



УДК 577.181.4

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА ИНА-5812

© 2016 г. О. А. Лапчинская\*, Г. С. Катруха\*, Е. Г. Гладких\*, В. В. Куляева\*, П. В. Кудан\*\*, А. П. Топольян\*\*\*, В. А. Алфёрова\*, В. В. Погожева\*, М. А. Суконников\*\*\*\*, Е. А. Рогожин\*, \*\*\*, И. А. Прохоренко\*, \*\*\*, В. А. Брылёв\*\*\*, А. М. Королёв\*, М. С. Слюндина\*, \*\*\*\*\*, Р. С. Борисов\*\*\*\*\*, \*\*\*\*\*, М. В. Серебрякова\*\*\*\*\*, М. В. Шувалов\*, \*\*\*\*, А. Л. Ксенофонов\*\*\*\*\*, Л. Г. Стоянова\*\*\*\*\*, И. А. Остерман\*\*\*\*\*, \*\*\*\*\*, А. А. Формановский\*, В. Н. Ташлицкий\*\*\*\*, Л. А. Баратова\*\*\*\*\*, А. В. Тимофеева\*\*\*\*\*, А. П. Тюрин #, \*, \*\*

\* Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, 11

\*\* Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии, 109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14

\*\*\* Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\*\*\* Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

\*\*\*\*\* Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинский пр-т, 29

\*\*\*\*\* Факультет физико-математических и естественных наук Российского университета дружбы народов, 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 3

\*\*\*\*\* Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

\*\*\*\*\* Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Поступила в редакцию 10.06.2016 г.

Принята к печати 07.07.2016 г.

Из культуры актиномицета *Streptomyces roseoflavus* ИНА-Ас-5812 выделен концентрат пептидной природы с антибактериальной активностью, из которого методом обращенно-фазовой ВЭЖХ получены 6 фракций. С помощью масс-спектрометрических методов MALDI-TOF и ESI-MS<sup>n</sup> высокого разрешения установлено, что основными компонентами антибиотического комплекса являются несколько близких структурных аналогов, предположительно, (глико)пептидной природы. Фракция, содержащая индивидуальный компонент с массой 1845.788 Да, была охарактеризована спектрами поглощения и флуоресценции, аминокислотным анализом и дериватизацией трис(2,6-диметоксифенил)метильным катионом. Исследована активность фракций по отношению к патогенным микроорганизмам. Полученные данные позволяют предположить, что компонент ИНА-5812-2, относящийся к классу глико- или липогликопептидов, весьма перспективен для дальнейшего изучения, наряду с другими активными компонентами антибиотического комплекса ИНА-5812.

**Ключевые слова:** микробные метаболиты, антибиотики, гликопептидные, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия высокого разрешения.

DOI: 10.7868/S0132342316060075

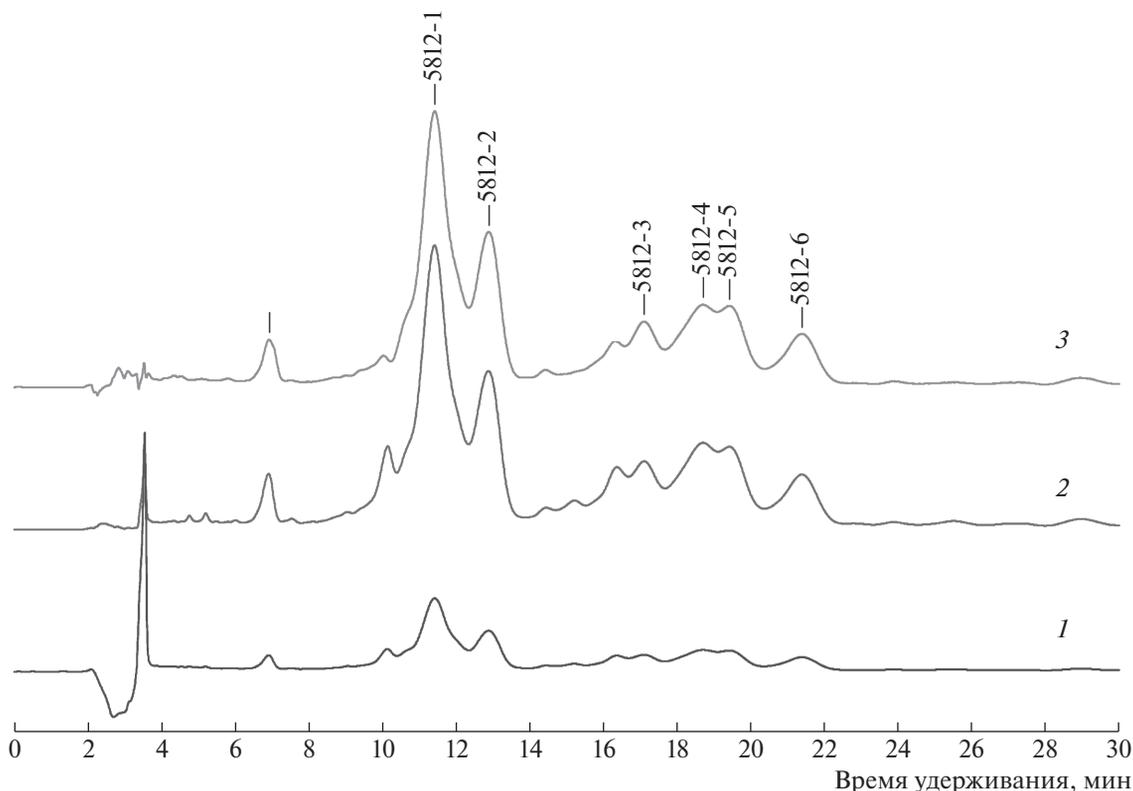
### ВВЕДЕНИЕ

Природные соединения, даже при современных развитых методах синтетической химии и

