противогрибковую активность по отношению к шести штаммам дрожжеподобных грибов рода *Candida*, а также возбудителям бластомикоза, аспергиллеза, плесневого микоза, трихомикоза и ряду других патогенов. Было установлено, что аналоги **50** в 3 раза менее токсичны, чем исходный антибиотик **1**. Соединения, содержащие в *para*-положении фенильного кольца атомы галогенов (хлора, брома, иода), обладали наибольшей активностью, сравнимой с активностью AmB. Наименьшую активность проявили соединения с алкильным заместителем в *para*-положении или без заместителя в кольце.

При взаимодействии полиенов с различными моно- и дисахаридами в ДМФА при 37°C в результате перегруппировки Амадори с количественным выходом образуются производные 1-дезоксид-1-улоз. Они сохраняют противогрибковую активность по отношению к *Saccharomyces cerevisiae* и проявляют пониженную токсичность у мышей с кандидозом и низкую гемолитическую активность.²⁰ Наибольшей активностью среди таких производных обладал продукт взаимодействия AmB с глюкозой (**51**).

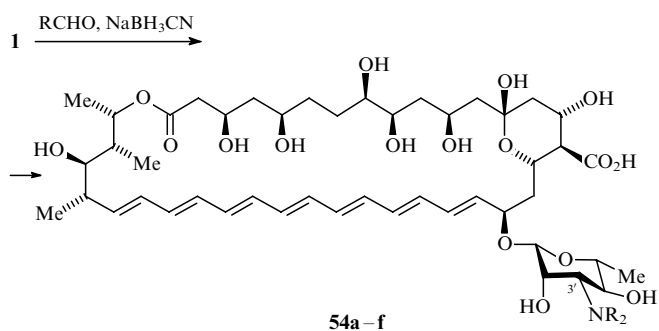
В результате взаимодействия соединения **1** с ароматическими альдегидами и фосфорноватистой кислотой были получены гидрофосфорильные производные **52**. Они оказались малотоксичными соединениями с высокой противогрибковой активностью, сопоставимой с активностью исходного антибиотика. Кроме того, была обнаружена их выраженная противовирусная активность в отношении виру-

сов гриппа А и В, вируса оспы, а также ретровируса саркомы Рауса.³⁹

Ацилирование AmB по положению 3' привело к N-ацильным производным **53**, активность которых была существенно ниже активности исходного соединения **1**. Важность аминофункции остатка микозамина для проявления противогрибкового действия была подтверждена исследованием аминокислотных аналогов AmB по 3'-аминогруппе. В частности, использование аминокислот в реакции аминокислотирования ангидридным методом дало серию N-аминоацильных производных AmB, активность которых была сопоставима с активностью исходного антибиотика.⁴⁰

Одним из новых направлений в области синтеза аналогов AmB является получение N,N-бисалкильных производных, содержащих различные гидрофильные функциональные группы. Восстановительным алкилированием AmB соответствующими альдегидами в присутствии NaBH_3CN была получена серия производных **54a–f** (схема 8).⁴¹ В случае соединений **54a,b,d** для защиты аминогрупп использовалась Fmoc-группа, которую удаляли на последней стадии.

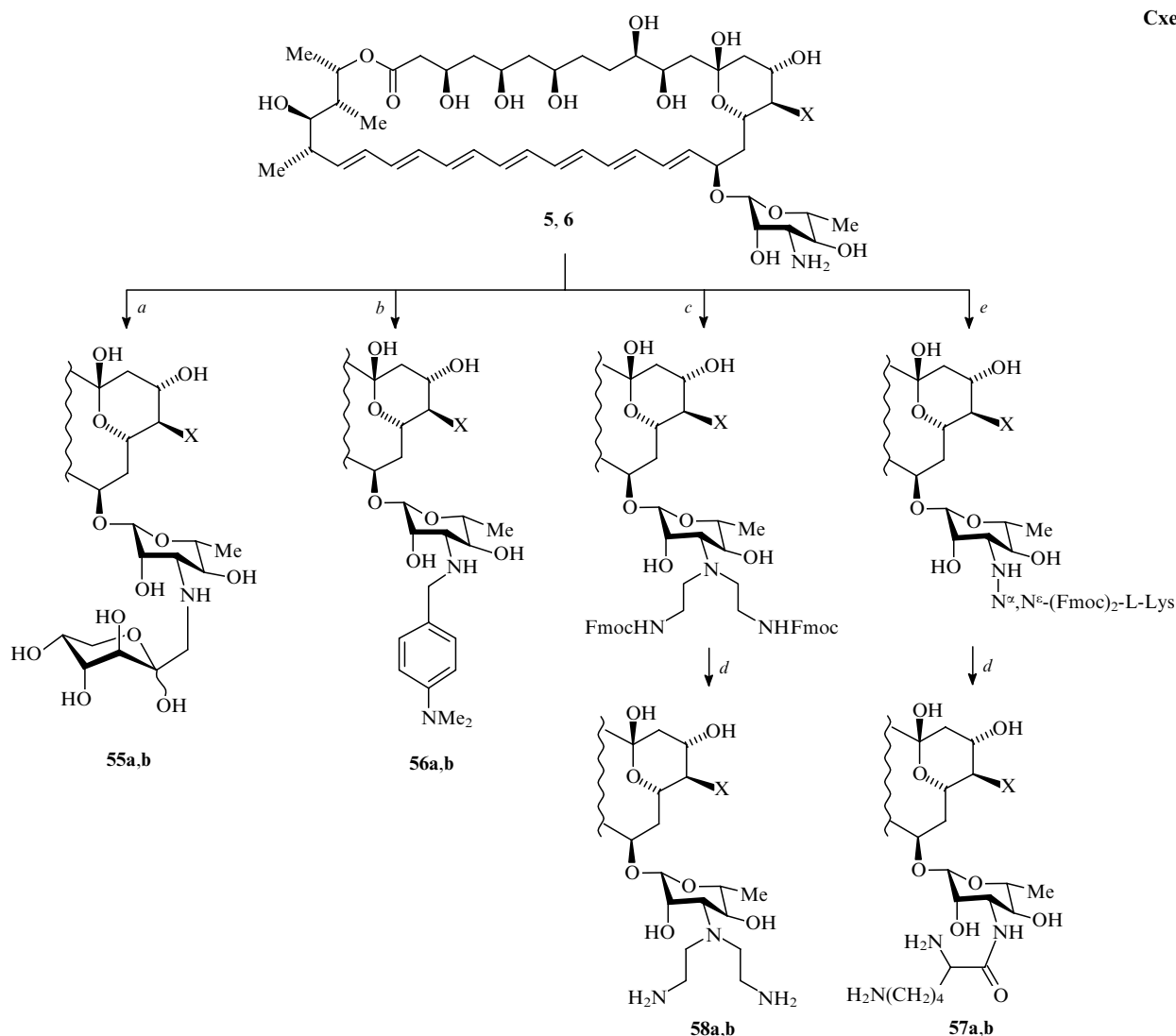
Бис(3-аминопропильное) производное **54b** оказалось наиболее активным: его противогрибковая активность (МПК = 0.020 мкмоль · л⁻¹) превосходила активность AmB



R = (CH₂)₂NH₂ (**a**), (CH₂)₃NH₂ (**b**), (CH₂)₃OH (**c**),
CH₂CH(NH₂)(CH₂)₄NH₂ (**d**), (CH₂)₃CO₂Me (**e**), (CH₂)₃CO₂H (**f**).

(0.3 мкмоль · л⁻¹) в отношении дикого штамма *Saccharomyces cerevisiae*, а также в отношении штамма *Candida albicans*, резистентного к соединению **1**. На основе производного **54b** были синтезированы дизамещенные аналоги (см. раздел III.4).⁴¹

Описан ряд полусинтетических производных по 3'-аминогруппе остатка микозамина генно-инженерных полиенов S44HP (см.^{34,35}) и BSG005 (см.⁴²) (схема 9). Эти антибиотики



X = CO₂H (**a**), Me (**b**); a — D-глюкоза; b — 4-Me₂NC₆H₄CHO, NaBH₃CN; c — FmocNH(CH₂)₂CHO, NaBH₃CN; d — пиперидин, DMSO; e — N^α,N^ε-(Fmoc)₂-L-LysOSu, Et₃N, pH 7, DMSO.

Таблица 1. Активности (МПК, $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$) исходных антибиотиков (**1**, **5**, **6**) и производных S44HP (**55a**–**58a**) и BSG005 (**55b**–**58b**).

Соединение	Штаммы			
	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	<i>Cryptococcus humicolus</i> ATCC 9949	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Fusarium oxysporum</i> VKM F-140
1	1	1	1	4
5	1	1	1	4
6	1	1	2	2
55a	1	1	2	8
55b	2	2	2	8
56a	2	2	4	> 16
56b	16	> 16	> 16	> 16
57a	8	8	16	> 16
57b	1	1	1	2
58a	1	1	1	1
58b	4	8	8	8

отличаются друг от друга только заместителем при атоме C(16). Следовательно, изучение связи структура – активность для производных, имеющих одинаковые заместители при 3'-аминогруппе микозамина, позволяет определить влияние заместителя при атоме C(16). Синтез таких соединений включал перегруппировку Амадори, реакции восстановительного N-алкилирования и N,N-бисалкилирования, а также N-аминоацилирования.

Оказалось, что противогрибковая активность в экспериментах *in vitro* производных S44HP отличается от активности аналогичных производных BSG005, хотя активности исходных антибиотиков **5** и **6** близки (табл. 1).⁴² N-D-Фруктопиранозилпроизводные **55a,b** показали приблизительно одинаковую активность в отношении четырех изученных штаммов. Соединение **56a**, содержащее аминогруппу в ароматическом кольце, оказалось менее активным, чем соединения **55a,b**, а аналогичное производное **56b** было совсем неактивно. Наиболее активным в этой серии оказалось производное N-L-лизина **57b** (МПК = 1–2 $\text{мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$), в то время как аналогичное соединение **57a** показало довольно низкую активность (МПК = 8–16 $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$). В случае же N-алкильных производных наблюдалась обратная ситуация: N,N-бисалкильное производное BSG005 (**58b**) было значительно менее активно (МПК = 4–8 $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$), чем аналог S44HP (**58a**) (МПК = 1–2 $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что активность антибиотика зависит не только от структуры заместителей при аминогруппе, но и от природы заместителя при атоме C(16). Таким образом, однотипные превращения антибиотиков с близкими значениями противогрибковой активности могут приводить к разным результатам.

