



**GDAŃSK UNIVERSITY
OF TECHNOLOGY**
FACULTY OF CHEMISTRY



Imię i nazwisko autora rozprawy: Katarzyna Anna Szwarc
Dyscyplina naukowa: Chemia Organiczna

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Wybrane aspekty chemii antybiotyków przeciwgrzybowych z grupy wielkopierścieniowych makrolidów polienowych.

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Selected aspects of the chemistry of antifungal antibiotics from the group of large ring polyene macrolides.

Promotor
prof. dr hab. inż. Ryszard Andruszkiewicz

Gdańsk, rok 2016

Pracę dedykuję pamięci

dr hab. inż. Jana Pawlaka

oraz

prof. dr inż. Edwarda Borowskiego,

*dzięki którym podjęłam wyzwanie pracy naukowej
w dziedzinie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego,
profesorom, którzy mnie prowadzili i inspirowali.*

Za okazaną pomoc w ukończeniu pracy,

dobrze rady, otuchę i nieustanną motywację dziękuję

prof. dr hab. inż. Ryszardowi Andruszkiewiczowi

i

dr inż. Pawłowi Sowińskiemu

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI	4
1. WPROWADZENIE	5
1. 1. Znaczenie techniki NMR w podjętych badaniach strukturalnych.....	6
1. 2. Budowa makrolidów polienowych.....	7
1. 3. Proces biosyntezy a struktura makrolidów polienowych	7
2. NYSTATYNA A ₁	10
2. 1. Dotychczasowy stan wiedzy o nystatynie A ₁	10
2. 1. 1. Charakterystyka kompleksu antybiotycznego Nystatyna	10
2. 1. 2. Analiza strukturalna nystatyny A ₁	12
2. 1. 2. 1. Konstytucja nystatyny A ₁	12
2. 1. 2. 2. Stereochemia nystatyny A ₁	13
2. 1. 3. Wpływ uwarunkowań biogenetycznych na strukturę nystatyny A ₁	18
2. 1. 4. Tetraeno-dienowy chromofor a konformacja cząsteczki nystatyny A ₁	22
3. KANDYCYDYNA D I LEWORYNA A ₁	25
3. 1. Dotychczasowy stan wiedzy o kandycydynie D	25
3. 2. Dotychczasowy stan wiedzy o leworynie A ₁	29
4. CEL I ZAKRES BADAŃ.....	31
5. WYNIKI I WNIOSKI.....	33
5. 1. Reakcja transestryfikacji nystatyny A ₁ i powstawanie jej izomeru, izo-nystatyny A ₁	33
5. 2. Stereostruktura kandycydyny D	72
5. 3. Struktura i stereostruktura leworyny A ₁	81
6. PODSUMOWANIE	89
7. WYKAZ LITERATURY.....	90

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

ACP	[ang. <u>a</u> cy <u>l</u> <u>c</u> arrier <u>p</u> rotein] białkowy nośnik grup acylowych wchodzący w skład PKS;
AT	[ang. <u>a</u> cetyl <u>t</u> ransferase] acetylotransferaza, enzym wchodzący w skład PKS;
COSY	[ang. <u>C</u> orrelated <u>S</u> pectroscopy] spektroskopia korelacyjna; ¹ H- ¹ H COSY – dwuwymiarowy eksperyment ¹ H NMR;
DH	[ang. <u>d</u> e <u>h</u> ydratase] dehydrataza, jedna z domen białkowych PKS, modyfikujących łańcuch poliketydowy;
DQF-COSY	[ang. <u>D</u> ouble- <u>Q</u> uantum <u>F</u> iltered <u>C</u> orrelated <u>S</u> pectroscopy] eksperyment COSY z filtracją dwukwantową;
ER	[ang. <u>e</u> noyl <u>r</u> eductase] enoiloreduktaza, jedna z domen białkowych PKS, modyfikujących łańcuch poliketydowy;
HMBC	[ang. <u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>B</u> ond <u>C</u> orrelation] heterojądrowa korelacja przez kilka wiązań chemicznych; ¹ H- ¹³ C HMBC – eksperyment dwuwymiarowy badający sprzężenie atomu węgla i wodoru przez maksymalnie trzy wiązania chemiczne;
HSQC	[ang. <u>H</u> eteronuclear <u>S</u> ingle <u>Q</u> uantum <u>C</u> oherence] heterojądrowa korelacja jednokwantowa; ¹ H- ¹³ C HSQC – eksperyment dwuwymiarowy badający sprzężenie atomu węgla i wodoru przenoszone przez jedno wiązanie chemiczne;
KR	[ang. <u>k</u> etoreductase] ketoreduktaza, jedna z domen białkowych PKS, modyfikujących łańcuch poliketydowy;
KS	[ang. <u>k</u> etos <u>y</u> nthase] ketosyntaza, enzym wchodzący w skład PKS;
LD	[ang. <u>l</u> oading <u>d</u> omain] domena ładująca wchodząca w skład PKS;
LC-MS	[ang. <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography- <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry] chromatografia cieczowa ze spektrometrem masowym;
NMR	[ang. <u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance] Magnetyczny Rezonans Jądrowy;
MDR	[ang. <u>M</u> ulti <u>D</u> rug <u>R</u> esistance] oporność wielolekowa;
MIC	[ang. <u>M</u> inimal <u>I</u> nhibitory <u>C</u> oncentration] najmniejsze stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów;
NOE	[ang. <u>N</u> uclear <u>O</u> verhauser <u>E</u> nhancement] zjawisko jądrowego wzmocnienia Overhausera;
PBS	[ang. <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline] bufor fosforanowy;
PKS	[ang. <u>P</u> oly <u>k</u> etide <u>S</u> ynthase] syntaza poliketydowa;
ppm	[ang. <u>p</u> art <u>p</u> er <u>m</u> illion] 1x10 ⁻⁶ , jednostka przesunięcia chemicznego sygnałów rezonansowych w widmie NMR;
ROE	[ang. <u>R</u> otating - frame <u>O</u> verhauser <u>E</u> nhancement] odmiana efektu NOE;
ROESY	[ang. <u>R</u> otating - frame <u>O</u> verhauser <u>E</u> nhancement <u>S</u> pectroscopy] dwuwymiarowy eksperyment badający efekty ROE;
RP-HPLC	[ang. <u>R</u> eversed <u>P</u> hase <u>H</u> igh- <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography] wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych;
TE	[ang. <u>t</u> hio <u>e</u> sterase] tioesteraza, enzym odpowiadający za hydrolizę wiązania łańcucha węglowego z syntazą PKS oraz laktonizację powstającego pierścienia, jednostka wchodzący w skład PKS;
TLC	[ang. <u>T</u> hin <u>L</u> ayer <u>C</u> hromatography] chromatografia cienkowarstwowa;
UV	[ang. <u>U</u> ltraviolet / <u>U</u> ltraviolet Radiation] promieniowanie w zakresie ultrafioletu;
δ	przesunięcie chemiczne wyrażone w ppm w widmie NMR;
λ	długość fali, w spektroskopii wyrażana w nm;

1. WPROWADZENIE

W odpowiedzi na problemy, z jakimi boryka się współczesna chemoterapia przeciwgrzybicza, trwają intensywne poszukiwania związków, których aktywność jest skierowana przeciwko patogenom grzybowym. Do tej pory nie stworzono leku przeciwgrzybiczego, który wykazywałby dobrą aktywność przeciwgrzybiczą i był jednocześnie nietoksyczny dla pacjenta. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest fakt, że zarówno pacjent, jak i drobnoustroj grzybowy należą do tej samej grupy organizmów eukariotycznych. Bardzo bliskie pokrewieństwo filogenetyczne pomiędzy nimi stwarza ogromne trudności w zidentyfikowaniu celów molekularnych dla działania chemoterapeutyków, które różniłyby się jakościowo w organizmie patogena i pacjenta. Trudności w skutecznej chemoterapii przeciwgrzybowej powiększyły się znacznie w ostatnich dekadach w wyniku pojawienia się zjawiska oporności wielolekowej MDR (ang. *MultiDrug Resistance*) drobnoustrojów grzybowych, związanej z nadekspresją białek błonowych eksportujących chemoterapeutyki z komórki grzyba, nie dopuszczając do osiągnięcia terapeutycznego stężenia leku w komórce.

Makrolidy polienowe (makrolidy, polieny) są dużą grupą antybiotyków, wykazującą największą ilość cech „idealnego” fungicydu. Wyróżnia je wysoka aktywność przeciwgrzybowa, działają na bardzo szerokie spektrum grzybów patogennych, zarówno na drożdżaki jak i grzyby filamentarne, działanie ich ma charakter fungicydowy, a nie fungistatyczny, praktycznie nie indukują oporności specyficznej i w pełni działają na szczepy grzybowe z opornością wielolekową MDR. Posiadają jednak dwie wady: niską biodostępność, wynikającą z braku rozpuszczalności w wodzie oraz raczej niską selektywną toksyczność (tzn. wysoką toksyczność dla zwierząt). Stanowią grupę naturalnych związków chemicznych syntetyzowanych jako produkty peryferyjnego metabolizmu gram-dodatnich bakterii, promieniowców glebowych, należących głównie do rodzaju *Streptomyces*. Bardzo często jeden kompleks antybiotyczny może być wytwarzany przez różne szczepy, co wprowadza nieporozumienia w nazewnictwie kompleksów, jak i ich składników. Związki produkowane w jednym kompleksie są bardzo podobne strukturalnie. Charakteryzuje je ten sam szkielet węglowy, a różnice najczęściej obejmują hydrofilowy fragment cząsteczki. Składniki w zależności od budowy cechuje zróżnicowana aktywność, toksyczność i właściwości fizykochemiczne, co za tym idzie badania strukturalne są konieczne do poszerzenia podstawowej wiedzy na ich temat. Dotychczas wyizolowano i zakwalifikowano do tej grupy ponad dwieście związków naturalnych różniących się budową chemiczną. Budowa chemiczna ok. 60 z nich została w pełni bądź częściowo poznana [1, 2], a ok. 10 produkowanych jest komercyjnie [3].