Сокращения: КОЕ – колониеобразующая единица, оф-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высоко эффективная жидкостная хроматография, DEAE – диэтиламиноэтил, HRESI-MS – масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией электрораспылением, MALDI-TOF – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной ионизацией, TFA – трифторуксусная кислота.

# Автор для связи (эл. почта: ap2rin@gmail.com).

высокопроизводительного скрининга, продолжают играть ключевую роль в разработке антибактериальных и противоопухолевых средств [1–3]. В частности, следует отметить исследования последних лет в отношении микробных вторичных метаболитов, которые позволили обнаружить и установить структуру оригинального нерибосомального пептида тейксобактина [4]. Настоящая работа посвящена исследованию компонентного состава антибиотического комплекса, продуцируемого штаммом актиномицета *Streptomyces ro-*



**Рис. 1.** Разделение компонентов антибиотического комплекса ИНА-5812 в оптимизированных изократических условиях (см. Эксп. часть); приведены профили с детекцией поглощения при 214 (1), 260 (2) и 363 нм (3), обозначены номера собранных фракций.

*seoflavus* ИНА-Ас-5812. По данным предварительного изучения, его компоненты также имеют пептидную природу и проявляют антибактериальную активность [5].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антибиотический комплекс из культуры *S. ro-seoflavus* ИНА-Ас-5812 получен в результате сорбции на гидрофобной смоле Амберлит ХАД-2 с последующим фракционированием с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе и обращенно-фазовой хроматографии на сорбенте С-18. Он представляет собой смесь нескольких компонентов пептидной природы с голубой флуоресценцией, офВЭЖХ-анализ которой представляет значительные трудности.

Оптимизация условий офВЭЖХ-хроматографического разделения компонентов антибиотического комплекса ИНА-5812 показала, что наилучшее разрешение пиков наблюдается в изократических условиях при концентрации ацетонитрила в подвижной фазе 30% (по объему) с использованием в качестве буферной добавки 0.05% TFA, pH 2.4 (рис. 1).

Видно, что даже в оптимизированных условиях в аналитическом масштабе не удается достичь разделения смеси на индивидуальные компоненты, что свидетельствует об их химическом подобии. Шесть наиболее интенсивных пиков (при детекции на 363 нм, рис. 1) были накоплены при разделении 1 мг исходной смеси (10 раз по 0.1 мг) в найденных условиях изократического элюирования. Для собранных фракций был исследован спектр антимикробной активности (табл. 1).

Данные таблицы свидетельствуют, что исходная субстанция и выделенные фракции проявляют антибактериальную активность как в отношении грамположительной бактерии *Micrococcus flavus* (диаметр зоны подавления роста составил от 8 до 19 мм), так и в отношении грамотрицательной *Proteus vulgaris* (диаметр зоны подавления роста 6–15 мм), но все компоненты, как и их смесь, не обладали антифунгальной активностью по отношению к условно-патогенным плесневому грибу *Aspergillus niger* и к дрожжам *Candida albicans*. Для сравнения приведены данные по подавлению патогенов контрольными антибактериальными (ристомин, левомицетин) и противогрибковыми (нистатин) антибиотиками. Фракции ИНА-5812 № 1, 2 и 4 обладали наибольшей антибактериальной активностью.

**Таблица 1.** Антимикробная активность исходной субстанции комплексного антибиотика ИНА-5812 и его отдельных фракций (рис. 1)

Фракция (рис. 1, кривая 3)	Диаметр зоны подавления роста, мм			
	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>
1	18	10	0	0
2	14	6	0	0
3	8	0	0	0
4	12	6	0	0
5	8	7	0	0
6	8	7	0	0
Антибиотический комплекс ИНА-5812	19	15	0	0
Растворитель (этанол 50%)	0	0	0	0
Ристомидин	19	—	—	—
Левомецетин	—	25	—	—
Нистатин	—	—	12	14

Для проверки возможности ингибирования антибиотическим комплексом бактериального биосинтеза белка была использована система, основанная на двойном флуоресцентном репортерном белке [6]. Однако даже при использовании гиперчувствительного штамма *E. coli* JW5503 с инактивированной системой эффлюкса (*TolC*) [7] в качестве носителя репортерной плазмиды, чувствительной к ингибированию рибосом, не наблюдалось ни ингибирования роста, ни индукции репортера.

Фракции, выделенные с помощью оФВЭЖХ, были изучены методами масс-спектрометрии MALDI-TOF и HRESI-MS для определения компонентного состава (табл. 2).