4. Двойная функционализация полиенов

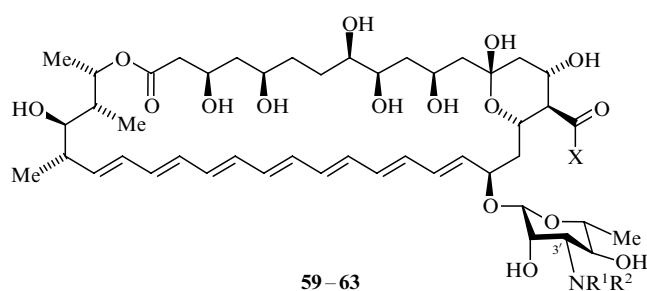
Модифицирование полиеновых антибиотиков по двум положениям в ряде случаев способствует улучшению биологических свойств. Чаще всего при функционализации карбоксильной группы в положении 16 получают метиловый эфир, поскольку такое превращение приводит к уменьшению гемолитической активности.⁴³ Более того, дополнительная этерификация C(16)-карбоксильной группы N-ацильных производных не изменяет их активности. Например, метиловый эфир N-(3-пиперидинопропионил)амфотерицина В (**59**) обладает высокой противогрибковой активностью и низкой токсичностью.⁴⁴

Было проведено вторичное модифицирование C(16)-карбоксильной группы в соединении **54b**. Полученные метиловый эфир **60** и аминоксиды **61** обладали достаточно высокой противогрибковой активностью по сравнению с соединением **1**. Однако такое превращение не привело к улучшению активности исходного моновалентного антибиотика **54b**. Ниже приведены МПК (в $\text{мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$) для этих соединений в отношении двух штаммов:

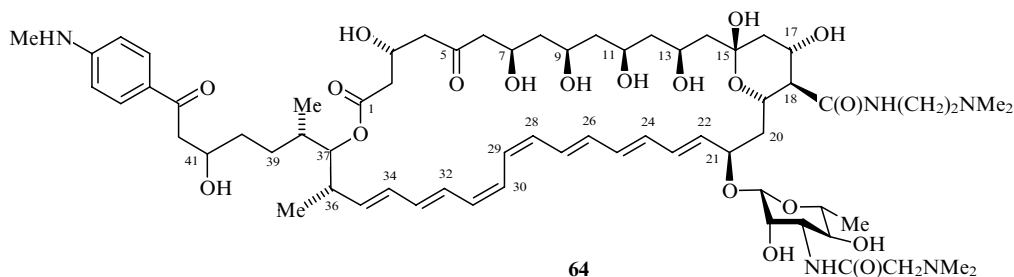
Соединение	<i>C. albicans</i> (BY4741)	<i>S. cerevisiae</i> (DYS1764)
1	0.30	> 50
54b	0.020	1.0
60	0.10	4.0
61	0.040	4.0

Синтезированы метиловые эфиры N-метил-N-(1-дезоксид-2-кетозил)производных полиеновых макролидов. Среди них наибольшего внимания заслуживает водорастворимая соль — L-аспартат метилового эфира N-метил-N-(1-дезоксид-2-фруктопираноз-1-ил)амфотерицина В (**62**), которую получали метилированием диазометаном производного **51**. Хотя соединение **62** несколько уступало в активности исходному антибиотику (IC_{50} (см.†) в отношении *C. albicans* составляет 0.15 $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ против 0.07 $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ для AmB),

† IC_{50} — концентрация, вызывающая ингибирование роста 50% тест-организмов.



Соединение	R ¹	R ²	X
59	C(O)(CH ₂) ₂ N(CH ₂) ₅	H	OMe
60	(CH ₂) ₃ NH ₂	H	OMe
61	(CH ₂) ₃ NH ₂	H	NH(CH ₂) ₂ NH ₂
62	1-Дезокси-D-фруктопираноз-1-ил	Me	OMe
63	Остаток α-(или β)-аминокислоты	H	OMe, CH ₂ C≡CH, CH ₂ C≡CPh
63a		H	OMe
63b		H	OMe



гемолитическая активность в отношении эритроцитов человека была значительно ниже. Кроме того, острая токсичность соединения **62** в экспериментах на мышах превышала $400 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$, что значительно больше аналогичной дозы для AmB ($LD_{50} = 6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$).⁴⁵ Соединение **62** проявляло также активность в отношении устойчивого штамма *Saccharomyces cerevisiae*.⁴⁶

С использованием различных α - и β -аминокислот были синтезированы N-аминоацильные аналоги эфиров AmB (**63**), содержащие дополнительную аминогруппу. Для конденсации применяли метод активированных эфиров, при этом использовали N-Fmoc-защищенные аминокислоты. Удаление защитной группы осуществляли эквимолярным количеством 1,5-дизабицикло[4.3.0]нон-5-ена (DBN).⁴⁷ Среди полученных N-аминоацильных производных аминокислот AmB метиловые эфиры *N*-D-орнитил- (**63a**) и *N*-D-лизиламфотерицина В (**63b**) показали противогрибковую активность *in vitro* и *in vivo*, сопоставимую с активностью соединения **1**.

При двойном химическом модифицировании партрицина А (**3**) получили серию производных по C(19)-карбоксильной группе и по 3'-аминогруппе микозамина. Амидирование карбоксильной группы проводили в присутствии DPPA, а аминогруппу модифицировали активированными эфирами аминокислот.³² Полученные соединения уступали по противогрибковому действию монозамещенным аналогам, но при этом были активнее AmB и могли образовывать водорастворимые соли. 3'-*N,N*-Диметиламиноацетильное производное (*N*-диметиламиноэтил)амида партрицина А (**64**) было отобрано для более тщательного изучения.

Водорастворимые соли соединения **64** — диаспарат (SPA-s-753) и диаскорбат (SPK-843) — исследовали на 116 штаммах грибов родов *Candida*, *Cryptococcus* и *Saccharomyces*. Соль SPK-843 проявила более высокую противогрибковую активность в отношении всех исследуемых штаммов по сравнению с активностью соединения **1**.⁴⁸ Детальное изучение водорастворимых солей производного **64** в экспериментах *in vivo* показало значительное снижение токсичности и улучшение терапевтического индекса относительно аналогичных параметров AmB. В настоящее время полусинтетическая водорастворимая соль SPK-843 проходит клинические испытания.⁴⁹

Были получены дважды модифицированные производные генно-инженерного полиенового макролидного антибиотика S44HP (**5**), одновременно замещенные по C(16)-карбоксильной группе и 3'-аминогруппе остатка микозамина.³⁵ Для функционализации использовали два синтетических подхода. Выбор путей синтеза был связан с трудностями процесса очистки целевых и/или промежуточных соединений. Оптимальным оказалась хроматографическая очистка продуктов в виде гидрофобных Fmoc-защищенных соединений.

Большинство производных было получено из карбоксамидов, которые затем превращали в соответствующие 3'-N-ацильные или 3'-N-алкильные соединения (схема 10).

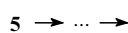
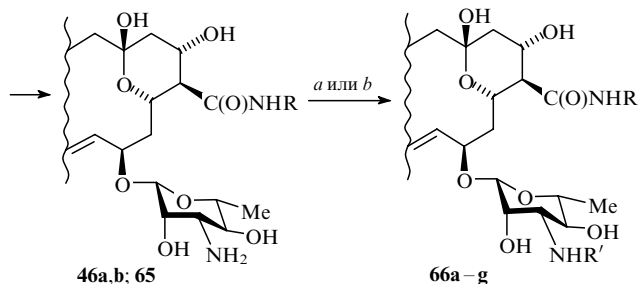
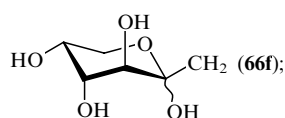


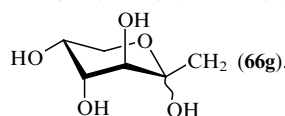
Схема 10



a — 1) PyBOP, $\text{Me}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ или N^α, N^ϵ -(Fmoc) $_2$ -L-Lys;
b — D-глюкоза или 4- $\text{Me}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{CHO}$, NaBH_3CN ;
 R = $(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2$ (**46a**); R' = $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{NMe}_2$ (**66a**),
 $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2$ -4 (**66d**),



R = $(\text{CH}_2)_3\text{NMe}_2$ (**46b**); R' = $\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ (**66c**);
 R = $(\text{CH}_2)_3\text{OH}$ (**65**); R' = $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{NMe}_2$ (**66b**), $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2$ -4 (**66e**),



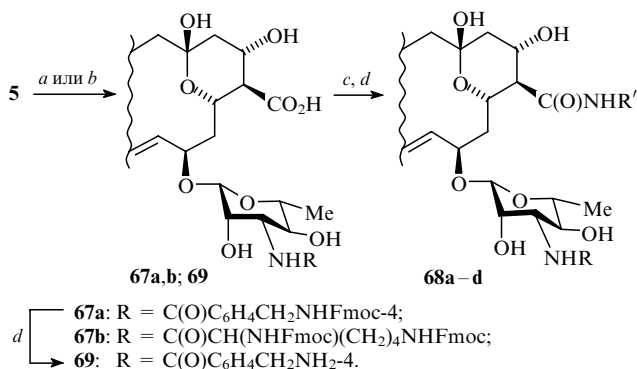
Карбоксамиды **46a,b** и **65** синтезировали в три стадии: защита 3'-аминогруппы, амидирование C(16)-карбоксильной группы с последующей хроматографической очисткой и удаление защитной группы. Затем 3'-аминогруппу остатка микозамина в карбоксамиды **46a,b** и **65** ацилировали *N,N*-диметилглицином или N^α, N^ϵ -(Fmoc) $_2$ -L-лизином, в результате получили соединения **66a–c**. Кроме того, алкилирование амидов **46a** и **65** сахарами (перегруппировка Амадори) или *n*-диметиламинобензальдегидом в присутствии NaBH_3CN привело к производным **66d–g**.

Некоторые дважды замещенные производные S44HP были получены из 3'-N-ацильных производных **67a,b** (схема 11).³⁵

Аминогруппу антибиотика **5** первоначально ацилировали N^α, N^ϵ -(Fmoc) $_2$ -L-лизином или *N*-Fmoc-*n*-аминометилбензойной кислотой. Затем C(16)-карбоксильную группу амидировали соответствующими аминами и после хроматографической очистки и удаления защитных групп получали дизамещенные аналоги S44HP — соединения **68a–d**.³⁵

Изучение противогрибковой активности синтезированных соединений показало, что амид **46a** и его N-производное **66f** по противогрибковой активности превосходили исходные соединения **1** и **5** в тестах *in vitro* на четырех культурах микроорганизмов (штаммы представлены в табл. 1). Кроме

Схема 11



$R = C(O)C_6H_4CH_2NH_2-4$; $R' = (CH_2)_2NMe_2$ (**68a**), $(CH_2)_3OH$ (**68b**);
 $R = C(O)CH(NH_2)(CH_2)_4NH_2$; $R' = (CH_2)_2NMe_2$ (**68c**),
 $(CH_2)_3OH$ (**68d**); a — 4-FmocNHCH₂C₆H₄CO₂H, PyBOP, Et₃N;
 b — N^x, N^y -(Fmoc)₂-L-Lys, DCC, HOBT, Pr₃NEt; c — R'NH₂·HCl,
 PyBOP, Et₃N; d — пиперидин, DMSO, MeOH; DCC — дициклогек-
 силкарбодимид, HOBT — 1-гидроксibenзотриазол.