1. 1. Znaczenie techniki NMR w podjętych badaniach strukturalnych

Większość wyizolowanych preparatów makrolidów polienowych jest w rzeczywistości mieszaniną kilku związków. Trudności w separacji czystych składników kompleksu stanowią poważną barierę w badaniach strukturalnych tych związków i czynią je wyzwaniem nawet dziś. Pierwsze badania strukturalne polienów oparte były o analizę produktów ich degradacji, kolejne wykorzystywały techniki rentgenograficzne. Jednak ze względu na problemy w otrzymywaniu monokryształów technika ta została wykorzystana z powodzeniem jedynie w określeniu struktury (i/lub stereostruktury) zaledwie kilku z nich. Obecnie przez rozwój technik magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), wspomaganych spektrometrią mas czy badaniem widm oscylacyjnych UV-Vis, możliwe jest określenie stereostruktury tych antybiotyków, o stosunkowo dużych ciężarach cząsteczkowych (od ok. 500 Da do ok. 1200 Da), na cząsteczce o nienaruszonym szkielecie węglowym, co czyni pracę znacznie sprawniejszą. Kluczowym krokiem do stworzenia ogólnej metody wykorzystującej eksperymenty NMR w analizie strukturalnej tej grupy związków była praca P. Sowińskiego i wsp., obejmująca badania porównawcze wykorzystujące technikę NMR i wyniki otrzymane z analizy struktury rentgenograficznej amfoterycyny B [4]. Praca przyczyniła się do stworzenia ogólnej metody opartej o technikę magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniach stereochemicznych makrolidów polienowych.

Niniejsza praca wnosi nowe wiadomości na temat struktur przedstawicieli ważnej grupy wielkopierścieniowych makrolidów polienowych: nystatyny A₁, kandycydyny D oraz leworyny A₁, wchodzących w skład kompleksów wykazujących praktyczne zastosowanie w lecznictwie. W ramach badań, na podstawie analizy zestawów jedno- i dwuwymiarowych widm magnetycznego rezonansu jądrowego, na cząsteczkach o nienaruszonym szkielecie węglowym, została określona stereostruktura nieznanej dotąd cząsteczki *izo*-nystatyny A₁, powstającej jako produkt translaktonizacji nystatyny A₁, ustalono konfigurację względną wszystkich centrów asymetrii i konformację pierścienia makrolidowego w roztworze cząsteczki kandycydyny D, ważnego przedstawiciela polienów aromatycznych oraz zweryfikowano strukturę płaską i stereochemię cząsteczki leworyny A₁. Prace zostały opublikowane, a prezentowana rozprawa jest ich syntezą.

1. 2. Budowa makrolidów polienowych

Zgodnie z terminologią zaproponowaną przez R. B. Woodwarda [5], struktura makrolidów polienowych wyróżnia się obecnością makrocyklicznego, 26-44 członowego, pierścienia laktonowego. Spośród innych antybiotyków odznaczają się również chromoforem, złożonym z kilku sprzężonych wiązań podwójnych, co jest podstawą klasyfikacji tej klasy związków. W zależności od liczby wiązań dzieli się je na: trieny, tetraeny, pentaeny, heksaeny, heptaeny, oktaeny, oksopolieny oraz grupę polienów mieszanych. Wielkopierścieniowe makrolidy polienowe o 38-o członowym pierścieniu laktonowym stanowią najliczniejszą grupę, a należące do niej związki, wykazujące aktywność przeciwgrzybową, są wykorzystywane w praktyce leczniczej (amfoterycyna B, nystatyna A₁, Wacydyna (syn. Partrycyna), Trichomycyna, kandycydyna D (syn. leworyna A₂). Wyjątkową pozycję zajmuje amfoterycyna B, która charakteryzuje się lepszą od innych związków, korzystną selektywnością działania i jako jedyna wśród makrolidów polienowych stosowana jest w klinice do terapii grzybic układowych jako środek ratujący życie z wyboru (ang. *golden standard*). Co zaś tyczy się nystatyny A₁, o tetraeno-dienowym chromoforze, stanowi ważny lek w leczeniu zakażeń powierzchniowych. Dodatkowo wśród makrolidów heptaenowych, w oparciu o obecność lub brak alifatycznego łańcucha bocznego z dodatkową resztą aromatyczną, wyróżnia się dwie grupy: aromatyczną i niearomatyczną. Głównym przedstawicielem aromatycznych polienów jest kandycydyna D, która charakteryzuje się wyjątkowo wysoką aktywnością w stosunku do drożdżaków (2-3 rzędy wielkości wyższą niż amfoterycyna B lub nystatyna A₁) [3]. Do tej grupy zaliczana jest również leworyna A₁. Zdecydowana większość makrolidów posiada również β -glikozydowo przyłączoną resztę monosacharydową (zwykle aminocukrową). Przeważnie jest nią mykozamina (3-amino-3,6-dideoksy-D-mannoza), rzadziej perozamina (4-amino-4,6-dideoksy-D-mannoza) w perimicynie i ramnoza (6-deoksy-L-mannoza) w lienomycynie. Niekiedy w cząsteczce antybiotyku obok mykozaminy występuje druga reszta cukrowa, np. janoza (2,6-dideoksy-L-digitoksoza) w strukturze nystatyny A₃ i polifunginy B. Badania rentgenograficzne struktury amfoterycyny B po raz pierwszy ujawniły, konfigurację β glikozydowego wiązania D-mykozaminy z aglikonem.

1. 3. Proces biosyntezy a struktura makrolidów polienowych

Makrolidy polienowe swoją charakterystyczną budowę zawdzięczają biosyntezie, która obejmuje następujące po sobie dekarboksylacyjne kondensacje typu „głowa do ogona” (ang. *head-to-tail*) jednostek dwu- i trójwęglowych, przeprowadzanych przez modularne kompleksy enzymatyczne, zwane syntazami poliketydowymi (PKS, ang. *polyketide synthase*) typu I. Każde białko PKS składa się z funkcjonalnych regionów, zwanych modułami. Poszczególne moduły syntaz kontrolują dobór substratów, stopień i stereospecyficzność redukcji w każdym cyklu biosyntezy oraz sposób cyklizacji wydłużanego łańcucha [6]. Przez włączanie do biosyntezy nystatyny A₁, i innych antybiotyków polienowych, znakowanych jednostek octanowych i propionianowych wykazano, że podczas wydłużania łańcucha węglowego antybiotyku dobudowywane są kolejno aktywowane jednostki dwu- i trójwęglowe, pochodzące z acetylo-CoA

i propionylo-CoA [7-9]. Bezpośrednimi prekursorami są powstające przez karboksylowanie acetylo-CoA i propionylo-CoA, odpowiednio malonylo-CoA i metylomalonylo-CoA. Wiadomo również, że egzogenne grupy metylowe pochodzą od grupy metylowej jednostki propionianowej, a nie od mrówczanu czy metioniny [10,11]. W zależności od rodzaju modułu, PKS dobierają różne startery do syntezy, prócz typowych acetylo-CoA i propionylo-CoA, wykorzystuje również p-aminobenzoilo-CoA (kandycydyna D) [12]. Powstający łańcuch węglowy jest sukcesywnie przekazywany do kolejnych modułów PKS, które w zależności od swojej specyfiki realizują pełny cykl syntezy lub zatrzymują redukcję grupy β -ketonowej, kolejno przyłączanej jednostki, na określonym etapie. W każdym cyklu grupa β -ketonowa powstającego łańcucha węglowego może ulec redukcji do grupy hydroksylowej, wiązania podwójnego lub pojedynczego.

Na jeden moduł syntazy składa się kilka domen enzymatycznych potrzebnych do przeprowadzenia jednego, pełnego cyklu kondensacji i redukcji fragmentu węglowego włączanego do łańcucha węglowego. Liczba modułów odpowiada liczbie cykli kondensacji i redukcji przeprowadzanych przez tę syntazę, co za tym idzie warunkuje długość łańcucha węglowego powstającego antybiotyku. Domeny konieczne do wydłużania łańcucha to:

- syntaza 3-oksoacylowa (syntaza 3-oksoacyl:ACP), nazywana syntazą β -ketoacylową lub ketosyntazą (KS),
- acylotransferaza (transferaza acetylo-CoA/malonylo-CoA:ACP) (AT),
- oraz białkowy czynnik przenoszący grupy acylowe (ACP).