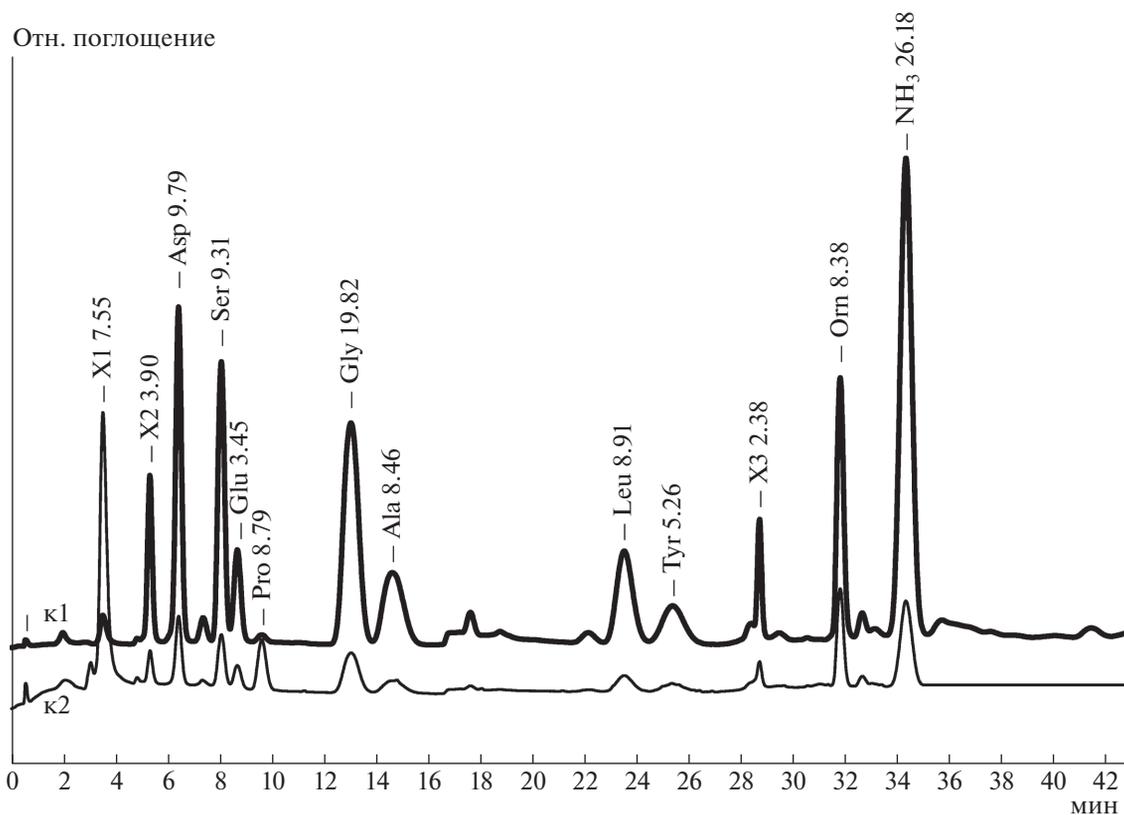
Из полученных данных видно, что антибиотический комплекс состоит из нескольких основных компонентов близкой массы (1714–1992 Да). Моноизотопные массы отдельных компонентов были уточнены с помощью высокоточной масс-спектрометрии (HRESI-MS). Отметим, что фракция ИНА-5812-2 состоит, вероятно, только из одного компонента. Заметная антибактериальная активность сделала эту фракцию первоочередным объектом для дальнейшего изучения. Была проведена дополнительная наработка индивидуального компонента ИНА-5812-2 в количествах, достаточных для биохимических экспериментов.

Для характеристики аминокислотного состава компонент ИНА-5812-2 был подвергнут кислотному гидролизу, и полученная смесь аминокислот была проанализирована (рис. 2). Установлено наличие в составе молекулы по 1 остатку аспарагиновой кислоты (или аспарагина), серина, пролина, аланина, лейцина, тирозина и орнитина, 2 остатков глицина и трех неидентифицируемых

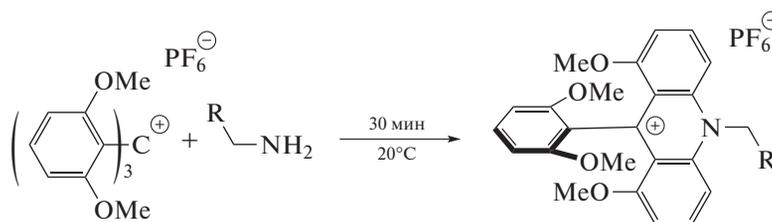
нингидрин-положительных соединений с максимумами поглощения при 440 нм (пик X1 на хроматограмме) и при 570 нм (X2 и X3).

**Таблица 2.** Результаты, полученные с помощью методов MALDI-TOF (А) и HRESI-MS (Б)

Номер фракции (рис. 1, 3)	А. Наблюдаемые ионы $[M + H]^+$ в порядке убывания интенсивности пиков, Да	Б. Уточненные массы компонентов, Да
	1	1917.6
1931.7		
1903.0		
2	1846.7	1845.788
3	1785.5	1784.783
	1799.5	
	1931.5	
4	1931.4	1930.840
	1714.4	
	1945.4	
	1799.5	
5	1860.4	1713.745
	1714.4	
6	1945.4	1798.798
	1860.4	
	1728.4	
6	1992.4	1859.804
	1727.760	



**Рис. 2.** Аминокислотный анализ гидролизата компонента ИНА-5812-2; детекция поглощения при 440 нм (к1) и при 570 нм (к2). Обозначены пики, соответствующие стандартным аминокислотам, аммиаку и неидентифицированным аминокислотам (X1, X2, X3).