того, в экспериментах *in vivo* было установлено, что производные **46a** и **66f** в 10 раз менее токсичны, чем AmB. Изучение противогрибковой активности на мышинной модели диссеминированного кандидоза также показало высокую эффективность данных производных по сравнению с соединением **1**.³⁵ Для них отношение эффективной дозы к максимально переносимой составило 2 и 6% соответственно, в то время как это значение для AmB равно 62%. Следует отметить, что введение в амиды **46a,b** и **65** дополнительных заместителей к аминогруппе в положении 3' или амидирование C(16)-карбоксильной группы N-аминометилбензоильного производного **69** практически не изменило активности. В то же время двойное модифицирование N-L-лизил-S44HP (**57a**) (МПК $\approx 8-16$ мкг·мл⁻¹) значительно улучшило

активность его производных **68c-d** в отношении всех четырех тестируемых штаммов грибов (МПК $\approx 1-4$ мкг·мл⁻¹). Дважды модифицированное производное **66f** показало более высокое действие *in vivo* на модели кандидозного сепсиса мышей по сравнению с AmB, но не превышающее активность монозамещенного исходного амида **46a**.³⁵

5. Фторсодержащие аналоги амфотерицина В

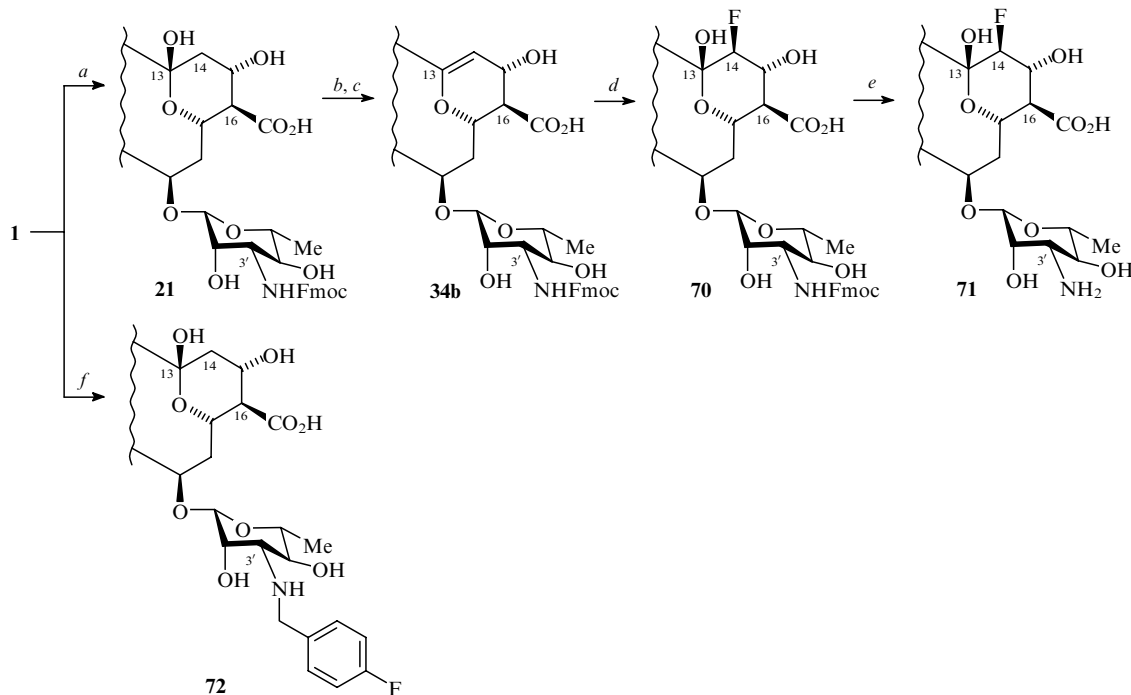
Введение атома фтора в молекулу антибиотика позволяет специальным методом ЯМР, а именно ротационным экзодвойным резонансом Оверхаузера в твердой фазе (REDOR), оценить взаимодействие антибиотика с мишенью на молекулярном уровне. С этой целью были синтезированы производные AmB, содержащие атомы ¹⁹F в полукетальном кольце (при атоме C(14)) (**70**, **71**),⁵⁰ в заместителе при аминогруппе остатка микозамина (**72**),⁵⁰ а также в полиеновой части молекулы (положение 28) (**73**).⁵¹

Введение атома фтора в положение 14 осуществляли при помощи электрофильного фторирующего реагента Selectfluor® (бис(тетрафторобората) 1,4-дизония-4-фтор-1-хлор-метилбисцикло[2.2.2]октана) (схема 12).

Следует отметить, что фторирование 13-дезоксиде-13,14-дидегидропроизводного **34b** протекало практически исключительно с образованием продукта **70**, в котором атом F занимал экваториальное положение. N-Фторбензильное производное **72** синтезировали методом восстановительного N-алкилирования с использованием *n*-фторбензальдегида и NaBH₃CN. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение двух суток.

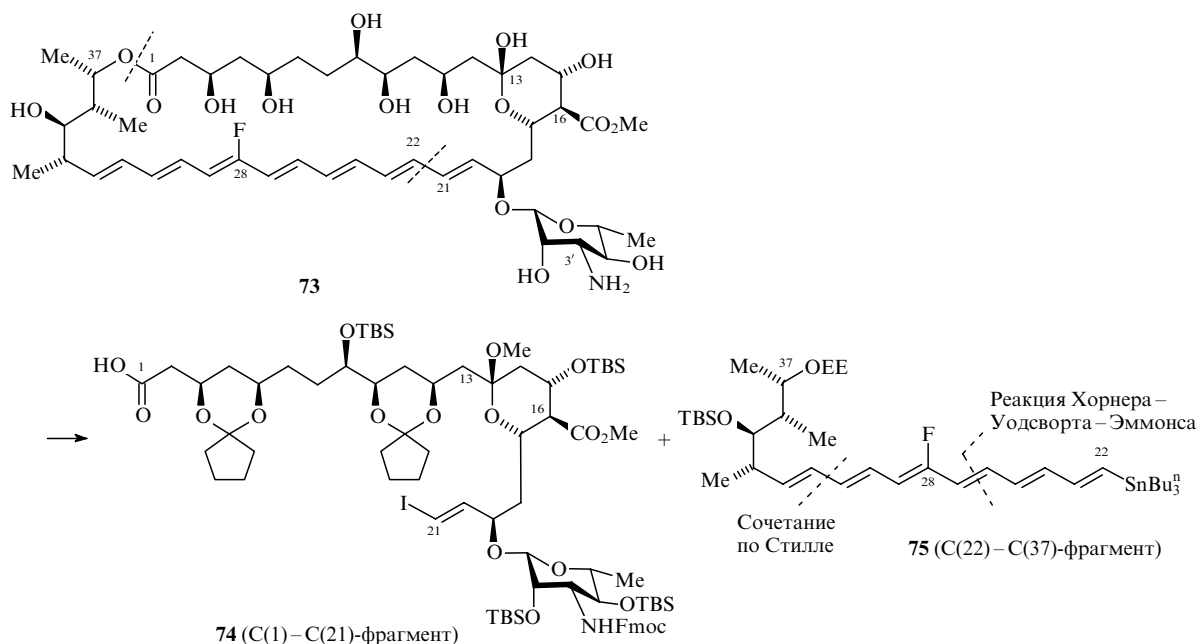
Наиболее сложной задачей явилось введение атома фтора в полиеновую часть молекулы антибиотика. Стратегия введения атома фтора в положение 28 представляет собой комбинацию методов деградации природного антибиотика и химического синтеза.⁵¹ На схеме 13 представлен ретросинтетический анализ соединения **73** — фрагменты **74** и **75**.

Схема 12



a — FmocOSu, DMF, PyH; b — TMSOTf, 2,6-лутидин, CH₂Cl₂; c — HF — PyH, THF; d — Selectfluor®, DMF — H₂O; e — пиперидин,
 DMSO — MeOH (4 : 1); f — 4-FC₆H₄CHO, NaBH₃CN, DMF — MeOH (10 : 7).

Схема 13



Полный синтез AmB и его осуществление несколькими группами исследователей детально рассмотрены в обзоре⁶.

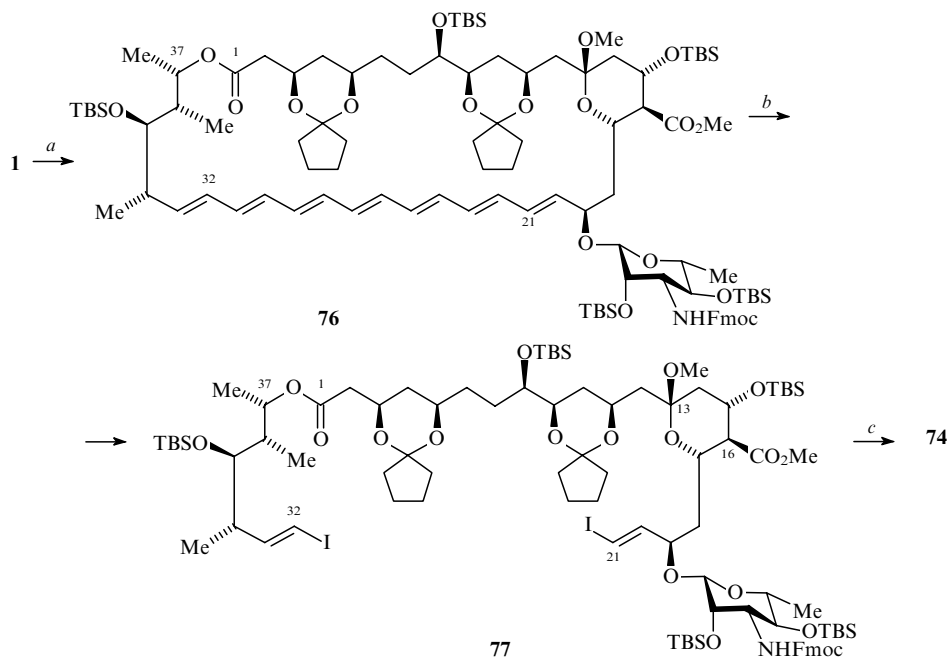
Фрагмент C(1)–C(21) (**74**) получен с помощью деградации AmB (схема 14).

Первоначально осуществляли последовательное блокирование всех реакционноспособных групп AmB (условия *a*). Затем исчерпывающим озонлизом «вырезали» полиеновый фрагмент с образованием диальдегида. Дальнейшая конденсация соединения **76** с иодоформом дала соответствующее бис(иодвинильное) производное **77**. Селективное омыление эфирной группы действием LiOH позволило получить целевой C(1)–C(21)-фрагмент **74**.

Конструирование гептаенового участка молекулы (фрагмента C(22)–C(37) (**75**)) осуществляли 12-стадийным синтезом, включающим реакции Стилле и Хорнера–Уодсворта–Эммонса (схема 15).