Na początku każdej reakcji kondensacji wydłużany łańcuch węglowy jest połączony wiązaniem tioestrowym z cysteiną w miejscu aktywnym ketosyntazy (KS), a jednostka wydłużająca z fosfopantoteinowym ramieniem białkowego nośnika grup acylowych (ACP). Rodzaj jednostki wydłużającej włączanej w danym cyklu, a co za tym idzie obecność bocznych grup metylowych, etylowych i innych w odpowiednim miejscu łańcucha, zależy od specyficzności domeny AT. Następnie domena KS przeprowadza reakcję kondensacji dekarboksylacyjnej. Produkt reakcji pozostaje związany z ACP i w zależności od budowy danego modułu syntazy ulega redukcji lub też, zachowując nie zredukowaną grupę β -ketonową, zostaje przeniesiony w miejsce aktywne domeny KS w kolejnym module PKS i wchodzi do następnego cyklu biosyntezy. Oprócz wymienionych domen podstawowych (KS, AT, ACP), odpowiedzialnych za kondensację, w zależności od stopnia redukcji reszty acylowej w danym cyklu, moduł może zawierać do trzech domen modyfikujących, tzw. redukcyjnych:

- ketoreduktazę (KR),
- dehydratazę (DH)
- enoiloreduktazę (ER).

Jednostka syntetyzowana przez moduł zawierający jedynie domeny podstawowe KS, AT i ACP będzie posiadała grupę ketonową. Jeśli moduł będzie dodatkowo posiadał domenę KR, grupa β -ketonowa zostanie zredukowana do grupy hydroksylowej. Obecność domen KR i DH prowadzi do utworzenia wiązania podwójnego między atomami węgla w łańcuchu węglowym. Natomiast moduł zawierający domeny KR, DH i ER, utworzy łańcuch całkowicie zredukowany w odpowiedniej pozycji [13].

Na N-końcu syntazy zawierającej pierwszy moduł znajdują się domeny: AT i ACP wprowadzające starterową resztę acylową do kondensacji z kolejnymi jednostkami węglowymi. Ten niepełny moduł nazywany jest domeną ładującą (LD, ang. *loading domain*). Na C-końcu ostatniego modułu syntazy występuje domena tioesterazowa (TE) odpowiedzialna za hydrolizę wiązania łańcucha węglowego z syntazą oraz laktonizację pierścienia makrolidowego. Dalsze przemiany szkieletu węglowego (glikozylacja, hydroksylacja, metylacja) przeprowadzają enzymy modyfikujące, towarzyszące syntazom poliketydowym, co również zwiększa różnorodność produktów biosyntezy. Wydaje się, że poszczególne klaster genowy mogły w toku ewolucji podlegać transferowi horyzontalnemu, mediowanemu na przykład przez fagi. W wyniku przemieszczania się informacji genetycznej pomiędzy drobnoustrojami należącymi do różnych jednostek taksonomicznych doszło do dalszego różnicowania struktury syntetyzowanych antybiotyków [14, 15].

2. NYSTATYNA A₁

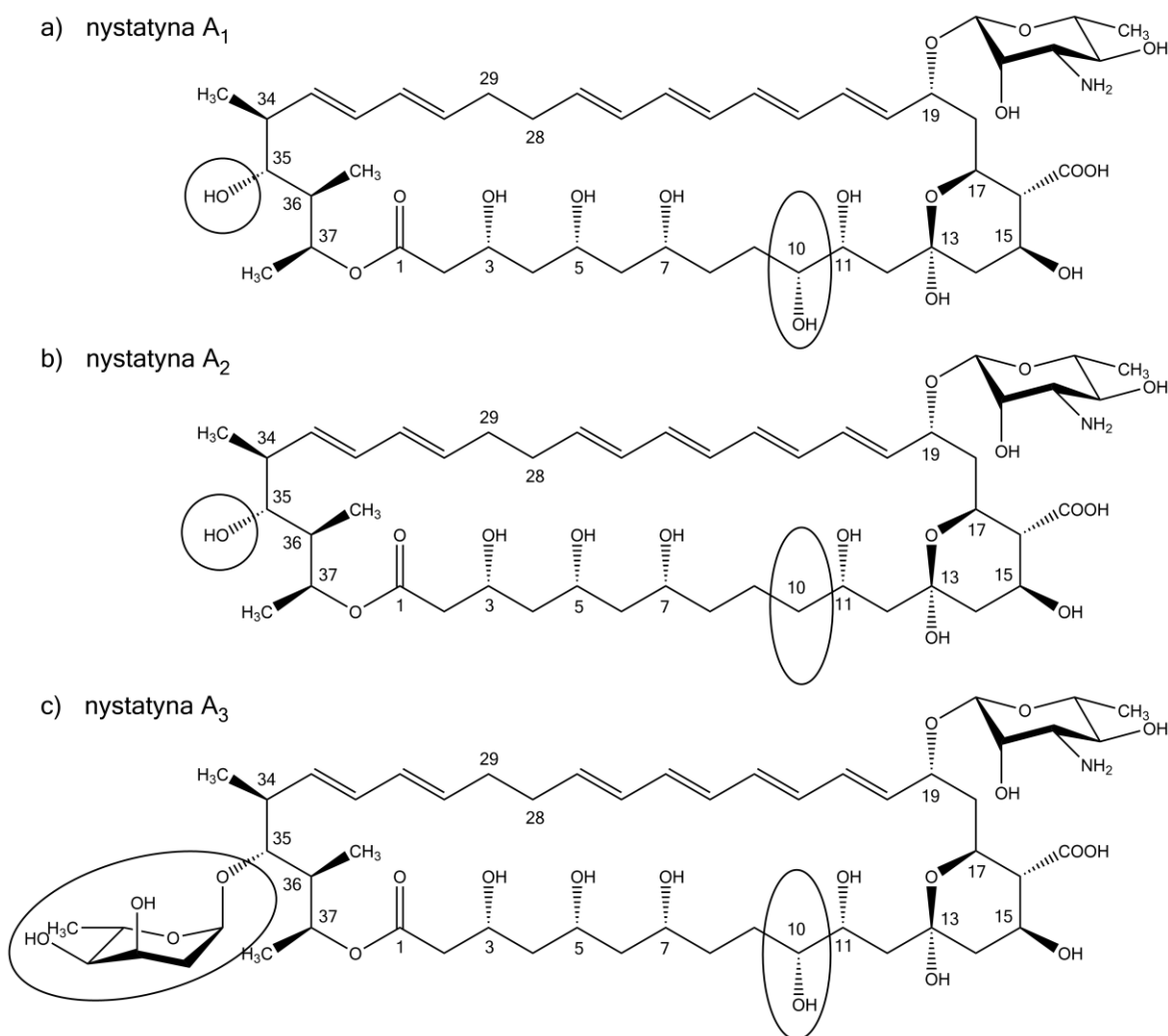
Współczesna literatura prezentuje bogaty zbiór prac na temat nystatyny A₁, począwszy od pierwszych publikacji z lat 50-tych, przez biogenezę do aktywności, mechanizm działania, do jej form o polepszonych właściwościach chemicznych czy farmakologicznych, uzyskanych dzięki modyfikacjom chemicznym. Jako że niniejsza praca obejmuje badania strukturalne, postanowiłam przedstawić przegląd publikacji dotyczący czynników wpływających głównie na strukturę antybiotyku, w tym biologicznych, oraz metody jakimi struktura i stereostruktura nystatyny A₁ została określana, syntetyczne jak i spektroskopowe.

2. 1. Dotychczasowy stan wiedzy o nystatynie A₁

2. 1. 1. Charakterystyka kompleksu antybiotycznego Nystatyna

Nystatynę odkryły E. L. Hazen i R. F. Brown w 1950 r. [16] w trakcie badań prowadzonych przez Wydział Zdrowia Stanu Nowy Jork nad drobnoustrojami glebowymi. Samą Nystatynę początkowo nazywano Fungicydyną [17], ale ostateczne miano zawdzięcza pierwszym literom angielskiej nazwy Stanu Nowy Jork, *New York State* [18]. Był to pierwszy odkryty kompleks antybiotyczny z grupy makrolidów polienowych wykazujący aktywność przeciwgrzybową [19]. Preparat jest produktem metabolizmu wtórnego promieniowca, pobranego z gleby pochodzącej z farmy mlecznej H. Nourse, w stanie Wirginia. Szczep sklasyfikowany w 1958 r. przez L. Ettlinger i wsp. [20], pierwotnie został oznaczony jako *Streptomyces* No. 48240, ale ostatecznie od nazwiska właścicieli farmy, został nazwany *Streptomyces noursei* ATCC 11455 [21]. Obok kompleksu Nystatyn *Streptomyces noursei* produkuje kilka innych metabolitów o aktywności biologicznej, np. przeciwbakteryjny phalamycin [22], przeciwgrzybiczy cykloheksymid [23] czy nourseothricin, antybiotyk o szerokim spektrum działania [24]. W późniejszych badaniach wykazano, że Nystatyna wytwarzana jest także przez inne szczepy promieniowców, mianowicie *Streptomyces fungicidicus* ATCC 27432 [25], *Streptomyces albulus* ATCC 12757 [26], szczep pochodzący z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Hodowli Komórkowych (DSMZ) *DSM 40492* [27] oraz obecnie szczepy rekombinantowe, np. *Streptomyces ahygroscopicus* [28]. Na skalę przemysłową Nystatyna produkowana jest do dziś w procesie biotechnologicznym z wykorzystaniem produkcyjnego szczepu *Streptomyces noursei* ATCC 11455.