**Рис. 3.** Схема дериватизация первичных аминов трис(2,6-диметоксифенил)метильным катионом [8, 9].

С целью дальнейшей характеристики компонент ИНА-5812-2 был подвергнут дериватизации избытком трис(2,6-диметоксифенил)метильного катиона в среде вода–этанол. В этих условиях в первую очередь подвергаются модификации первичные амины при первичном атоме углерода, превращаясь в тритил/акридиниевый катион (рис. 3) [8, 9]. Реакция дала один основной продукт, который может быть выделен с помощью ВЭЖХ. Масса полученного производного 2204.8 Да (рис. 4), т.е., инкремент массы по сравнению с исходной молекулой составил, как и ожидалось, составил 359 Да. Предположительно, дериватиза-

ция происходит по боковой аминогруппе орнитина – незатрудненной первичной аминогруппе.

В спектрах поглощения и флуоресценции компонента ИНА-5812-2 (рис. 5) длинноволновое поглощение ( $\lambda_{\max}$  364 нм) и эмиссия ( $\lambda_{\max}$  448 нм) напоминают спектральные параметры липопептидного антибиотика даптомицина [10], которые обусловлены присутствием в его составе флуоресцентной аминокислоты кинуренина. Это позволяет предположить наличие в молекуле компонента ИНА-5812-2 кинуренина или его производного. Молекула даптомицина, как и молекула компонента ИНА-5812-2, содержит один остаток

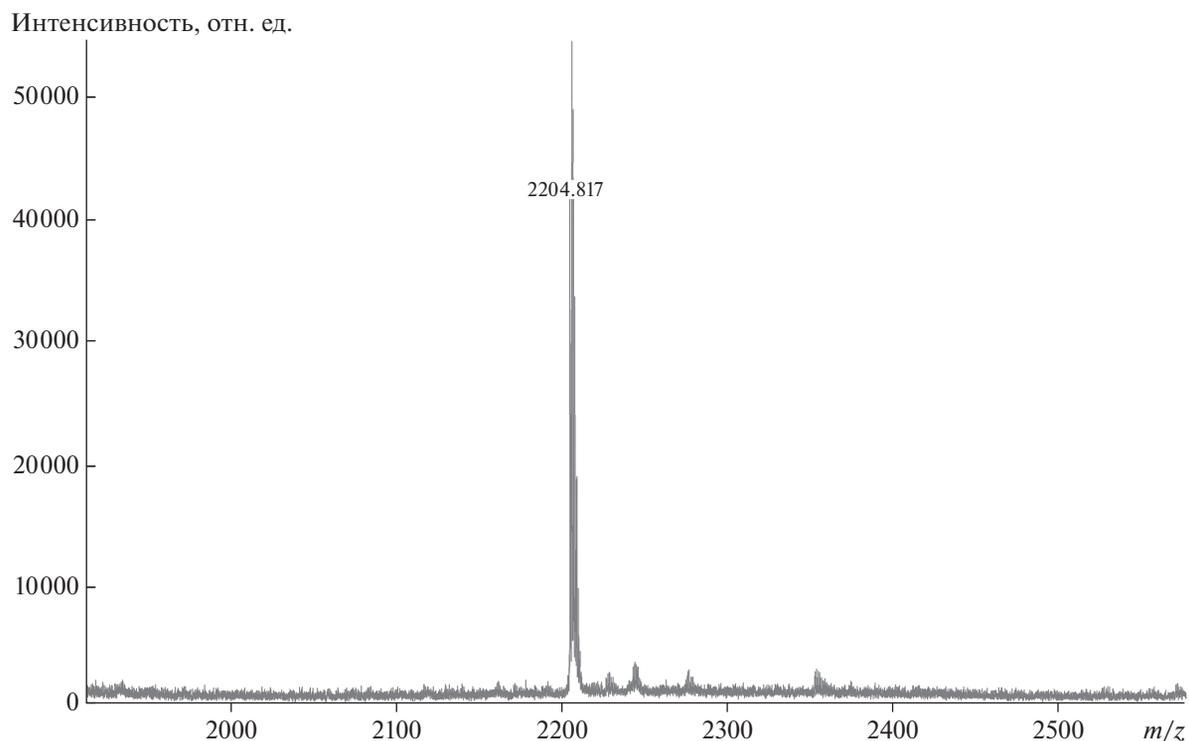


Рис. 4. MALDI-масс-спектр аддукта ИНА-5812-2 с трис(2,6-диметоксифенил)метильным катионом.