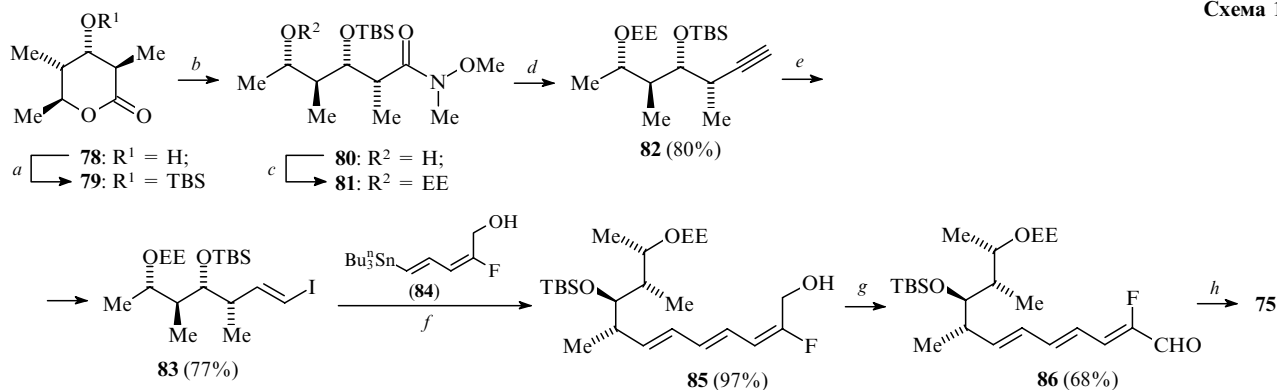
В качестве исходного соединения использовали гидроксид-δ-лактон **78**, в котором защищали гидроксильную группу (стадия *a*, соединение **79**). Раскрытие лактонного кольца с образованием амида Вайнреба (**80**) (стадия *b*), дальнейшее восстановление защищенного амида **81** действием диизобутилалюмогидрида (DIBAL) и обработка полученного альдегида системой TMSCHN₂–BuⁿLi (стадия *d*) привели к алкину **82**. Затем реакция гидростаннирования в присутствии пал-

Схема 14



a — 1) FmocOSu, PyH, DMF, 20°C, 14.5 ч; 2) MeI, Na₂CO₃, DMF, 20°C, 3.5 ч (выход в расчете на 2 стадии 79%); 3) диметилацеталь циклопентанона, CSA, MeOH, 30 мин; 4) TBSOTf, 2,6-лутидин, CH₂Cl₂, 0°C, 50 мин (выход 57%); *b* — 1) O₃, –78°C; 2) PPh₃, 20°C, 14 ч (выход 57%); 3) CrCl₂, CHI₃, THF, 20°C, 18 ч (выход 65%); *c* — 1) LiOH, THF, H₂O, MeOH, 20°C, 24 ч; 2) FmocOSu, PyH, DMF, 20°C, 11 ч (выход 50%); TBS — три-*n*-бутилсилил.

Схема 15



a — TBSOTf, 2,6-лутидин, CH_2Cl_2 , $-45^\circ C$, 40 мин (выход 80%); b — MeONHMe · HCl, Me_3Al , CH_2Cl_2 , $20^\circ C$, 6 ч; c — $CH_2=CHOEt$, PPTS, $20^\circ C$, 2.5 ч (выход 90%); d — 1) DIBAL, THF, $-78^\circ C$, 50 мин; 2) TMSCHN₂, BuⁿLi, THF, $-78 \rightarrow 0^\circ C$; e — 1) Bu₃SnH, CH_2Cl_2 , PdCl₂(PPh₃)₂, THF, $0^\circ C$, 20 мин; 2) I₂, THF, $0^\circ C$, 10 мин; 3) $CH_2=CHOEt$, PPTS, CH_2Cl_2 , $20^\circ C$, 15 мин; f — PdCl₂(MeCN)₂, DMF, $20^\circ C$, 1 ч; g — 1) реактив Десса–Мартина, CH_2Cl_2 , $20^\circ C$, 30 мин; 2) PhSeSePh, hv, CH_2Cl_2 , $20^\circ C$, 35 мин; h — (MeO)₂P(O)CH₂(CH=CH)₂SnBu₃ⁿ (87), LiHMDS, THF, $-78^\circ C$ (выход 84%); LiHMDS — гексаметилдисилазид лития.

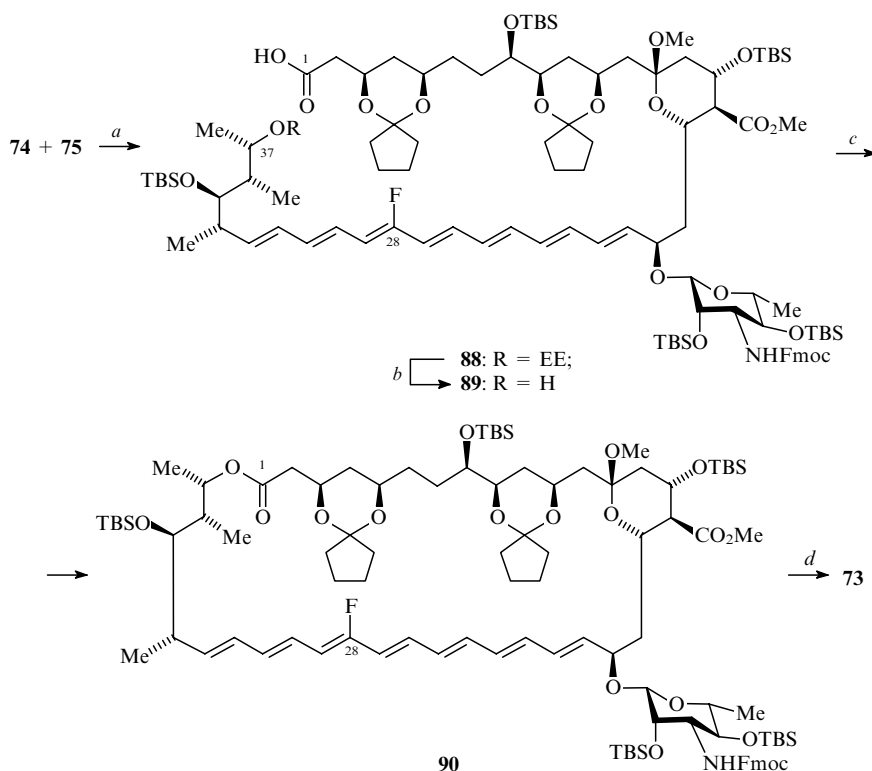
ладиевого комплекса и замещение трибутилстаннила на атом иода (стадия e) позволили получить иодсодержащее производное **83**. В данных реакционных условиях происходило частичное удаление защитной этоксизетильной (EE) группы, что требовало повторной обработки реакционной смеси этилвиниловым эфиром. Фторсодержащий фрагмент был введен в молекулу с помощью фторированного алкадиенилстаннана **84**. Конденсация соединений **83** и **84** по Стилле (стадия f) приводила к фторированному соединению **85** в виде E -изомера. Дальнейшее окисление соединения **85** реагентом Десса–Мартина, изомеризация под действием дифенилдиселенида и облучения вольфрамовой лампой (ста-

дия g) позволили получить фторированный альдегид **86** в виде единственного Z -изомера. В результате последующей конденсации альдегида **86** со станнилфосфонатом **87** по реакции Хорнера–Уодсворта–Эммонса образовывался целевой фторированный полиеновый фрагмент C(22)–C(37) (**75**).

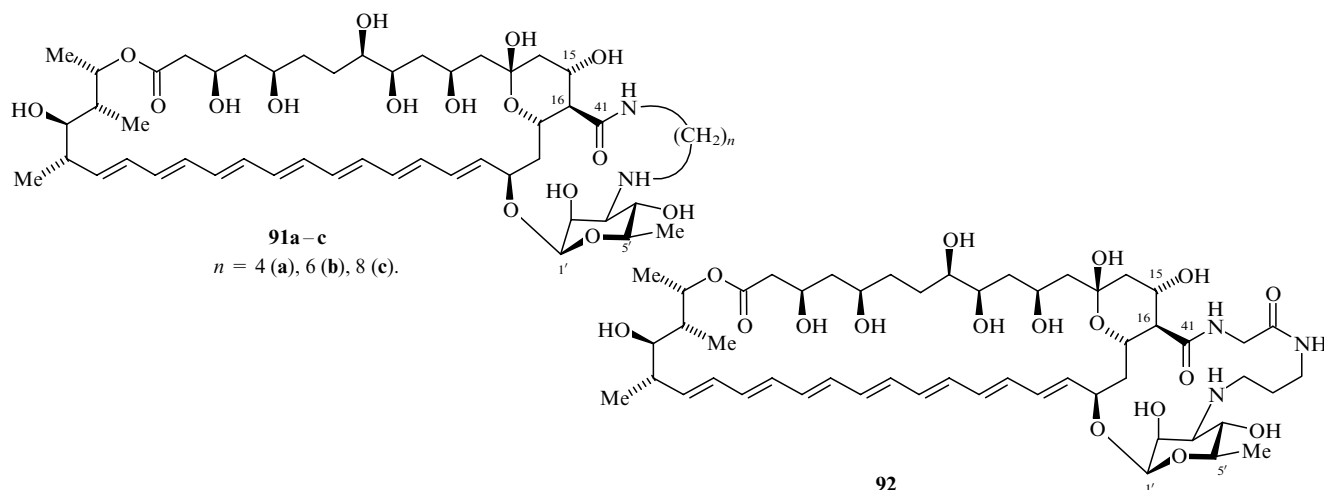
Конденсацию полученных фрагментов C(1)–C(21) (**74**) и C(22)–C(37) (**75**) проводили согласно схеме 16.

При взаимодействии иодида **74** и станнана **75** в присутствии палладиевого комплекса (стадия a) образовывался гептаен **88** с выходом 70%. Дальнейшую циклизацию соединения **89** осуществляли методом Сиина (стадия c). Фторированный макролактон **90** был получен с выходом 69%. Финальное

Схема 16



a — Pd₂(dba)₃ · CHCl₃, AsPh₃, Pr₄NEt, THF, 3 ч; b — PPTS, диметилацеталь циклопентанона, MeOH, $20^\circ C$, 1.5 ч; c — ангидрид 2-метил-6-нитробензойной кислоты, DMAP, CH_2Cl_2 , $20^\circ C$, 1.5 ч; d — 1) HF–PyH, PyH, MeOH, $50^\circ C$, 27 ч (выход 82%); 2) пиперидин, MeOH, $20^\circ C$, 3 ч (выход 79%); 3) HCl, MeOH, $0^\circ C$, 34 ч; 4) HCl, H₂O, BuⁿOH, $20^\circ C$, 1 ч (выход 53%); dba — дибензилдиенацетон, DMAP — 4-диметиламинопиридин.



последовательное удаление защитных групп (стадия *d*) позволило получить C(28)-фторированный аналог AmB (**73**).

Были изучены биологические свойства синтезированных фторсодержащих аналогов. Фторпроизводное **72** обладает противогрибковой активностью в отношении *Aspergillus niger* и мембрано-проникающими свойствами, почти идентичными таковым для AmB. Соединение **71** было практически лишено противогрибковой активности. Активность соединения **73** в отношении *Aspergillus niger* была также близка к таковой для AmB. На основании данных ЯМР установлено, что фторпроизводные **71** и **72** образуют ионные каналы подобно соединению **1**. Фторпроизводные **71–73** оказались удобными объектами для изучения механизмов образования ионных каналов.