Pierwsze badania strukturalne „nystatyny” przeprowadzane były na nierozdzielonym kompleksie. W latach 60-tych, w obliczu doniesień o niejednorodności Nystatyny [29] podjęte zostały prace mające na celu zweryfikowanie danych strukturalnych uzyskanych podczas badań preparatu. Wyniki otrzymane z rozdzielania Nystatyny, produkowanej przez szczep *Streptomyces noursei*, za pomocą metody Craiga oraz analizy przeprowadzonej na drodze chromatografii cienkowarstwowej wskazały, że w jego skład wchodzi nie jeden, ale trzy składniki o zbliżonych strukturach: nystatyna A₁ [30, 31], nystatyna A₂ [32], nystatyna A₃ [33, 34]. Struktury poszczególnych cząsteczek przedstawiono na **Rys. 1**.

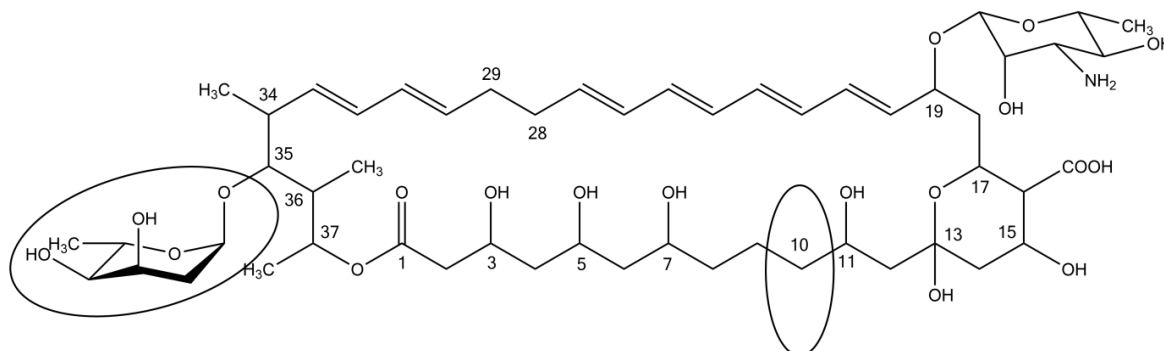


Rys. 1. Porównanie struktur przy atomach węgla C10 i C35 a) nystatyny A₁ [30, 31], b) nystatyny A₂ [32] c) nystatyny A₃ [33, 34].

Wszystkie składniki kompleksu Nystatyny prezentują jednakową budowę szkieletu pierścienia makrolatonowego, w którego skład zaangażowanych jest 38 atomów. Zamknięty wiązaniem laktonowym aglikon składa się z tetraeno-dienowego chromoforu i bardziej elastycznego fragmentu hydrofilowego z grupami hydroksylowymi i ketonowymi. Ilość sprzężonych wiązań podwójnych w chromoforze decyduje o przynależności antybiotyku do danej grupy polienów, dlatego nystatyny zaliczane są do grupy tetraenów. Przy C19 makrolaktonu występuje glikozydowo związana mykozamina (3-amino-3,6-dideoksy-D-mannoza). Zmiany strukturalne cząsteczek, wchodzących w skład kompleksu, zachodzą jedynie w obrębie części hydrofilowej aglikonu i dotyczą podstawników przy atomach węgla C10 i C35. W porównaniu do nystatyny A₁, nystatyna A₂ pozbawiona jest grupy hydroksylowej przy C10. Cechą różnicującą nystatynę A₃ od A₁ jest występowanie przy C35 dodatkowego glikozydowo związanego monosacharydu – L-digitoksozy (2,6-dideoksy-L-allopiranozy), którego strukturę ustalono przy pomocy spektrometrii mas [35].

Inny szczep *Streptomyces noursei* var. *polifungini* produkuje dodatkowo czwarty składnik, którym jest polifungina B (**Rys. 2.**). W odróżnieniu od nystatyny A₁, w swojej budowie polifungina B

wykazuje brak grupy hydroksylowej przy C10 oraz posiada przy O35 dodatkowo związaną resztę cukrową L-digitoksozę [23, 36].



Rys. 2. Konstytucja polifunginy B [37].

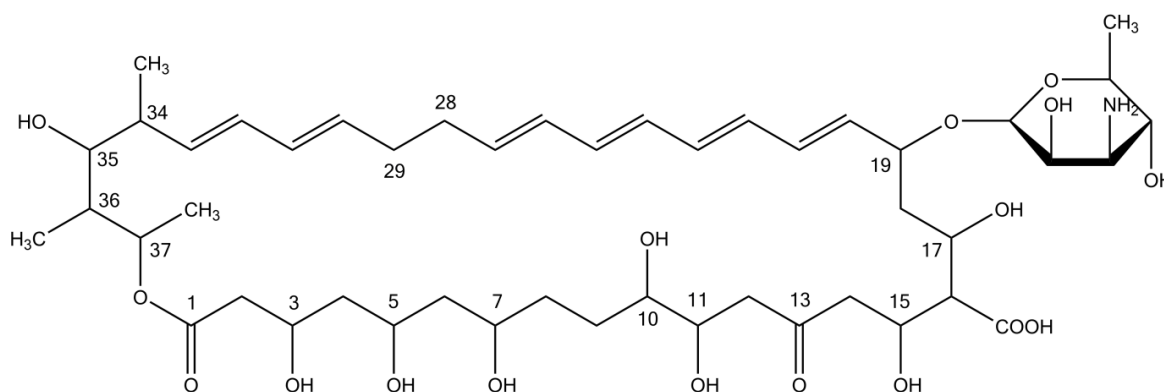
Z kolei szczep *Streptomyces albulus* oprócz nystatyn produkuje również niewielkie ilości związków o chromoforze heptaenowym [37], stąd nystatyny czasami zaliczane są do grupy „zdegenerowanych heptaenów”.

2. 1. 2. Analiza strukturalna nystatyny A₁

2. 1. 2. 1. Konstytucja nystatyny A₁

Badania strukturalne nystatyny A₁ trwały wiele lat i przeprowadzane były przez wiele zespołów. W 1957 r. D. R. Walters i wsp. wykazali, że w cząsteczce antybiotyku występuje, glikozydowo związana reszta aminocukrowa – mykozamina (3-amino-3,6-dideoksy-D-mannoza) [38]. Aminocukier wyodrębniono z kompleksu Nystatyny przez acetolizę wiązania glikozydowego. Strukturę jak i konfigurację absolutną chiralnych atomów węgla, w tym przynależność do szeregu D, określono porównując właściwości fizyczne, tj. temperaturę topnienia, skręcalność optyczną oraz widma w podczerwieni, produktów degradacji mykozaminy ze stosownymi wzorcami [39-41].

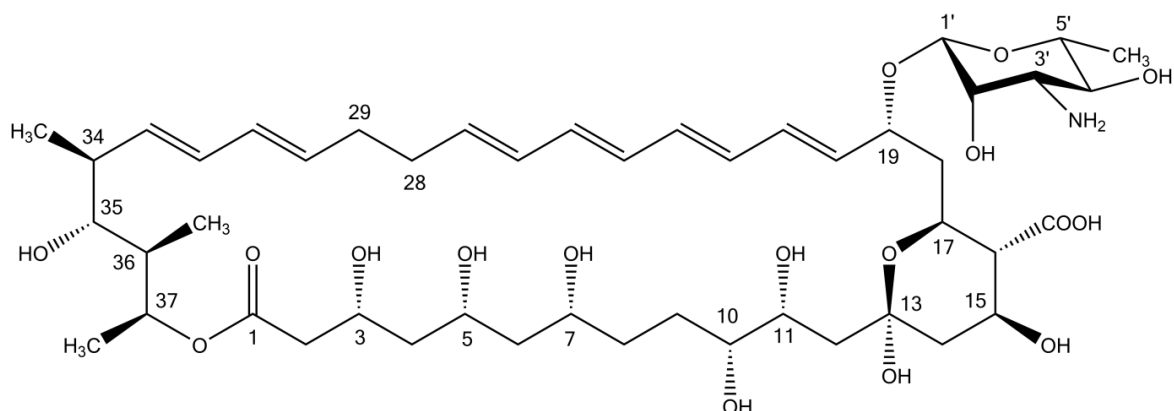
Od 1964 r. trwały prace związane z ustaleniem struktury aglikonu cząsteczki nystatyny A₁. Pierwsze badania ograniczały się do scharakteryzowania grup funkcyjnych, tj. laktonu, grupy karboksylowej i licznych grup hydroksylowych oraz tetraeno-dienowego chromoforu [7]. Kolejne, przedstawiały mniej lub bardziej przybliżoną wielkość pierścienia makrolidowego z rozmieszczeniem poszczególnych grup funkcyjnych w cząsteczce [42-44]. W 1970 r. C. N. Chong i R. W. Rickards podali pełną konstytucję „nystatyny” [45]. Strukturę głównego składnika kompleksu, nystatyny A₁, określił E. Borowski i wsp. (**Rys. 3.**) w 1971 r. [30] na podstawie analizy masowej produktów degradacji i pokryła się ona ze strukturą podaną przez C. N. Chonga i R. W. Rickardsa, ustaloną w oparciu o badania nierozdzielonego na poszczególne składniki kompleksu antybiotycznego [45].