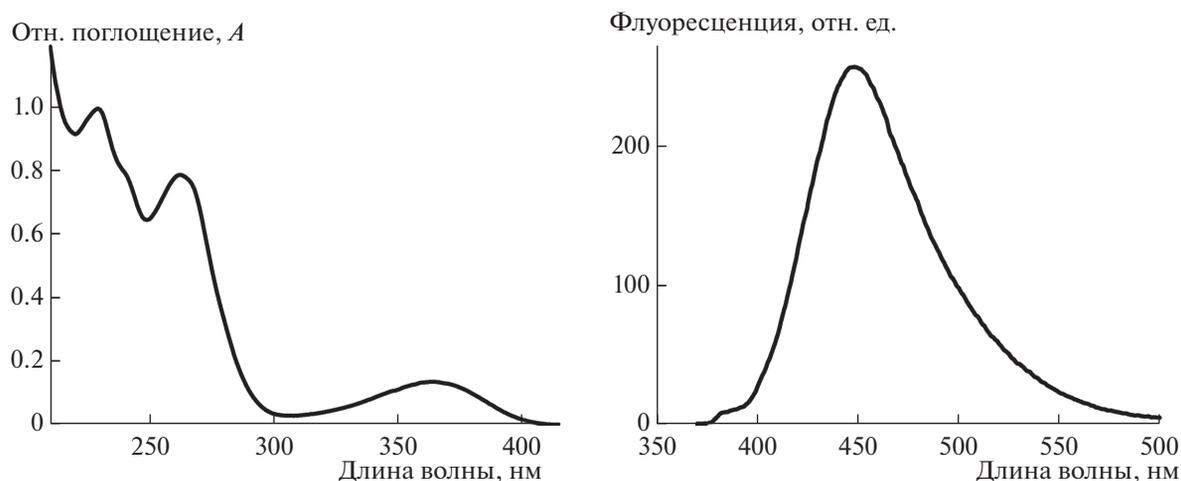


Рис. 5. Спектры поглощения (слева) и флуоресценции (справа) в УФ/видимой области компонента ИНА-5812-2 (рис. 1).

орнитина, но по массе даптомицин (1619.7 Да) уступает любому из компонентов ИНА-5812.

Компоненты ИНА-5812 были исследованы с помощью фрагментации ионов в источнике и tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения в сочетании с активацией соударением (АС) и ионизацией электрораспылением. Сравнение масс-спектров продуктов фрагментации ионов, соответ-

ствующих основным компонентам в источнике ионов, подтвердило структурное сходство компонентов антибиотического комплекса (данные не приведены).

На рис. 6 представлен масс-спектр продуктов фрагментации компонента ИНА-5812-2, дипротонированный ион которого при молекулярной массе соединения 1845.788 Да, имеет соотношение

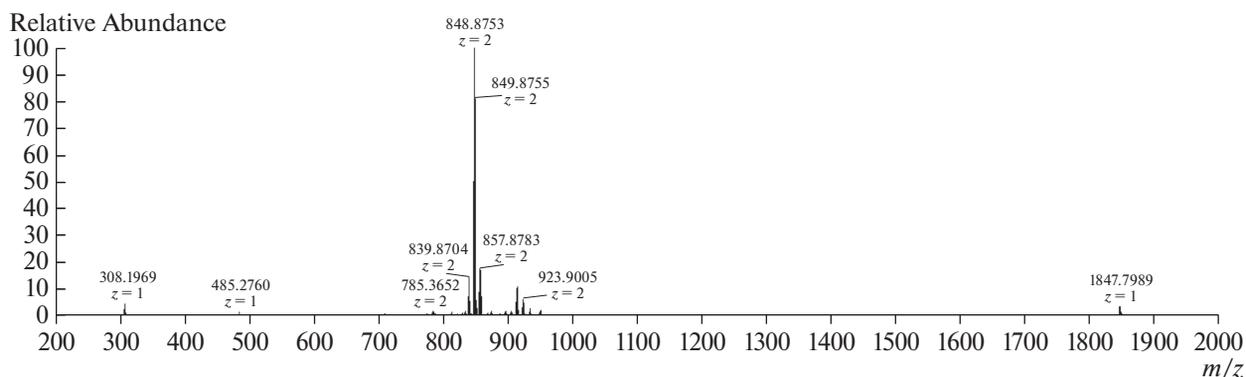


Рис. 6. Масс-спектр продуктов фрагментации псевдомолекулярного иона вещества ИНА-5812-2 в источнике ионизации.

масса/заряд 923.902 Да. Как видно из спектра, основными направлениями фрагментации является элиминирование нейтрального фрагмента, точная масса которого соответствует остатку пентозы  $C_5H_8O_4$ , а также потеря воды и образование нескольких однозарядных ионов малой массы. Варьирование энергии соударения не позволяет добиться существенного увеличения интенсивности фрагментов средней массы для извлечения структурной информации при росте интенсивности фрагментов малой массы. Спектры фрагментации компонентов в режимах АС (в линейной ионной ловушке) и высокоэнергетической АС (в камере соударений высокой энергии) не имеют существенных отличий от спектров фрагментации в источнике. Следует отметить, что образование двухзарядных протонированных ионов и нетипично малое количество фрагментов в спектре фрагментации характерно для всех основных компонентов смеси ИНА-5812.

Можно предположить, что наличие в спектрах фрагментации компонентов фрагментов малой массы при практически полном отсутствии фрагментов средней массы свидетельствует о циклическом строении основной части молекулы (что весьма характерно для антибиотиков пептидной природы).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наличие в молекуле компонента ИНА-5812-2 остатка пентозы и аминокислот свидетельствует о его гликопептидной природе. Однако, в отличие от известных липопептидных (даптомицин), гликопептидных (ванкомицин, эремицин, ристомицин), липогликопептидных (рамoplanin, тейкопланин А2) антибиотиков, которые активны лишь в отношении грамположительных бактерий, компоненты комплекса ИНА-5812 проявляют активность и в отношении грамотрица-

тельных бактерий. Липопептидные антибиотики группы полимиксина, активные в отношении грамотрицательных бактерий, характеризуются наличием большого количества остатков 2,4-диаминобутановой кислоты (Dab), что не совпадает с результатами аминокислотного анализа и химической дериватизации компонента ИНА-5812-2. Кроме того, вышеперечисленные (липо)гликопептидные антибиотики характеризуются наличием в их молекулах остатков сахаров-гексоз; лишь в молекуле ристомицина один из пяти углеводных остатков является пентозой [11, 12].