6. Циклические производные амфотерицина В

Амфотерицин В (**1**) содержит два жестких фрагмента: макролидное кольцо и остаток микозамина, которые соединены между собой способной к вращению гликозидной связью. Их относительное расположение обуславливает возможность взаимодействия типа AmB–AmB и AmB–эргостерин, в которых ключевую роль играют межмолекулярные и внутримолекулярные водородные связи. Для установления взаимосвязи между ориентацией аминсахара в молекуле полиенового антибиотика и противогрибковой активностью были синтезированы производные AmB с различными внутримолекулярными мостиками (сшивками) между карбоксильной и аминогруппами.^{18, 52}

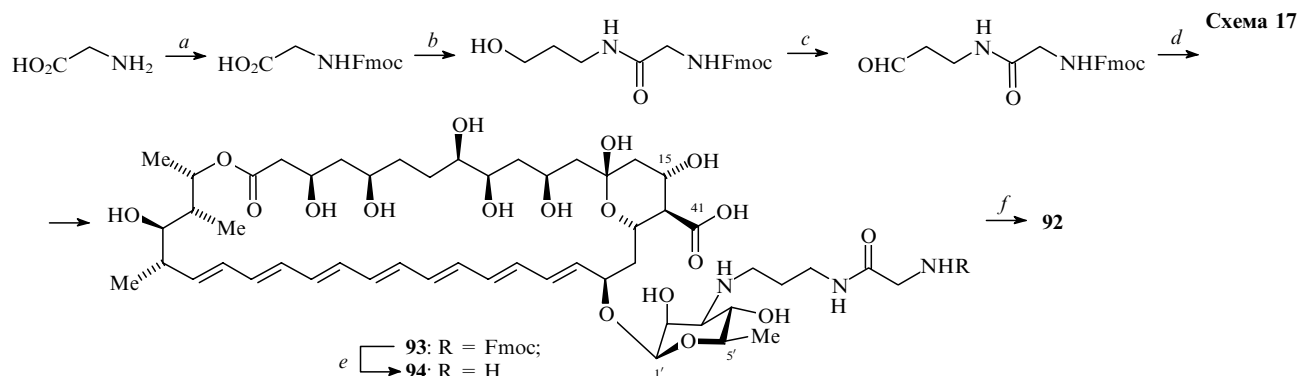
Соединения **91a–c** содержали в качестве сшивки олигометиленовые цепи различной длины: C₄, C₆ и C₈. Устано-

влено, что взаимодействия этих производных с эргостерином мембраны грибов различны. Соединение **91b** проявило большее сродство к эргостерину по сравнению с остальными производными и с самим AmB.⁵² Однако его противогрибковая активность в отношении *Aspergillus niger* оказалась в 4 раза ниже, чем у соединения **1**.

Авторы предполагают, что ослабление активности связано с уменьшением проницаемости через клеточную стенку грибов, вызванным достаточно высокой гидрофобностью введенного мостика. С целью повышения гидрофильности было получено производное **92**, в котором олигометиленовая цепь заменена на глицинсодержащую сшивку с сохранением общего количества атомов углерода.²⁰ Синтез соединения **92** представлен на схеме 17.

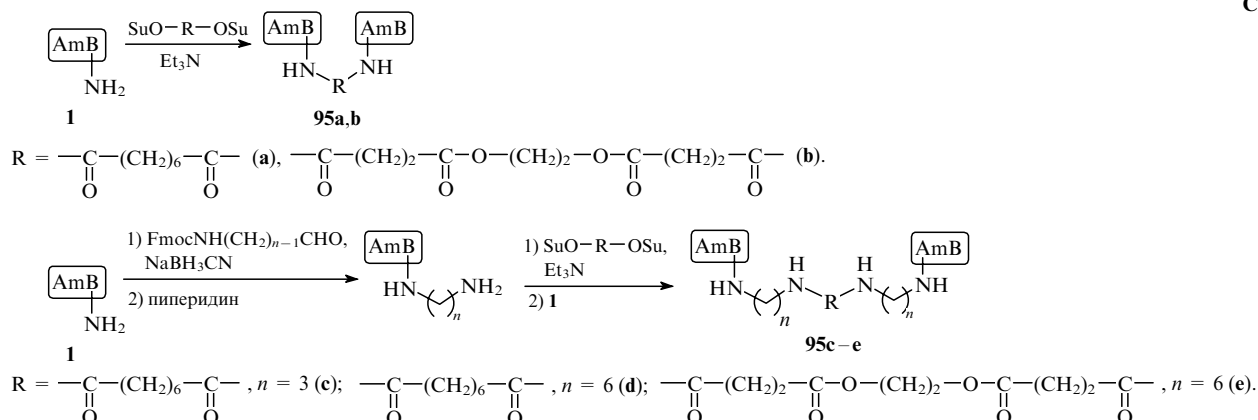
N-Fmoc-Глицин (стадия *a*) конденсировали с 3-аминопропанолом в присутствии PyBOP (стадия *b*). Окисление первичной гидроксильной группы до альдегидной осуществляли методом Десса–Мартина (стадия *c*). Дальнейшее восстановительное алкилирование аминогруппы остатка микозамина полученным альдегидом с образованием защищенного амина **93** (стадия *d*) и его деблокирование до соединения **94** (стадия *e*), а также последующее внутримолекулярное амидирование карбоксильной группы действием PyBOP (стадия *f*) позволили получить производное **92**.

Противогрибковые свойства соединения **92** в отношении *Aspergillus niger* были улучшены в 2 раза по сравнению с таковыми для гексаметиленового аналога **91b**. На основании УФ-спектров и спектров КД было установлено, что соединение **91b** в натрий-фосфатном буфере образует в основном нерастворимые в воде агрегаты, в то время как соединение **92**, так же как и AmB, формирует водорастворимые олигомеры.



a — FmocOSu, PyH, MeOH; *b* — 3-аминопропанол, PyBOP, HOBT, Pr₂NEt, DMF; *c* — реагент Десса–Мартина, CH₂Cl₂; *d* — **1**, NaBH₃CN, DMF–MeOH; *e* — пиперидин, DMF–MeOH; *f* — PyBOP, HOBT, Pr₂NEt, DMF.

Схема 18



Было синтезировано производное **92**, содержащее изотопно меченный $[1\text{-}^{13}\text{C}, 15\text{N}]$ глицин в сшивке. Методом REDOR показано, что водорастворимые олигомеры антибиотика образуют агрегаты, иммобилизованные в эргостеринсодержащие липосомы.¹⁸

7. Димеры амфотерицина В

Канал, образуемый амфотерицином В в мембране, находится в равновесном состоянии, т.е. структура канала нестабильна, и канал может подвергаться диссоциации.¹⁷ С целью увеличения устойчивости канала было предложено синтезировать димеры AmB, содержащие мостики между аминогруппами антибиотика (N,N' -димеры)⁵³ и между карбоксильной и аминогруппами (C,N -димеры).⁵⁴ N,N' -Димеры **95a,b** получали с использованием N -гидроксисукцинимидных эфиров дикарбоновых кислот по схеме 18. Эти димеры содержали олигометиленовый мостик между амидными связями и были полностью лишены противогрибковой активности в экспериментах *in vitro*. Данные спектроскопии ЯМР также показали, что соединения **95a,b** не образуют ионных каналов на модельной мембране.

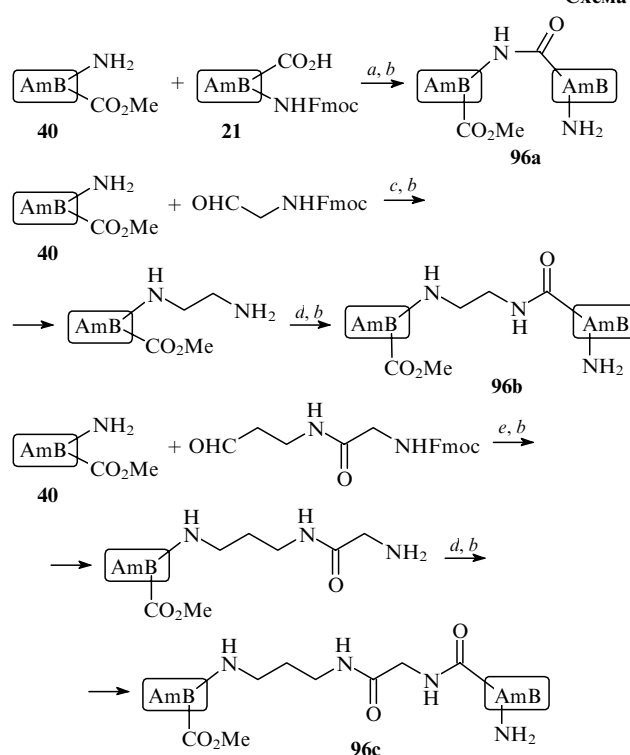
Как было отмечено выше, аминогруппа в составе молекулы антибиотика играет важную роль в проявлении противогрибковой активности полиенов. Для того чтобы сохранить аминофункциональность, были получены димеры **95c-e**, в которых молекулы AmB соединены между собой через аналогичную сшивку, но с использованием $3'$ - N -амидоалкильной связи.

На модельной мембране с использованием эргостеринсодержащих липосом было показано, что димеры **95c-e** способны образовывать ионные каналы, подобно AmB, причем димер **95d** делает это несколько лучше.

Второй тип димеров (C,N -димеры) были синтезированы согласно схеме 19.⁵⁴ Для получения димеров этого типа карбоксильную группу одной молекулы AmB соединяли с аминогруппой другой молекулы. В качестве конденсирующего реагента для образования амидной связи во всех трех случаях использовали PyBOP. Димер **96a** получали путем прямой конденсации метилового эфира AmB (**40**) и N -Fmoc-AmB (**21**). Димеры **96b** и **96c** содержали в своем составе мостик между двумя молекулами антибиотика. Для их синтеза использовались соответствующие N -Fmoc-аминоальдегиды, которые методом восстановительного алкилирования присоединяли к аминогруппе метилового эфира AmB (**40**). Дальнейшая конденсация с N -Fmoc-AmB (**21**) и последующее удаление Fmoc-защиты позволили получить димеры **96b,c**.

Димеры с короткими мостиками (**96a,b**) в экспериментах *in vitro* показали полное отсутствие противогрибковой ак-

Схема 19



a — PyBOP, HOBT, Pr_2^iNEt , DMF; b — пиперидин, DMSO–MeOH; c — **1**, NaBH_3CN , DMF–MeOH; d — **21**, PyBOP, HOBT, Pr_2^iEtN , DMF; e — $\text{NaBH}(\text{OAc})_2$, DMF, Pr^iOH .

тивности в отношении штамма *Aspergillus niger*, что также подтвердилось исследованием каналаобразующей способности этих димеров по сравнению с AmB. Однако димер **96c**, содержащий более длинную сшивку между молекулами антибиотика, обладал противогрибковой активностью, сравнимой с таковой для соединения **1**, а в модельном опыте образовывал ионные каналы подобно AmB.

IV. Конъюгаты амфотерицина В с макромолекулами

Одним из перспективных направлений модифицирования полиеновых антибиотиков является создание их конъюгатов с различными макромолекулами. Этот подход неоднократно применялся для улучшения химиотерапевтических свойств многих антибиотиков.⁵⁵ Образование конъюгатов ограничено растворимых препаратов, таких как AmB, с водора-

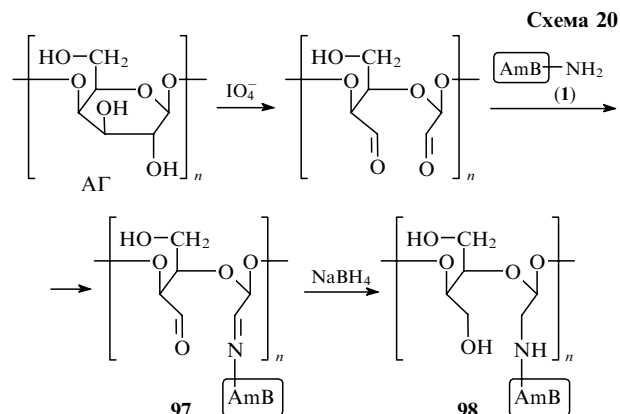
створимыми полимерами-носителями (белками, полипептидами, полисахаридами, синтетическими полимерами) может изменить физические свойства исходного соединения, в том числе его стабильность и растворимость. При этом появляется возможность обеспечить целенаправленную доставку и повысить уровень аккумуляции лекарственного препарата в поврежденных тканях, тем самым улучшить его терапевтический эффект и снизить токсичность.