Rys. 3. Konstytucja nystatyny A₁ [30].

2. 1. 2. 2. Stereochemia nystatyny A₁

Ze względu na złożoną budowę antybiotyków, ich duże masy molekularne, a także trudności w izolacji poszczególnych składników kompleksu, pierwsze analizy stereochemiczne nystatyny A₁ były wykonywane z wykorzystaniem wielu eksperymentów i technik badawczych. Badania strukturalne przeprowadzano zarówno na produktach degradacji, retrosyntezy, jak i na niemodyfikowanych związkach. Zwieńczeniem badań stereochemicznych była opublikowana w 1989 r. przez J. M. Lancelin i wsp. pełna stereostruktura cząsteczki [31] (**Rys. 4.**).

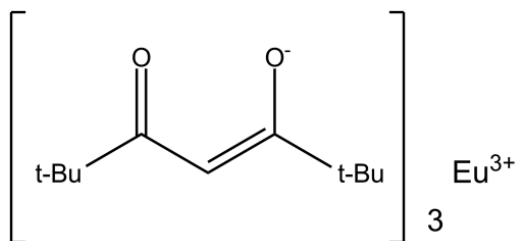


Rys. 4. Stereostruktura nystatyny A₁ [31].

W 1972 r. C. N. Chong i R. W. Rickards na podstawie analizy widm ORD (ang. *Optical Rotatory Dispersion*) i efektu Cottona nystatyny A₁ poddawanej reakcjom mającym na celu hydrolizę wiązania hemiacetalowego, podali, że hemiacetal występuje w trwałej formie cyklicznej [46].

W 1973 r. E. Jereczek i wsp. opisała konfigurację absolutną czterech centrów chiralnych nystatyny A₁, występujących w obrębie fragmentu C34-C37 szkieletu węglowego [47]. W tym celu przeprowadzono szereg reakcji, wykonując: ozonolizę, a w późniejszej kolejności redukcję i hydrolizę zasadową. W rezultacie uzyskano 2,4-dimetylo-1,3,5-heksanotriol, związek odpowiadający regionowi obejmującemu fragment makrocyklicznego pierścienia polienu od C33 do C37 atomu węgla. Przy pomocy jodometanu w środowisku tlenku i wodorotlenku baru

otrzymano pochodną *O*-metylową. Tak przygotowany związek badano technikami ^1H NMR z użyciem odczynnika przesunięcia chemicznego – kompleksu europu ($\text{Eu}(\text{DPM})_3$), którego strukturę przedstawiono na **Rys. 5**.

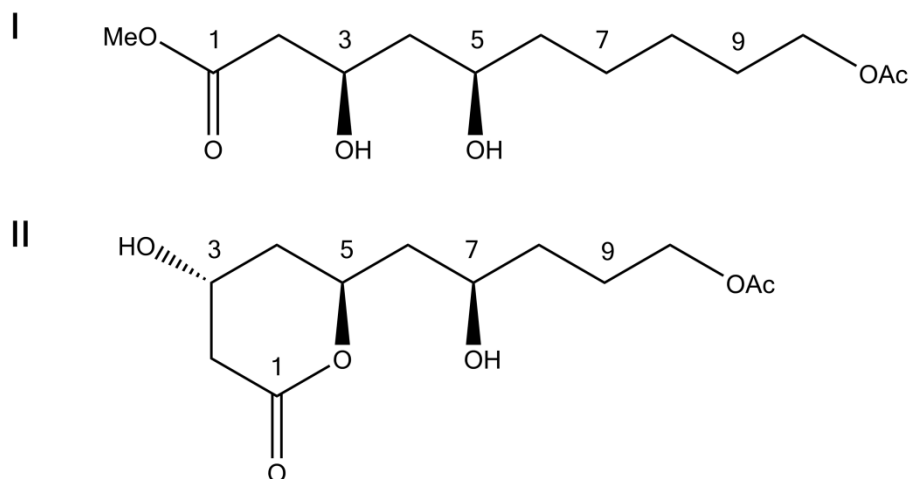


Rys. 5. $\text{Eu}(\text{DPM})_3$ – odczynnik przesunięcia chemicznego.

Na podstawie zmian w przesunięciach chemicznych protonów, wynikających z dodawania różnych ilości odczynnika kompleksującego, określono odległości dzielące dane protony od atomu europu. Ze względu na to, że w cząsteczce amfoterycyny B i nystatyny A_1 fragment C34-C37 ma identyczną konstytucję, wyniki obliczonych odległości zestawiono z danymi pochodzącymi z badań rentgenograficznych amfoterycyny B [48]. W rezultacie dowiedziono, że nie tylko konstytucja, ale i stereostruktura obu fragmentów jest jednakowa: 34S, 35R, 36R i 37S.

W 1982 r. D. W. Brooks i R. P. Kellogg studiując stereochemię antybiotyków polienowych przeprowadzili enancjoselektywną syntezę fragmentu C29-C37 nystatyny A_1 [49]. W tym celu jako substrat zastosowali acetylooctan etylu. Synteza została przeprowadzona w czterech etapach. Zakładała: stereoselektywną redukcję acetylooctanu etylu do estru etylowego kwasu 3(S)-hydroksybutanowego z wykorzystaniem drożdży piekarniczych, stereoselektywne alkilowanie β -hydroksyestru, kondensację aldolową oraz reakcję Wittig-Hornera w celu przyłączenia jednostki olefinowej.

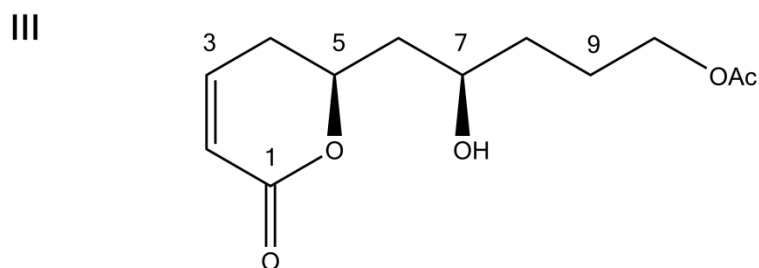
W 1988 r. J. M. Lancelin i wsp., na podstawie jednowymiarowych widm różnicowych NOE oraz eksperymentów DQF-COSY produktów degradacji, ustalili konfigurację względną trzech kolejnych centrów chiralnych w części hydrofilowej antybiotyku, obejmującej fragment C1-C10 szkieletu węglowego [50]. Wodno-metanolową zawiesinę nystatyny A_1 poddano reakcjom: utleniania nadjodanem sodu, redukcji borowodorkiem sodu, metanolizie i neutralizacji z użyciem kationitu, następnie acetylowaniu bezwodnikiem kwasu octowego w roztworze pirydyny. W wyniku oczyszczania z zastosowaniem chromatografii kolumnowej w układzie dichlorometan : metanol : toluen (9:1:2) otrzymano ester metylowy 3,5,7-triolu I i lakton II, **Rys. 6**.



Rys. 6. Ester metylowy 3,5,7-triolu **I** i lakton **II** – produkty degradacji nystatyny A_1 [50].

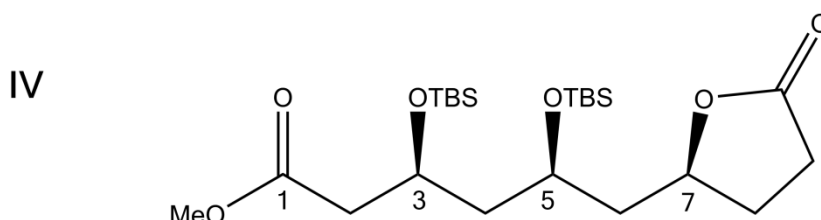
Wartości wicynalnych stałych sprzężenia protonów metinowych H3 (2,5; 4,0; 8,5; 10,5), H5 (2,3; 2,5; 10,5; 10,8) i H7 (2,5; 4,5; 8,0; 10,5 Hz) estru metylowego 3,5,7-triolu **I** zasugerowały badaczom prawie płaską strukturę fragmentu, co jest możliwe jedynie w przypadku konformacji *all-syn* łańcucha polioliowego, co potwierdziły badania laktonu **II**. Przy w pełni rozciągniętej strukturze estru metylowego 3,5,7-triolu grupy hydroksylowe są wystarczająco blisko siebie, aby utworzyć wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, stabilizując tym samym łańcuch polioliowy w jednej płaszczyźnie. Istnienie supramolekularnych oddziaływań pomiędzy atomami zostało dodatkowo potwierdzone przez rejestrację widma DQF-COSY związku **I** w suchym benzenie. Zaobserwowano sprzężenia dalekiego zasięgu, typu W, pomiędzy protonami grup hydroksylowych a ekwatorialnymi protonami grup metylenowych H—O3—C3—C4—H4' i H—O5—C5—C6—H6'. Te dane oraz zaobserwowany efekt NOE pomiędzy protonami H5 i H7 w związku **II** przyczyniły się do opisu konfiguracji względnej jako 3R*, 5R*, 7R*.