Поиск антибиотиков с набором структурных признаков, аналогичных определенному для компонента ИНА-5812-2, не дал результатов, что, принимая во внимание широкий антибактериальный спектр действия, делает исключительно перспективным дальнейшее исследование отдельных компонентов антибиотического комплекса ИНА-5812 и установление их структуры. В настоящее время ведется разработка методов дальнейшей характеристики компонентов и их выделения в индивидуальном виде в количествах, достаточных для исследования с помощью метода ЯМР.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** В работе использовали: ацетат аммония, трифторуксусная кислота (ТФА), этанол, метанол, ацетонитрил ("Panreac", Испания), ацетон, о.с.ч. "9-5" "Химмед" (Россия); н.-бутанол, ч.д.а., "АО РЕАХИМ" (Россия), глюкоза (ООО "БиоХимФарм", Россия), пептон (ОАО Биомед им. И.И. Мечникова, Россия), агар (Anhui Suntan Chemical Co., Ltd, Китай). Реагенты готовили, используя воду высшей степени очистки (18.1 МОм/см), полученную на установке Milli-Q®Plus "Millipore" (Франция).

**Микроорганизмы, среды, условия культивирования.** Микроорганизм-продуцент *Streptomyces roseoflavus* ИНА-Ас-5812, питательные среды и условия культивирования штамма-продуцента описаны ранее [5, 13].

**Получение исследуемого образца.** Для выделения активных компонентов комплексного антибиотика из культуры центрифугированием отделяли мицелий, и полученный нативный раствор объемом 5 л (рН 6.8–7.3) пропускали через колонку с 500 мл смолы Амберлит XAD-2 (Serva, Германия) при скорости 120 мл/см<sup>2</sup> ч. По окончании сорбции колонку промывали дистиллированной водой (1 л) и элюировали антибиотический комплекс со смолы смесью ацетон–1-бутанол–вода (1 : 1 : 1), подкисленной соляной кислотой до рН 3.0. Органические растворители элюата упаривали в вакууме и из водного остатка компоненты антибиотика экстрагировали 1-бутанолом, упаривали, растворяли в воде и пропускали через колонку с DEAE-Сефадексом (в ОН-форме; 100 г). Активные фракции объединяли, удаляли растворитель в вакууме, и антибиотик осаждали из 50% водно-спиртового раствора ацетоном. Полученный сырец антибиотика хроматографировали на колонке с обращенно-фазным сорбентом С-18 с элюцией в градиенте концентрации ацетонитрила (10 → 50%) в воде и после упаривания получали препарат в виде белого порошка, хорошо растворимого в воде, метаноле, ограниченно – в этаноле и нерастворимого в других органических растворителях. Из 5 л нативного раствора получали 10 мг вещества; активность препарата в отношении *Bacillus subtilis* 6633 АТСС составляла 3000 ед./мг. ТСХ анализ выполняли на пластинках Kieselgel 60 (Merck) в системе 1-пропанол–вода (7 : 2). Компоненты антибиотика проявляются в виде нескольких пятен с голубой флуоресценцией при облучении лампой 360 нм.

**Фракционирование антибиотического комплекса ИНА-5812 методом оФВЭЖХ.** Использовался жидкостной хроматограф Agilent 1200, состоящий из четырехканального градиентного насоса с дегазатором, автосамплера, колоночного термостата и диодно-матричного детектора. Разделение осуществляли с применением колонки Luna C18(2) 4.6 × 250 мм (5 мкм) производства Phenomenex (США) при скорости потока 1 мл/мин и температуре колонки 25°C. Сбор и обработка данных осуществлялась программами ChemStation B.04.03 и AutoChrome 2012 [14]. Испытуемый раствор готовили, растворяя навеску сухого образца в смеси метанол/вода (1 : 3) до концентрации 1 мг/мл. В тестовых элюентах для регуляции рН использовали 0.05% раствор TFA (рН 2.4) или

10 мМ раствор ацетата аммония (рН 7.0). Оптимизацию условий элюирования проводили на основе разработанных ранее методик для разделения сложных органических соединений с использованием программы AutoChrome 2012 [14]. Оптимизированный элюент для изократического разделения компонентов комплекса ИНА-5812 содержал смесь ацетонитрил–вода (30/70%) с добавкой 0.05% TFA.

**Спектры поглощения и флуоресценции.** Электронный спектр поглощения компонента ИНА-5812-2 регистрировали в 96% этаноле на спектрофотометре Varian Cary 100;  $\lambda_{\max}$ , нм ( $\epsilon$ , М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>): 262 (50000), 364 (8000); спектр флуоресценции – в концентрации  $8 \times 10^{-6}$  М,  $\lambda_{\text{возб}}$  350 нм.