1. Конъюгаты амфотерицина В с полисахаридами

Были получены конъюгаты AmB с арабиногалактаном (АГ) — высокоразветвленным полисахаридом растительного происхождения. Главная цепь этого полисахарида состоит из звеньев галактозы, а боковые цепи — из звеньев галактозы и арабинозы, из единичных звеньев арабинозы, а также из уроновых кислот, в основном глюкуроновой. Высокая растворимость в воде, биосовместимость, биodeградация и легкое образование конъюгатов с различными моно- и бифункциональными реагентами позволяют успешно использовать АГ в качестве носителя лекарственного вещества в организме.⁵⁵

Арабиногалактан активировали реакцией периодатного расщепления. На схеме 20 представлены превращения основной цепи арабиногалактана — (1→4)-β-Gal. Для удаления избытка периодата после окислительного расщепления активированный арабиногалактан подвергали очистке на ионообменной смоле. Очищенный окисленный полисахарид вводили в реакцию с соединением **1**, при этом происходило образование связи C=N между альдегидными группами окисленного АГ и 3'-аминогруппой остатка микозамина AmB. Восстановление иминной связи в полученном конъюгате **97** до более стабильной аминной осуществляли действием NaBH₄. Непрореагировавшие альдегидные группы АГ восстанавливались до спиртовых. Все реакции проводили в водной среде, что является значительным преимуществом метода.^{56, 57}

Конъюгаты **97** и **98** оказались достаточно стабильными в твердом виде при комнатной температуре. Синтез конъюгатов AmB с арабиногалактаном с различным содержанием антибиотика проводили в различных буферных системах и при разных значениях pH реакционной среды. В оптимальных условиях конъюгации (0.1 М боратный буфер, pH 11, комнатная температура, 48 ч) выход конъюгата составил > 90%.⁵⁷ Наиболее перспективным оказался конъюгат **98**, содержащий ~20 мас.% антибиотика. Его растворимость в воде составила > 1000 мг·мл⁻¹, в то время как AmB почти не

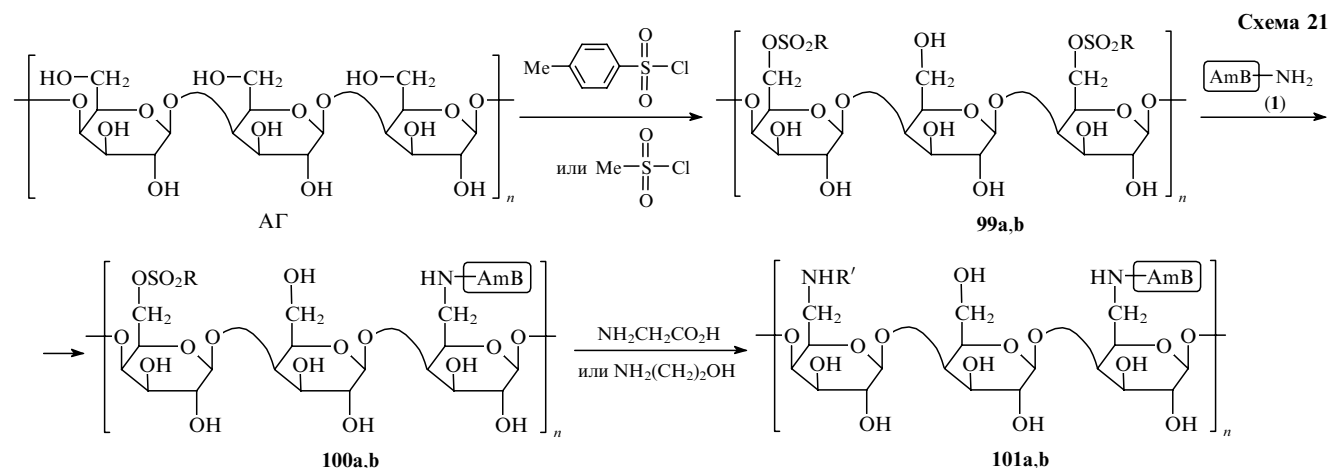


растворялся в воде (< 0.1 мг·мл⁻¹). При сохранении высокой противогрибковой активности в отношении *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans* в экспериментах *in vitro* (МПК = 0.12–0.25 мкг·мл⁻¹) конъюгат **98** был значительно менее токсичным в тестах на животных (МПД = 50 мг·кг⁻¹ против 4 мг·кг⁻¹ для комплекса AmB с дезоксихолатом натрия).

Столь значительное снижение токсичности было достигнуто благодаря очистке конъюгата методом гель-проникающей хроматографии на сефадексе. При этом удалялся несвязанный AmB, способный адсорбироваться на конъюгате с образованием нековалентных связей. Испытания *in vivo* показали, что терапевтическая активность конъюгата **98** была близка к активности липосомальной формы AmB (препарату AmBisome) и выше, чем при использовании комплекса AmB с дезоксихолатом натрия (препарат Fungizone).

По аналогичной схеме был получен иминный конъюгат AmB с декстраном.⁵⁸ С целью уменьшения токсичности такого конъюгата непрореагировавшие альдегидные группы АГ были заблокированы реакцией с этаноламином. В результате острая токсичность препарата на линии клеток RAW 264.7 была снижена на 100%.⁵⁸

Однако, несмотря на высокую эффективность полученных конъюгатов в отношении патогенных грибов, процесс окисления полисахаридной цепи периодатом может привести к частичному разрушению полимера, изменению его природной структуры и биораспределения. По этой причине был разработан способ синтеза конъюгатов AmB с неразрушенным полисахаридом.⁵⁹ Суть метода состоит в прямом



R = 4-MeC₆H₄ (a), Me (b); R' = CH₂CO₂H (a), (CH₂)₂OH (b).

замещении гидроксильных групп полисахарида на аминоксодержащий AmB.

На первом этапе гидроксильные группы были активированы реакцией арабиногалактана с тозил- или мезилхлоридом. На схеме 21 представлен фрагмент основной цепи арабиногалактана (1→4)-β-Gal. Полученный АГ-тозилат (**99a**) или АГ-мезилат (**99b**) далее вводили в реакцию конденсации с AmB с образованием соответствующих конъюгатов **100a,b**. Непрореагировавшие тозилатные и мезилатные группы в конъюгатах были в дальнейшем замещены на остатки глицина или этаноламина (соединения **101a,b**). Содержание антибиотика в конъюгатах составило ~20 мас.%. Конъюгаты **101a,b** были водорастворимыми и более стабильными в водных растворах по сравнению с соединением **1**. Они обладали высокой активностью в отношении *Leishmania major* ($LD_{50} \approx 0.1 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$) и *C. albicans* (МПК $\approx 1 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$). Опыты на BALB/с-мышях выявили уменьшение токсичности конъюгатов (МПД = 10–30 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$) по сравнению с токсичностью комплекса AmB с дезоксихолом натрия (МПД = 1 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$). Основным недостатком этого метода конъюгации по сравнению с восстановительным аминированием является использование токсичного тозилата или мезилата и органических растворителей, а также необходимость их последующего тщательного удаления.

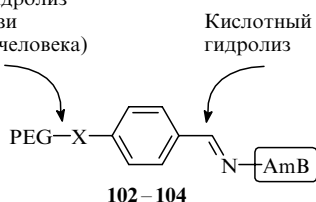
2. Конъюгаты амфотерицина В с полиэтиленгликолем

Описаны различные конъюгаты соединения **1** с полиэтиленгликолем (PEG), созданные для направленной доставки лекарственного препарата в области поврежденных органов и тканей.⁶⁰ Поскольку в очаге инфекции уровень pH ниже, чем в нормальных тканях, для получения конъюгатов было использовано образование pH-чувствительных связей между лекарственным веществом и носителем. В качестве такой связи часто выступает иминная связь между 3'-аминогруппой остатка микозамина в AmB и альдегидной группой производных PEG, которая устойчива при физиологическом значении pH (7.4–7.6), но легко гидролизуется при более низком значении pH. Из соединения **1** и PEG была получена серия конъюгатов **102–104**, различающихся природой мостика между молекулой антибиотика и полимером (схема 22).

Как видно из схемы, мостиком служит 1,4-дизамещенное бензольное кольцо. Оно соединено с одной стороны иминной связью с AmB, а с другой — различными типами связей (простой эфирной, сложноэфирной и амидной) с полимером. Кроме того, в соединениях **104** варьировалась молекулярная масса полимера.⁶⁰

Было изучено поведение конъюгатов в буферной системе, в плазме крови и сыворотке. Все полученные конъюгаты оказались относительно стабильными в фосфатном буфере при физиологических условиях (pH 7.4, 37°C). При понижении pH буфера до 5.5 наблюдалось высвобождение свободного AmB вследствие гидролиза основания Шиффа.

Ферментативный гидролиз
сложноэфирной связи
(плазма/сыворотка человека)



Кислотный
гидролиз

$t_{1/2} = 2–5 \text{ ч}$

(в зависимости от молекулярной массы PEG)

$t_{1/2} = 2–45 \text{ мин}$

(в зависимости от заместителя в ароматическом кольце)

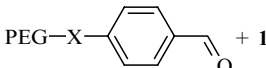
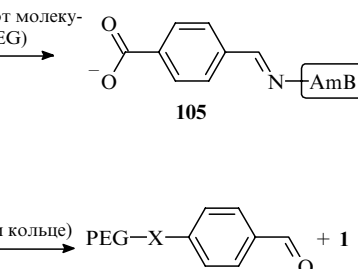


Схема 22

X = O (**102**), NHC(O) (**103**), OC(O) (**104a–c**);

M_{PEG} , кДа: 5 (**a**), 10 (**b**), 20 (**c**).

Скорость кислотного гидролиза зависела от природы заместителей в бензольном кольце и не зависела от молекулярной массы PEG. Конъюгаты **104a–c**, содержащие сложноэфирную связь между полимером и спейсером, подвергались ферментативному расщеплению в плазме/сыворотке крови человека; скорость расщепления зависела от молекулярной массы полимера. Под действием гидролаз образовывался 4-карбоксибензилиденаминомфотерицин В (**105**), который затем распадался на 4-формилбензойную кислоту и свободное соединение **1** (схема 23).