W 1989 r. J. Prandi i J. M. Beau określili konfigurację absolutną fragmentu C1-C10 [51], przeprowadzając związek **II** w nienasycony lakton **III** (lakton **III**, **Rys. 7.**). Zestawiając jednakowe własności chromatograficzne, dane pochodzące z eksperymentów NMR oraz wartości skręcalności optycznych związku **III** ze związkiem odniesienia, otrzymanym na drodze stereoselektywnej syntezy, zdefiniowali konfigurację absolutną chiralnych atomów węgla jako: 3R, 5R, 7R.



Rys. 7. Nienasycony lakton **III** [51] otrzymany ze związku **II** [50].

W tym samym roku (1989 r.) K. C. Nicolaou i K. H. Ann również opisali konfigurację absolutną centrów asymetrii fragmentu C1-C10 [52], porównując własności chromatograficzne, widma w podczerwieni oraz widma CD wyizolowanego produktu degradacji nystatyny A₁ ze związkiem otrzymanym na drodze stereoselektywnej syntezy (związek **IV**, **Rys. 8.**). Nystatynę A₁ poddano następującym reakcjom: acetylowaniu (Ac₂O/MeOH), metylowaniu, (CH₂N₂/MeOH,H₂O), hydrolizie wiązania laktonowego (K₂CO₃/MeOH), reakcji z nadjodanem sodu, następnie siliłowaniu z zastosowaniem t-BuMe₂SiCl w obecności imidazolu, utlenianiu chlorochromianem pirydyny (PCC). W wyniku przeprowadzonych reakcji uzyskano analizowany produkt. Jednocześnie zsyntetyzowano związek mający posłużyć jako odniesienie (związek **IV**, **Rys. 8.**) o identycznej konstytucji i prawdopodobnie identycznej z nystatyną konfiguracji absolutnej chiralnych atomów węgla 3S, 5S, 7S. Oba związki cechowały się jednakowymi właściwościami chromatograficznymi lecz widma CD prezentowały przeciwny znak efektu Cottona, co pozwoliło stwierdzić, że związki są enancjomerami, a konfigurację absolutną omawianego fragmentu nystatyny A₁ opisano jako przeciwną: 3R, 5R, 7R.



Rys. 8. Związek **IV** – wzorec, otrzymany w wyniku stereoselektywnej syntezy przez K. C. Nicolaou i wsp. [52].

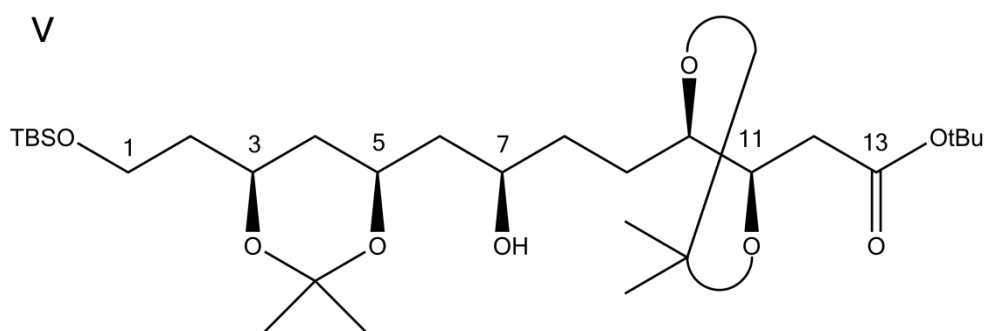
W 1989 r. J. M. Lancelin i wsp. bazując na dwuwymiarowych eksperymentach DQF-COSY, NOESY i ROESY, wykonanych w różnych rozpuszczalnikach, w pełni scharakteryzowali konfigurację absolutną nystatyny A₁, uzupełniając opis stereochemii cząsteczki o brakujące centra chiralne: 10R, 11R, 13S, 15S, 16R, 17S, 19R, 1'R [31]. Badania prowadzono na nieprzekształconym antybiotyku. Posługując się wartościami wycylnych stałych sprzężenia w połączeniu z rejestrowanymi efektami NOE, początkowo określona została orientacja atomów C10 i C11 jako *syn*. Opierając się na wartościach stałych sprzężeń odczytanych z widma DQF-COSY ($J_{14e,15} = 4,5$ Hz, $J_{14a,15} = 10,5$ Hz, $J_{15,16} = 9,5$ Hz i $J_{16,17} = 11,0$ Hz) ustalono, że cykliczny hemiacetal (C13-C17) występuje w konformacji krzesłowej, a podstawniki przy C15, C16 i C17 są zlokalizowane się w pozycjach ekwatorialnych. Zarejestrowane efekty NOE pozwoliły określić konfigurację względną tego fragmentu cząsteczki. Dzięki obserwowanym sprzężeniom przez przestrzeń (H1'-H3' i H3'-H5') protonów monosacharydu, ustalono konfigurację β wiązania glikozydowego, a także konformację ⁴C₁ D-mykozaminy. W celu zbadania stereochemii atomu węgla C19 wykorzystano glikozydowo związaną D-mykozaminę jako sondę chiralną. Obserwowane efekty NOE pomiędzy aglikonem a monosacharydem (H1'-H19, H1'-H18e i H2'-H17) zdefiniowały konfigurację absolutną C19 jako R. Ostatecznie stereochemia aglikonu cząsteczki nystatyny A₁ jest następująca: **3R, 5R, 7R, 10R, 11R, 13S, 15S, 16R, 17S, 19R, 34S, 35R, 36R i 37S (Rys. 6.)**.

W związku z poznaniem pełnej stereochemii cząsteczki nystatyny A₁ dalsze lata obejmowały rozwój stereoselektywnych metod syntetycznych, mających na celu odtworzenie określonego fragmentu szkieletu węglowego antybiotyku. W 1992 r. C. Bonini i wsp. opracowali diastereoselektywną redukcję, wykorzystującą NaBH₄/Ti(OiPr)₄ w tetrahydrofuranie, do otrzymania jako głównego produktu 1,3,5-triolu o konformacji *all-syn*, odpowiadającego fragmentowi C1-C10 antybiotyku [53]. Wykonane widma ¹H NMR i ¹³C NMR były identyczne z widmami produktu degradacji nystatyny A₁ (związek I, **Rys. 6.**), otrzymanym przez J. M. Lancelin i wsp. w 1988 r. [31].

W 1993 r. C. Bonini i wsp. prowadzili prace nad biokatalizowanymi reakcjami desymetryzacji *mezo*-dioli [54]. Początkowo testowali enzymy, mające być później wykorzystane w reakcji desymetryzacji. Najlepszym okazała się lipaza pochodząca z *Pseudomonas fluorescens*. Wybrany enzym wykorzystali do syntezy fragmentu C1-C10 nystatyny A₁ [55]. Ostatecznie porównali widmo ¹³C NMR i skręcalność optyczną otrzymanego fragmentu nystatyny A₁ ze związkiem II (związek II, **Rys. 6.**) opisanym w pracy J. M. Lancelin i wsp. z 1988 r. [31]. Dane były zbieżne.

W 1998 r. C. Schneider i M. Rehfeuter opracowali mniej pracochłonną enancjoselektywną syntezę w pełni chronionego fragmentu C1-C10 nystatyny A₁ [56] tożsamego ze związkiem II (związek II, **Rys. 6.**) [31]. Kluczowym etapem było zastosowanie selektywnego i wydajnego przegrupowania Cope'a produktów kondensacji aldolowej.

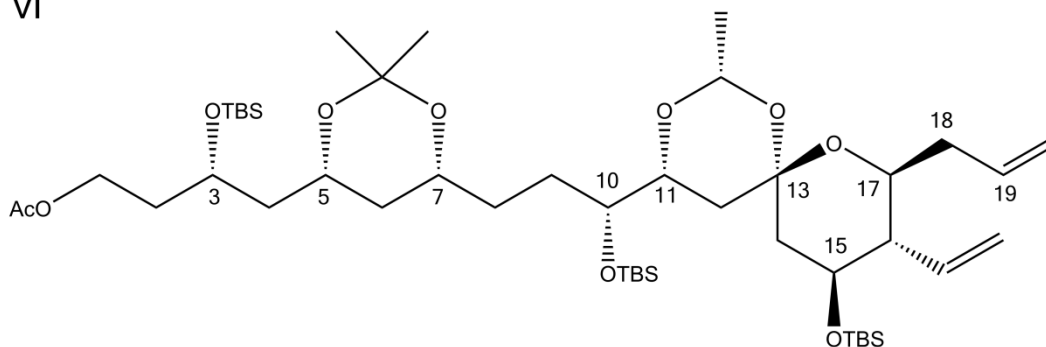
W 1999 r. G. Solladie i wsp. na drodze wieloetapowej stereoselektywnej syntezy zbieżnej otrzymali fragment C1-C13 nystatyny A₁, związek V, poszerzając tym samym syntezę fragmentu hydrofilowego cząsteczki antybiotyku o dwa centra asymetrii 10R i 11R [57] (związek V, **Rys. 9.**).



Rys. 9. Związek V, chroniony fragment polioliu nystatyny A₁, obejmujący fragment C1-C13 [57].