**Дериватизацию трис(2,6-диметоксифенил)метильным катионом** проводили в водно-этанольном растворе в присутствии триэтиламина действием раствора гексафторфосфата трис(2,6-диметоксифенил)карбения в ацетонитриле [8, 9]. Раствор образца в смеси с раствором матрицы (2,5-дигидроксibenзойная кислота) наносили в лунку мишени (MTP 384 massive target gold plate T, Bruker Daltonics, Германия), высушивали на воздухе и регистрировали MALDI-масс-спектры с использованием времяпролетного масс-спектрометра Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия) в режиме регистрации положительно заряженных ионов с применением рефлектрона.

**Аминокислотный анализ** выполняли на аминокислотном анализаторе L-8800 (Hitachi, Ltd.) по стандартной методике [15].

**Подготовку образцов** для исследования выделенных фракций методом MALDI-TOF проводили по методике, описанной ранее [16].

**Исследование антибиотической смеси ИНА-5812 методом высокоточной масс-спектрометрии HRESI-MS.** Использовали тандемный масс-спектрометр высокого разрешения Thermo Scientific Orbitrap Elite ETD (ФРГ) с источником ионизации ESI в сочетании с жидкостным хроматографом Agilent 1200, состоящим из четырехканального градиентного насоса с дегазатором, автосамплера и колоночного термостата. Разделение осуществляли на колонке Agilent ZORBAX Eclipse XDB C18 2.1 × 100 мм (3 мкм) при температуре колонки 35°C и скорости потока 0.5 мл/мин. Для увеличения достоверности компонентного анализа использовали несколько форм градиента в системе вода-ацетонитрил. В качестве буферной добавки использовали 0.1% TFA. Спектры фрагментации компонентов регистрировали в режиме фрагментации в источнике. Ошибка измерения масс ионов составляла не более 1 м.д.

**Определение антимикробного спектра действия** осуществляли методом диффузии в агар-агар на чашках Петри с тест-культурой [17]. На бумажные диски наносили по 10 мкл раствора каждого исследуемого образца, растворенного в 50% водном этаноле. В качестве тест-культур использовали представителей разных групп тест-организмов: из грамположительных бактерий *M. flavus* NCTC 8340, грамотрицательных — *P. vulgaris* 206 и из микромицетов — плесень *A. niger* INA 00760 и дрожжи — *C. albicans* INA 00763. Бактерии *M. flavus* и *P. vulgaris* выращивали на органической среде МПА, дрожжи и плесени на среде Сабуро. Для получения газона с тест-культурой суточные культуры бактерий и грибов, выращенные в пробирках на скошенных агаровых средах вышеуказанного состава, ресуспендировали в физиологическом растворе в количестве 1 млрд/мл (по бактериальному стандарту мутности), доводили до посевной дозы ( $\sim 10^5$  КОЕ/мл) в одну чашку Петри при глубинном культивировании [18]. В качестве стандарта на диски наносили коммерческие препараты антибиотиков: нистатин (Sigma) в количестве 20 мкг/диск в опытах с *A. niger* и *C. albicans*, ристомицин и левомецетин (HiMedia Laboratories Limited, Mumbai) в опытах с *M. flavus* и *P. vulgaris* (по 30 мкг/диск) соответственно. Диски, пропитанные исследуемыми образцами и препаратами антибиотиков, накладывали на засеянный тест-культурами газон в чашках Петри, затем инкубировали в термостатах в течение 24 ч при 37°C с *M. flavus* и *P. vulgaris*, а при 28°C в течение 36 ч — с *A. niger* и *C. albicans*. Антимикробную активность образцов устанавливали по диаметру зоны подавления роста (в мм) тест-микроорганизмов на поверхности газона в чашках Петри.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование частично поддержано бюджетным финансированием темы № 007 “Выделение и изучение физико-химических свойств новых антимикробных и противоопухолевых антибиотиков микробного происхождения” в Институте по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе. Проверка ингибирования биосинтеза белка осуществлена при поддержке гранта РНФ 14-24-00061. Авторы выражают благодарность В.А. Коршуну за полезное обсуждение.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shen B. // Cell. 2015. V. 163. P. 1297–1300.
2. Newman D.J., Cragg G.M. // J. Nat. Prod. 2016. V. 79. P. 629–661.
3. Brown E.D., Wright G.D. // Nature. 2016. V. 529. P. 336–343.
4. Ling L.L., Schneider T., Peoples A.J., Spoering A.L., Engels I., Conlon B.P., Mueller A., Schaäberle T.F., Hughes D.E., Epstein S., et al. // Nature. 2015. V. 517. P. 455–459.
5. Лапчинская О.А., Катруха Г.С., Терехова Л.П., Куляева В.В., Гладких Е.Г., Погожева В.В., Федорова Г.Б., Мирчинк Е.П., Макарова М.О., Трещалин И.Д., Исакова Е.Б., Пономаренко В.И., Переверзева Э.Р., Абрамова Е.А., Токарева Н.Л. // Патент РФ 2572341. 2016.
6. Osterman I.A., Prokhorova I.V., Sysyov V.O., Boykova Y.V., Efremenkova O.V., Svetlov M.S., Kolb V.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. // Antimicrob. Agents Chemother. 2012. V. 56. P. 1774–1783.
7. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. // Mol. Syst. Biol. 2006. V. 2. 2:2006.0008.
8. Топольян А.П., Стрижевская Д.А., Слюндина М.С., Беляева М.А., Иванова О.М., Коршун В.А., Устинов А.В., Михура И.В., Формановский А.А., Борисов Р.С. // Масс-спектрометрия. 2015. Т. 12. С. 253–258.
9. Топольян А.П., Беляева М.А., Быков Е.Е., Кудан П.В., Рогожин Е.А., Стрижевская Д.А., Иванова О.М., Устинов А.В., Михура И.В., Прохоренко И.А., Коршун В.А., Формановский А.А. // Acta Naturae. 2016. Т. 8. №3. С. 100–107.
10. Lakey J.H., Ptak M. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 4639–4645.
11. Nicolaou K.C., Boddy C.N.C., Bräse S., Winssinger N. // Angew. Chem. Int. Ed. 1999. V. 38. P. 2096–2152.
12. Kahne D., Leimkuhler C., Lu W., Walsh C. // Chem. Rev. 2005. V. 105. P. 425–448.
13. Тимофеева А.В., Лапчинская О.А., Степашина Е.А., Гладких Е.Г., Погожева В.В., Баратова Л.А., Катруха Г.С. // Биотехнология. 2012. № 4. С. 45–51.
14. Ташлицкий В.Н., Царев Д.А., Казьмина Э.М. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1. С. 38–44.
15. Spackman D.H., Stein W.H., Moore S. // Anal. Chem. 1958. V. 30. P. 1190–1206.
16. Тимофеева А.В., Серебрякова М.В., Баратова Л.А., Катруха Г.С. // Биотехнология. 2009. № 1. С. 90–95.
17. Isaacson D.M. // In: Industrial microbiotechnology. Ed. by G. Kirschbaum. Washington, D.C.: Am. Soc. Microbiol. 1986. P. 411–418.
18. Устюгова Е.А., Тимофеева А.В., Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И., Катруха Г.С. // Прикл. Биохим. Микробиол. 2012. Т. 48. С. 618–625.