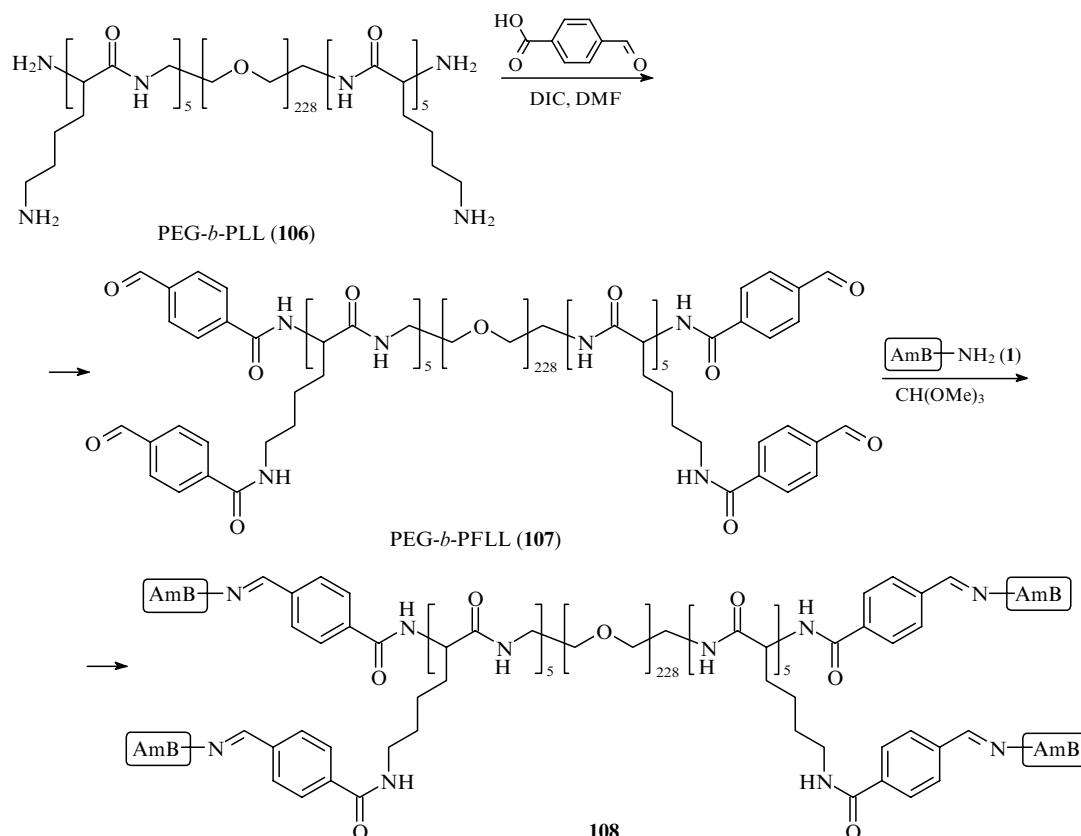
Изучение острой токсичности конъюгатов **104a,b** на мышах выявило их значительное преимущество перед применением свободного антибиотика. Значения LD_{50} составили 40.5 и 20.7 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ для соединений **104a** и **104b** соответственно, что свидетельствует о снижении токсичности препарата в 6–11 раз. В результате проведенных исследований эти конъюгаты могут использоваться в качестве пролекарств (депо-форм) с пролонгированным действием для направленной доставки активного вещества в область патологического процесса.

Достаточно активно используется для доставки лекарственных веществ блок-сополимер на основе PEG — поли(этиленгликоль)-*b*-поли(L-лизин) (PEG-*b*-PLL, **106**) (схема 24).

Это полностью биосовместимый нетоксичный полимер, способный присоединить большое число молекул лекарственного препарата (например, AmB). Получают PEG-*b*-PLL (**106**) поликонденсацией защищенного L-лизина (*N*^ε-бензилоксикарбонил-L-лизина) с α,ω-диаминополи(этиленгликолем). После удаления бензилоксикарбонильных защитных групп образуется полимер молекулярной массы 13 200 со свободными аминогруппами.⁶¹ На схеме 24 представлен синтез конъюгата из соединения **1** и PEG-*b*-PLL (**106**). Активацию PEG-*b*-PLL осуществляли с помощью 4-формил-бензойной кислоты в присутствии диизопропилкарбодиимида (DIC). Затем полученный полимер PEG-*b*-PFLL (**107**) конденсировали с соединением **1**. Альдегидные группы PEG-*b*-PFLL взаимодействовали с первичной 3'-аминогруппой остатка микозамина полиена с образованием основания Шиффа. Конъюгат **108** содержит 12 молекул антибиотика, присоединенных pH-чувствительной иминной связью к одной молекуле полимера. Было установлено, что он стабилен в плазме крови и фосфатном буфере при pH 7.4, однако при pH буфера

Схема 23

Схема 24

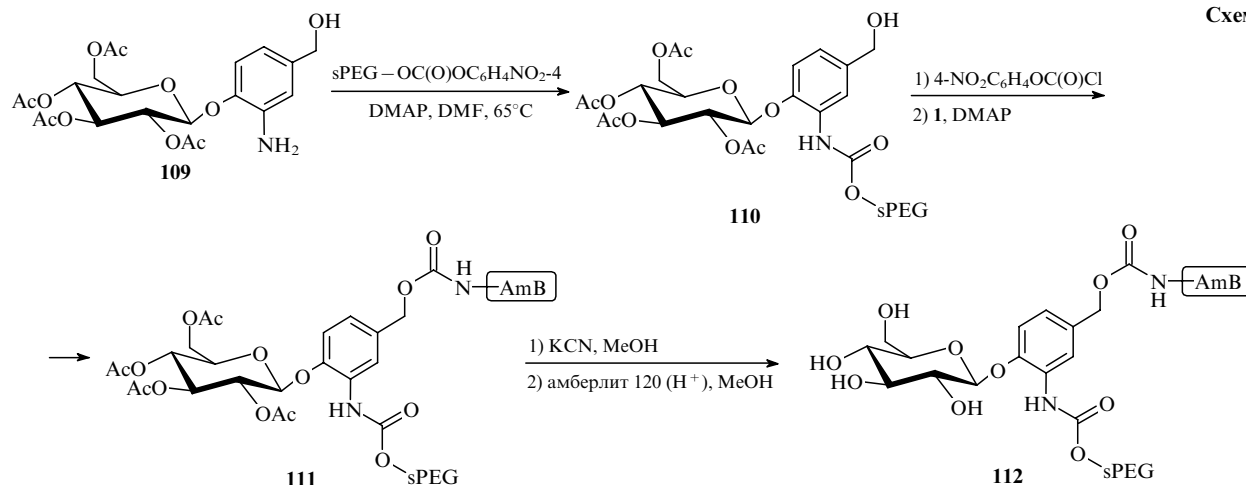


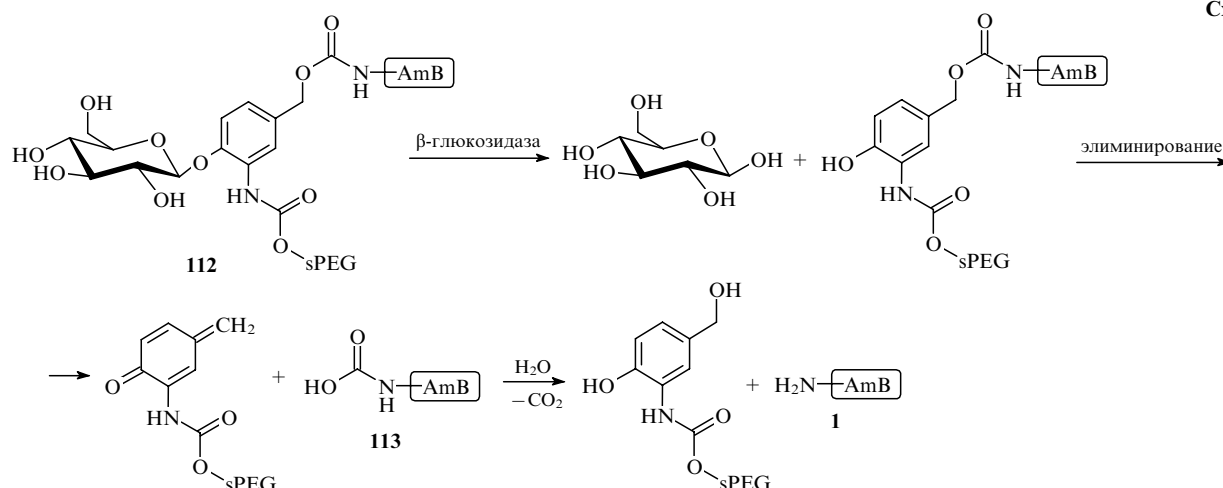
5.5 наблюдалось высвобождение AmB с периодом полураспада 2 мин. В экспериментах *in vivo* конъюгат **108** проявил достаточно низкую токсичность ($LD_{50} = 45 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$), в связи с чем признан перспективным для дальнейшего изучения.

В настоящее время проблема повышения избирательности действия лекарственного препарата является весьма актуальной. Один из подходов для ее реализации основан на результатах исследований природы патогенов. Обнаружено, что многие семейства грибов, такие как *Aspergillus*, *Candida* или *Trichosporon*, имеют в своем ферментном составе специфические β -глюкозидазы. В организме человека β -глюкозидазы встречаются только в некоторых видах бактерий кишечной микрофлоры. Это обстоятельство было использовано для получения конъюгатов, способных к направленной доставке антибиотика в область очага инфекции. Был синте-

зирован конъюгат AmB с разветвленным PEG — эфиром пентаэритритполиэтиленгликоля (sPEG) молекулярной массой 20 000, содержащий в шивке чувствительную к действию ферментных гидролаз β -глюкозидную связь (схема 25). Структура конъюгата включала также два типа карбаматных связей: стабильную карбаматную связь, соединяющую полимер со спейсером, и достаточно лабильную карбаматную связь между 3'-аминогруппой остатка микозамина антибиотика и шивкой. В качестве шивки использовали глюкопиранозид **109**, который синтезировали исходя из тетра-*O*-ацетил- α -D-глюкопиранозилбромидом и 4-гидроксиметил-2-нитрофенола.⁶² Глюкопиранозид **109** конденсировали с модифицированным sPEG. С помощью 4-нитрофенилхлорформата полимер **110** был присоединен мобиль-

Схема 25





ной карбаматной связью к AmB с образованием соответствующего конъюгата **111**.

Из-за нестабильности амфотерицина В для удаления ацетильных защитных групп с остатка глюкозы использовали каталитические количества цианида калия, который затем удаляли из реакционной смеси с помощью ионообменной смолы. Полученный конъюгат **112** очень хорошо растворялся в воде. Было установлено, что молярное соотношение антибиотик:полимер составляет 4:1, т.е. одна молекула sPEG связана с 4 молекулами AmB.

На основании предварительных данных *in vitro* о стабильности конъюгата **112** в буферном растворе в присутствии β -глюкозидаз авторы сделали вывод о вероятном механизме действия. При попадании в очаг инфекции конъюгат **112** первоначально подвергается действию β -глюкозидазы, происходит расщепление гликозидной связи в структуре сшивки и высвобождение глюкозы (схема 26).

Дальнейшее элиминирование приводит к образованию карбоксамидо-AmB (**113**), который легко декарбоксилируется с высвобождением свободного антибиотика **1**. Однако для практического применения конъюгата **112** требуются более детальные доклинические исследования.

Таким образом, в создании конъюгатов полиеновых антибиотиков существенную роль играет выбор полимер-носителя, типа связи между носителем и активным веществом, а также структуры сшивки, соединяющей полимер и активное вещество.

V. Заключение

Благодаря химическому и генно-инженерному дизайну за последние годы были получены серии неизвестных ранее полиеновых макролидов. Анализ связи структура–активность новых полиенов *in vitro* и *in vivo* позволяет не только детально изучать механизмы их действия, но и создавать более эффективные и менее токсичные противогрибковые препараты нового поколения.