W 2004 r. I. Kadota i wsp. chcąc opracować uniwersalną metodę syntezy fragmentu polioliowego antybiotyków przeciwgrzybowych należących do grupy niearomatycznych makrolidów polienowych, przeprowadzili szereg reakcji, uzyskując część hydrofilową (C1-C19) nystatyny A₁ [58]. Kluczowym etapem było alkirowanie odpowiedniego acetonidu cyjanohydryny. W ten sposób otrzymano fragment nystatyny A₁, zawierający zakonserwowany pierścień hemiacetalowy (związek VI, **Rys. 10.**). Zaproponowana metoda posłużyła również do syntezy chronionego aglikonu kandydyny.

VI



Rys. 10. Związek VI, chroniony fragment polioli nystatyny A₁, obejmujący fragment C1-C19 [58].

2. 1. 3. Wpływ uwarunkowań biogenetycznych na strukturę nystatyny A₁

Najnowsze badania dotyczące struktury nystatyny A₁ obejmują wpływ uwarunkowań biogenetycznych na proces jej biosyntezy. W 2000 r. T. Brautaset i wsp. scharakteryzowali klaster genowy *Streptomyces noursei* ATCC 11455 odpowiedzialny za syntezę związku i podali mechanizm syntezy w komórce. W procesie biosyntezy antybiotyku uczestniczy sześć dużych syntaz poliketydowych NysA, NysB, NysC, NysI, NysJ, NysK. Inne enzymy, takie jak monooksygenazy cytochromu P450 (NysN i NysL) i glikozylotransferazy (NysDI), odpowiedzialne są za późniejsze modyfikacje aglikonu [59]. Po zsyntetyzowaniu makrocyklicznego pierścienia antybiotyku, w pierwszej kolejności NysN katalizuje utlenienie egzocykliczej grupy metylowej, związanej z węglem C16 makrolidonu, do grupy karboksylowej. Następnie NysDI uczestniczy w przyłączaniu reszty cukrowej mykozaminy przez wiązanie O-glikozydowe. W ostatnim etapie NysL katalizuje hydroksylowanie węgla C10 tak, że z cząsteczki odpowiadającej strukturalnie nystatynie A₂ (10-deoksynystatynie) powstaje nystatyna A₁ [60, 61]. W przypadku nystatyn, 38-o członowy pierścień buduje 16 jednostek octanowych i 3 jednostki propionianowe [7]. Boczne grupy metylowe oraz grupa karboksylowa (Me34, Me36, COOH) pochodzą z inkorporacji jednostek propionianowych.

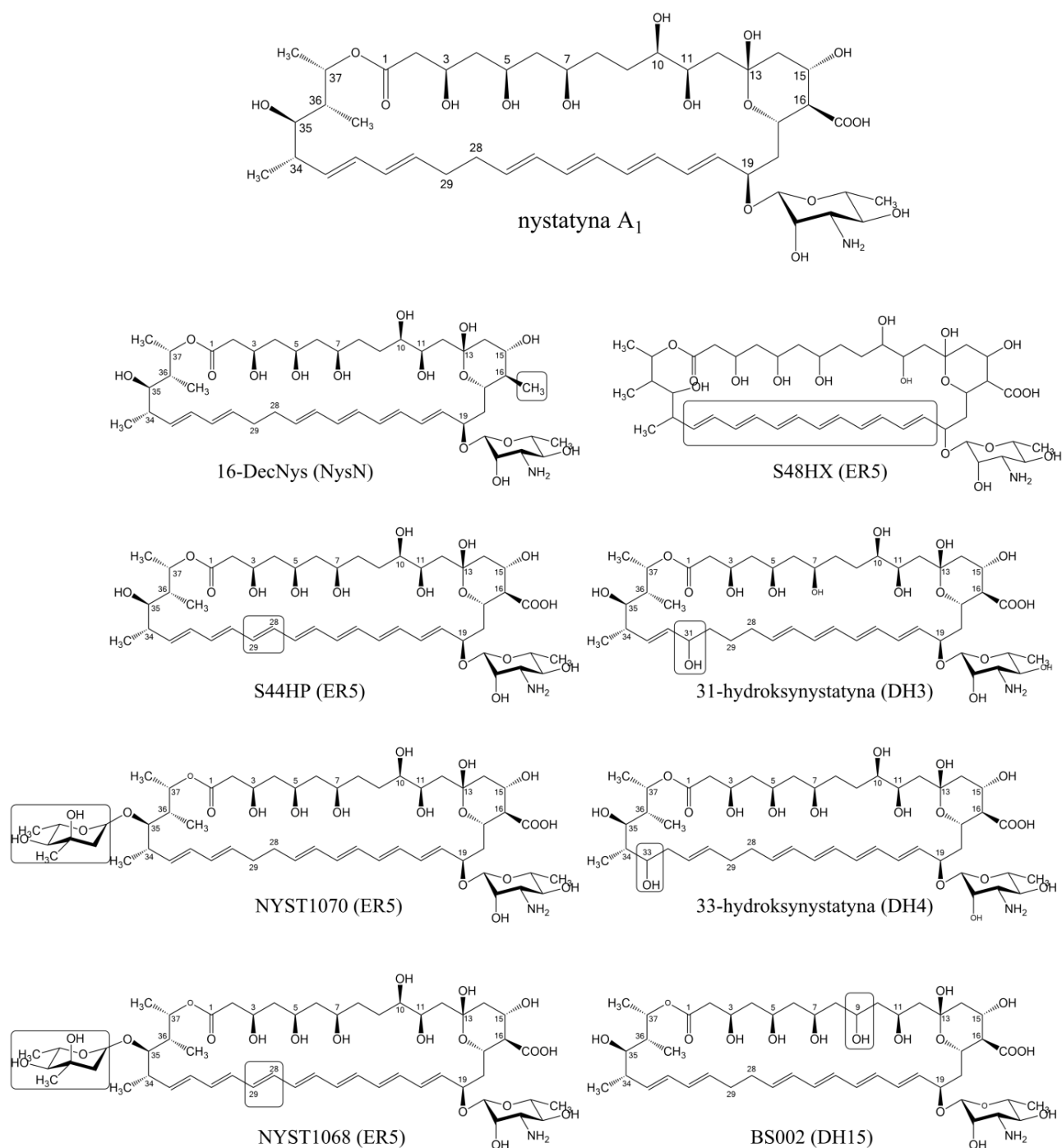
Znajomość zależności budowy poliketydowego metabolitu od ułożenia genów i domen enzymatycznych w syntazie PKS pozwala obecnie programować struktury antybiotyków. Najnowsze osiągnięcia w dziedzinie inżynierii genetycznej obejmują prace mające za cel produkcję analogów strukturalnych nystatyny A₁ o polepszonej aktywności czy rozpuszczalności. Największy wkład w produkcję zmodyfikowanej strukturalnie cząsteczki nystatyny metodami inżynierii genetycznej wniósł zespół S. B. Zotcheva. Dzięki kolinearności domen w obrębie genów oraz porządku reakcji katalizowanych przez domeny enzymatyczne przeprowadzone zostały doświadczenia ukierunkowanej mutagenazy określonych genów pojedynczych domen redukcyjnych lub delecji w genach białek modyfikujących aglikon. W wyniku mutacji zostały unieczynnione przede wszystkim domeny ketoreduktazowa (KR), dehydratazowa (DH), enoiloreduktazowa (ER) lub białka odpowiedzialne za późniejsze modyfikacje aglikonu. Mutacje obejmują jedno, dwa lub trzy miejsca w genach kodujących.

Delecja w genie kodującym białko NysN skutkuje produkcją przez szczep *CL346AS* cząsteczki nystatyny 16-DecNys (16-dekarboksy-metylo-nystatyna) z nieutlenioną egzocykliczną grupą metylową (**Rys. 11.**) [62]. Rekombinantowy szczep *NJDH15* z mutacją w domenie DH15 wytwarza związek BSG002 (9-hydroksy-10-deokynystatyna) (**Rys. 11.**), którego aktywność przeciwgrzybicza jest 4-krotnie niższa niż nystatyny A₁. Struktura cząsteczki jest pozbawiona grupy hydroksylowej przy C10 oraz posiada dodatkową grupę -OH przy C9 aglikonu [63].

Mutanty *ERD48*, pozbawione jednego pełnego modułu syntazy NysC PKS wytwarzają pochodną nystatyny S48HX o pomniejszonym, 36-o członowym pierścieniu, i heksaenowym chromoforze (**Rys. 11.**). Jej aktywność przeciwgrzybowa jest około 30 razy niższa w porównaniu do nystatyny A₁ [64].

Szczep *ERD44* pozbawiony w module piątym NysC PKS enoiloreduktazy (ER5), wytwarza szereg analogów nystatyny A₁. Spośród sześciu zidentyfikowanych związków, określono strukturę trzech. Na największą uwagę zasługuje związek S44HP (**Rys. 11.**), charakteryzujący się heptaenowym chromoforem. W odniesieniu do nystatyny A₁, wykazuje 6-krotnie wyższą aktywność przeciwgrzybiczą *in vitro*, przez co stał się atrakcyjnym kandydatem do dalszych chemicznych modyfikacji cząsteczki w celu uzyskania związku o polepszonych właściwościach farmakologicznych [65-67]. Związki NYST1070 oraz NYST1068 (**Rys. 11.**) wytwarzane przez ten szczep mają przy O35 związaną inną resztę cukrową L-mykarozę [68]. Szczep *ERD44* produkował również cząsteczkę posiadającą w swej strukturze chromofor oktaenowy. Struktury cząsteczki jednak nie opublikowano.