## Investigation of the Antibiotic Complex INA-5812

O. A. Lapchinskaya\*, G. S. Katrukha\*, E. G. Gladkikh\*, V. V. Kulyaeva\*, P. V. Coodan\*\*,  
 A. P. Topolyan\*\*\*, V. A. Alferova\*, V. V. Pogozeva\*, M. A. Sukonnikov\*\*\*\*, E. A. Rogozhin\*, \*\*\*,  
 I. A. Prokhorenko\*, \*\*\*, V. A. Brylev\*\*\*, A. M. Korolev\*, M. S. Slyundina\*, \*\*\*\*\*,  
 R. S. Borisov\*\*\*\*\*, \*\*\*\*\*, M. V. Serebryakova\*\*\*\*\*, M. V. Shuvalov\*, \*\*\*\*\*,  
 A. L. Ksenofontov\*\*\*\*\*, L. G. Stoyanova\*\*\*\*\*, I. A. Osterman\*\*\*\*, \*\*\*\*\*,  
 A. A. Formanovsky \*\*\*, V. N. Tashlitsky\*\*\*\*, L. A. Baratova\*\*\*\*\*,  
 A. V. Timofeeva\*\*\*\*\*, A. P. Tyurin\*, \*\*\*, #

#E-mail: ap2rin@gmail.com

\*G.F. Gause Institute for New Antibiotics, ul. Bol'shaya Pirogovskaya, 11, Moscow, 119021, Russia

\*\*Scientific Research Institute of Nutrition, Ustyinsky proezd, 2/14, Moscow, 109240, Russia

\*\*\*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
 ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, GSP-7, Moscow, 117997, Russia

\*\*\*\*Department of Chemistry, Moscow State University, Leninskiye Gory, 1, building 3, Moscow, 119991, Russia

\*\*\*\*\*A.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis,  
 Leninsky Prospekt, 29, GSP-1, Moscow, 119991, Russia

\*\*\*\*\*Faculty of Physics, Mathematics and Natural Sciences RUDN University,  
 115419, Moscow, ul. Ordzhonikidze, 3

\*\*\*\*\*A.N. Belozersky Institute for Physicochemical Biology, Moscow State University,  
 Leninskiye Gory, 1, Building 40, Moscow, 119992, Russia

\*\*\*\*\*Department of Biology, Moscow State University,  
 Leninskiye Gory, 1, building 12, Moscow, 119991, Russia

The concentrate with antimicrobial activity was isolated from the culture broth of *Streptomyces roseoflavus* INA-Ac-5812, further fractionation by reversed-phase HPLC gave 6 fractions. By using precision mass-spectrometry methods MALDI-TOF and ESI-MS<sup>n</sup> it was established that the main components of complex antibiotic are several closely related compounds, presumably of glycopeptide nature. Fraction containing individual component with mass 1845.788 Da was characterized by UV/Vis-spectrum and fluorescence spectrum, amino acid analysis and derivatization with tris(2,6-dimethoxyphenyl)methyl cation. The activity of fractions against pathogenic microbes was studied. The obtained results prompting suggest that the antibiotic complex INA-5812 are new, very promising for further study, type of glyco- or lipoglycopeptide antibiotic.

*Keywords: microbial metabolites, glycopeptide antibiotics, high performance liquid chromatography, high-resolution mass spectrometry*