Результаты изучения этой связи в условиях *in vitro* помогают отобрать наиболее активные соединения и ответить на вопрос, какие элементы структуры антибиотика ответственны за связывание с мишенью, а какие — нет. Исследование противогрибкового действия и токсичности соединений-лидеров на животных позволяет выявить препараты с наибольшей активностью и наименьшей токсичностью. Особую ценность представляют опыты на иммунодефицитных животных, так как они наиболее приближены к

условиям будущего клинического применения полиеновых антибиотиков при системных грибковых заболеваниях.

Авторы выражают благодарность профессору С.Б.Зотчеву (Департамент биотехнологии Норвежского университета науки и технологии, Трондхейм, Норвегия) за ценные замечания к обзору.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президента РФ (проект НШ-5290-2010.4) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-03-00210-а).

Литература

1. Л.С.Страчунский, Ю.Б.Белоусов, С.Н.Козлов. *Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии*. Боргес, Москва, 2002
2. A.L.Demain, S.Sanchez. *J. Antibiot.*, **62**, 5 (2009)
3. Г.О.Бронин, А.М.Демина, Т.А.Высоцкая, А.М.Тимаков, Л.В.Харазова, К.Л.Кондратчик, В.А.Минаев, А.В.Пахомов, Д.Н.Балашов, В.В.Буянов. *Педиатрия*, **4**, 31 (2004)
4. P.Caffrey, J.F.Aparicio, F.Malpartida, S.B.Zotchev. *Curr. Top. Med. Chem.*, **8**, 639 (2008)
5. A.Espinell-Ingroff. *Antifungal Agents. Encyclopedia of Microbiology*. (3rd Ed.). Elsevier, Amsterdam, 2009. P. 205
6. D.M.Cereghetti, E.M.Carreira. *Synthesis*, 914 (2006)
7. A.Czerwinski, W.A.König, P.Sowiński, E.Borowski. *J. Antibiot.*, **40**, 1023 (1987)
8. S.Yoshioka, V.J.Stella. *Stability of Drugs and Dosage Forms*. Kluwer Academic; Plenum Publ., New York, 2000. P. 64
9. S.E.F.Borgos, P.Tsan, H.Sletta, T.E.Ellingsen, J.-M.Lancelin, S.B.Zotchev. *J. Med. Chem.*, **49**, 2431 (2006)
10. P.Bruheim, S.E.F.Borgos, P.Tsan, H.Sletta, T.E.Ellingsen, J.-M.Lancelin, S.B.Zotchev. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 4120 (2004)
11. B.Byrne, M.Carmody, E.Gibson, B.Rawlings, P.Caffrey. *Chem. Biol.*, **10**, 1215 (2003)
12. M.Carmody, B.Murphy, B.Byrne, P.Power, D.Rai, B.Rawlings, P.Caffrey. *J. Biol. Chem.*, **280**, 34420 (2005)
13. D.S.Palacios, T.M.Anderson, M.D.Burke. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 13804 (2007)
14. И.Д.Трещалин, Х.Слетта, С.Е.Ф.Боргос, Э.П.Переверзева, Т.А.Воейкова, Т.Е.Эллингсен, С.Б.Зотчев. *Антибиотики и химиотерапия*, **50**, 18 (2005)
15. T.Brautaset, H.Sletta, A.Nedal, S.E.F.Borgos, K.F.Degnes, I.Bakke, O.Volokhan, O.N.Sekurova, I.D.Treshalin, E.P.Mirchink, A.Dikiy, T.E.Ellingsen, S.B.Zotchev. *Chem. Biol.*, **15**, 1198 (2008)
16. N.Matsumori, K.Tahara, H.Yamamoto, A.Morooka, M.Doi, T.Oishi, M.Murata. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 11855 (2009)

17. Х.М.Касумов. *Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков*. Наука, Москва; ЭЛМ, Баку, 2009
18. N.Matsumori, Y.Sawada, M.Murata. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 11977 (2006)
19. T.E.Andreoli. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **235**, 448 (1974)
20. B.De-Kruijff, R.Demel. *Biochim. Biophys. Acta*, **339**, 57 (1974)
21. Ю.Д.Шенин, В.В.Белахов. *Антибиотики и химиотерапия*, **42**, 34 (1997)
22. Ю.Д.Шенин, В.В.Белахов, Р.А.Аравийский. *Хим.-фарм. журн.*, **27** (2), 14 (1993)
23. M.J.Driver, A.R.Greenlees, D.T.MacPherson. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3155 (1992)
24. M.J.Driver, A.R.Greenlees, W.S.MacLachlan, D.T.MacPherson, A.W.Taylor. *Tetrahedron Lett.*, **33**, 4357 (1992)
25. D.F.Corbett, D.K.Dean, A.R.Greenlees, D.T.MacPherson. *J. Antibiot.*, **48**, 509 (1995)
26. A.W.Taylor, B.J.Costello, P.A.Hunter, W.S.MacLachlan, C.T.Shanks. *J. Antibiot.*, **46**, 486 (1993)
27. A.W.Taylor, D.T.MacPherson. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 5289 (1994)
28. W.S.MacLachlan, S.A.Readshaw. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1735 (1995)
29. D.P.Bonner, W.Mechlinski, C.P.Schaffner. *J. Antibiot.*, **25**, 261 (1972)
30. A.Jarzebski, L.Falkowski, E.Borowski. *J. Antibiot.*, **35**, 220 (1982)
31. M.Slis, B.Cybulska, J.Grzybowska, J.Czub, R.Prasad, E.Borowski. *J. Antibiot.*, **60**, 436 (2007)
32. T.Bruzzese, C.Rimaroli, A.Bonabello, E.Ferrari, M.Signorini. *Eur. J. Med. Chem.*, **31**, 965 (1996)
33. WO 2009004322 (2009)
34. M.N.Preobrazhenskaya, E.N.Olsufyeva, S.E.Solovieva, A.N.Tevyashova, M.I.Reznikova, Y.N.Luzikov, L.P.Terekhova, A.S.Trenin, O.A.Galatenko, I.D.Treshalin, E.P.Mirchink, V.M.Bukhman, H.Sletta, S.B.Zotchev. *J. Med. Chem.*, **52**, 189 (2009)
35. M.N.Preobrazhenskaya, E.N.Olsufyeva, A.N.Tevyashova, S.S.Printsevskaya, S.E.Solovieva, M.I.Reznikova, A.S.Trenin, O.A.Galatenko, I.D.Treshalin, E.R.Pereverzeva, E.P.Mirchink, S.B.Zotchev. *J. Antibiot.*, **63**, 55 (2010)
36. A.N.Tevyashova, S.E.Solovieva, E.N.Olsufyeva, M.N.Preobrazhenskaya. *Farmaceutski Vestnik (Abstracts from the Austrian-German-Hungarian-Italian-Polish-Slovenian 5th Joint Meeting on Medicinal Chemistry)*. Portoroz, Slovenia, 2007. P. 189
37. С.С.Принцевская, Е.Н.Олсуфьева, А.Н.Тевяшова, С.Е.Соловьева, С.Б.Зотчев, М.Н.Преображенская. *Сборник тезисов докладов Всероссийской конференции по органической химии*. ИОХ РАН, Москва, 2009. С. 349
38. В.В.Белахов, Ю.Д.Шенин. *Хим.-фарм. журн.*, **41** (7), 20 (2007)
39. В.В.Белахов, Ю.Д.Шенин, Р.А.Аравийский, Е.Б.Штильбанс. *Антибиотики и химиотерапия*, **41**, 4 (1996)
40. W.Mechlinski, C.P.Schaffner. *J. Antibiot.*, **25**, 256 (1972)
41. V.Paquet, E.M.Carreira. *Org. Lett.*, **8**, 1807 (2006)
42. А.С.Тренин, С.Б.Зотчев, Е.Н.Олсуфьева, А.Н.Тевяшова, С.Е.Соловьева, С.С.Принцевская, О.А.Галатенко, М.Н.Преображенская. *Иммунопатология, аллергология, инфектология (Раздел «Перспективные антимикотики и фунгициды». Труды междисциплинарного микологического форума)*, (2), 2009. С. 155
43. M.Slis, B.Cybulska, J.Mazarski, J.Grzybowska, E.Borowski. *J. Antibiot.*, **57**, 669 (2004)
44. K.Hac-Wydro, P.Dynarowicz-Latka, J.Grzybowska, E.Borowski. *J. Colloid Interface Sci.*, **287**, 476 (2005)
45. J.Grzybowska, P.Sowiński, J.Gumieniak, T.Zieniawa, E.Borowski. *J. Antibiot.*, **50**, 709 (1997)
46. J.Szlinder-Richert, B.Cybulska, J.Grzybowska, E.Borowski, R.Prasad. *Acta Biochem. Pol.*, **47**, 133 (2000)
47. J.J.K.Wright, J.A.Albarella, L.R.Krepski, D.Loebenberg. *J. Antibiot.*, **35**, 911 (1982)
48. C.Rimaroli, T.Bruzzese. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 3012 (1998)
49. N.Kazanah, M.T.Hamann. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **6**, 845 (2005)
50. N.Matsumori, Y.Umegawa, T.Oishi, M.Murata. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 3565 (2005)
51. H.Tsuchikawa, N.Matsushita, N.Matsumori, M.Murata, T.Oishi. *Tetrahedron Lett.*, **47**, 6187 (2006)
52. N.Matsumori, Y.Sawada, M.Murata. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10667 (2005)
53. N.Matsumori, N.Yamaji, S.Matsuoka, T.Oishi, M.Murata. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4180 (2002)
54. Y.Umegawa, N.Matsumori, T.Oishi, M.Murata. *Tetrahedron Lett.*, **48**, 3393 (2007)
55. R.B.Silverman. *Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. Elsevier; Academic Press, San Diego, 2004
56. R.Falk, A.J.Domb, I.Polacheck. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 1975 (1999)
57. T.Ehrenfreund-Kleinman, T.Azzam, R.Falk, I.Polacheck, J.Golenser, A.J.Domb. *Biomaterials*, **23**, 1327 (2002)
58. M.Sokolsky-Papkov, A.J.Domb, J.Golenser. *Biomacromolecules*, **7**, 1529 (2006)
59. T.Ehrenfreund-Kleinman, J.Golenser, A.J.Domb. *Biomaterials*, **25**, 3049 (2004)
60. M.Sedlák, M.Pravda, F.Staud, L.Kubicová, K.Týčová, K.Ventura. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 4069 (2007)
61. M.Sedlák, M.Pravda, L.Kubicová, P.Mikulčíková, K.Ventura. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 2554 (2007)
62. M.Sedlák, P.Drabina, E.Bílková, P.Šimůnek, V.Buchta. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 2952 (2008)

CHEMICAL MODIFICATION OF ANTIFUNGAL MACROLIDE POLYENE ANTIBIOTICS

S.E.Solovieva, E.N.Olsufyeva, M.N.Preobrazhenskaya

G.F.Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences

11, Ul. B.Pirogovskaya, 119021 Moscow, Russian Federation, Fax +7(499)245–0295

The achievements of the last 15 years in the field of preparation methods of polyene antibiotics (amphotericin B, partricin A, etc.) and the «structure–activity» relationship are surveyed. The modern approaches that combine chemical synthesis and genetic engineering techniques are considered. The attention is focused on the development of semisynthetic antifungal agents that are active against pathogens resistant to chemotherapy and that have better therapeutic index. The most recent results on the mechanisms of action of polyenes are considered.

Bibliography — 62 references.

Received 19th February 2010