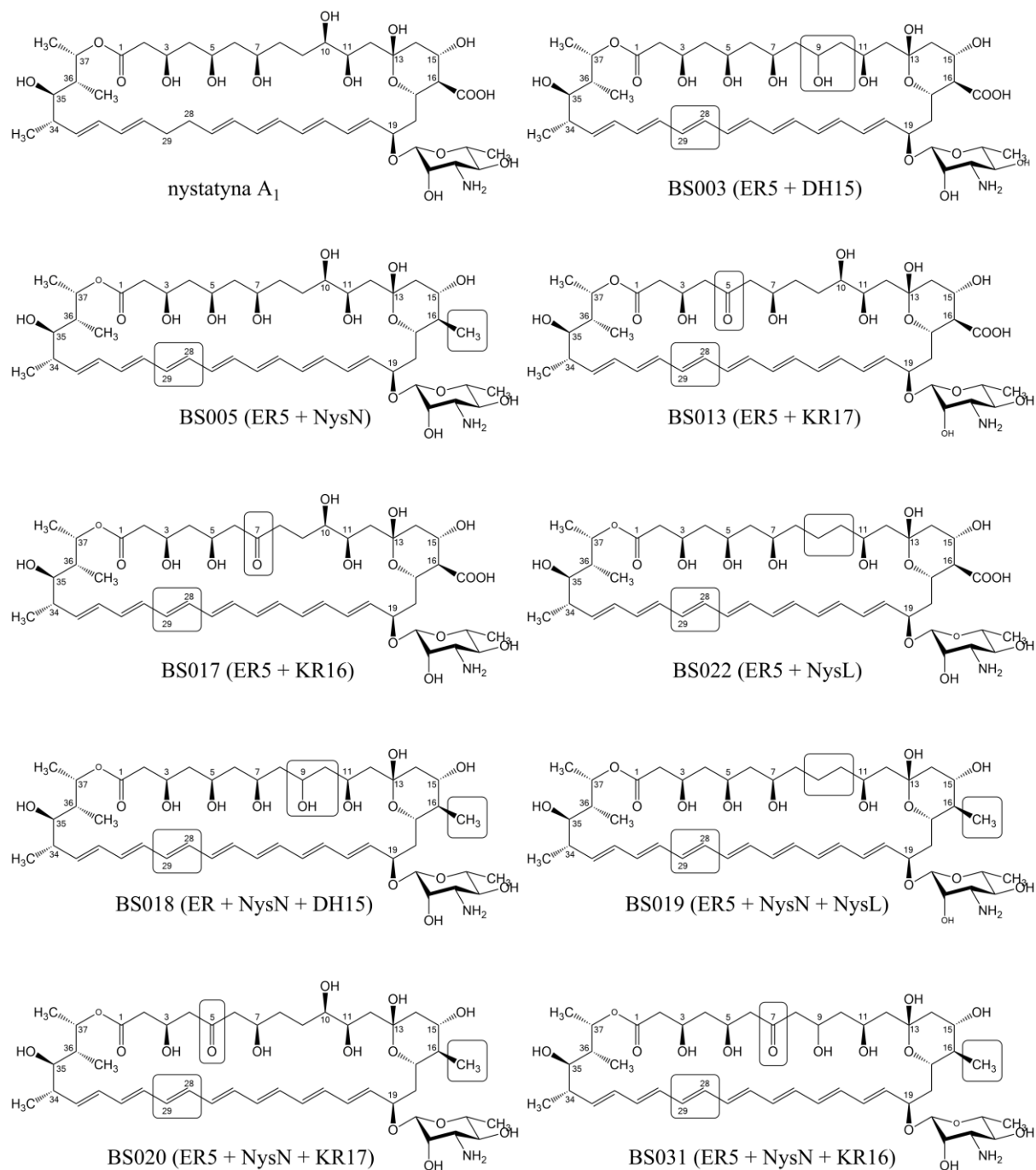
Genetycznie modyfikowany pierwotny szczep bakterii *Streptomyces noursei* ATCC 11455 z dezaktywowanymi resztami histydynowymi w miejscu aktywnym domen DH3 lub DH4 w syntazie NysC produkuje analogi strukturalne o 2000 razy zwiększonej rozpuszczalności lecz, niestety, o obniżonej aktywności przeciwgrzybowej. Są nimi 31-hydroksynystatyna i 33-hydroksynystatyna (**Rys. 11.**), z dodatkową grupą hydroksylową przy C31 lub C33 [69].



Rys. 11. Analogi strukturalne nystatyn otrzymane w wyniku ukierunkowanych mutacji w wybranych genach. Na rysunku wskazano miejsca zmian strukturalnych względem nystatyny A₁. W nawiasach zapisano mutacje w genach danych domen [62-69].

W wyniku obiecujących badań aktywności przeciwgrzybowej *in vitro* (Tabela 1.) związku S44HP, powstającego w skutek mutacji enoioreduktazy (ER5), zapewniającej cząsteczce heptaenowy chromofor, w celu uzyskania związków o polepszonej aktywności unieczynniano więcej niż jedną jednostkę syntazy PKS i/lub białka modyfikujące aglikon [70, 71] (Rys. 12.). Wykonano testy aktywności pochodnych *in vitro*. Spośród otrzymanych analogów wybrano dwa, BSG005 i BSG020, których aktywność przeciwgrzybiczą testowano *in vivo* na modelu mysim [70]. Wyniki okazały się

podobne do aktywności amfoterycyny B *in vivo*, lecz co zasługuje na uwagę, związki te wykazywały znacznie mniejszą toksyczność.



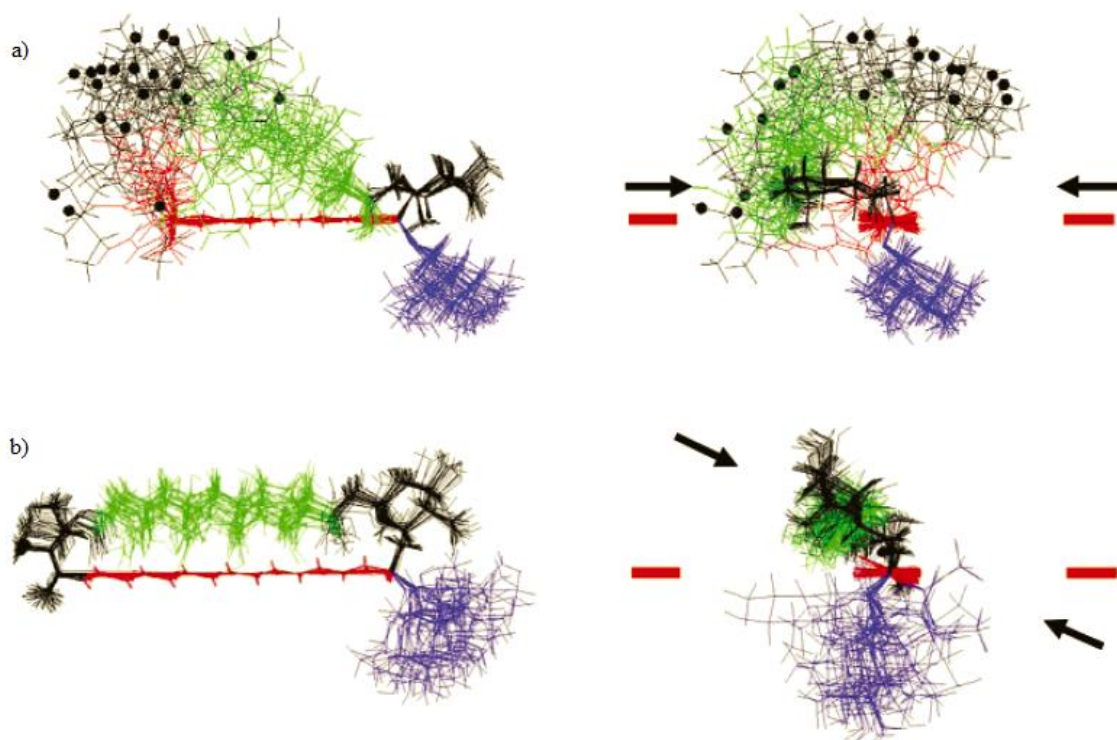
Rys. 12. Analogi strukturalne nystatyn otrzymane w wyniku ukierunkowanych mutacji w dwóch lub trzech wybranych genach. Na rysunku wskazano miejsca zmian strukturalnych względem nystatyny A₁. W nawiasach zapisano mutacje w genach danych domen [70, 71].

Tabela 1. Porównanie aktywności przeciwwgrzybowej *in vitro* wobec *Candida albicans* analogów strukturalnych nystatyny A₁ uzyskanych metodami inżynierii genetycznej [62-71].

Związek	Mutacja(e)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)	HC ₅₀ (µg/ml)
nystatyna A ₁	-	1,2 ± 0,2	2,0 ± 0,2	85
BSG002	DH15	4,8 ± 0,4	10,5 ± 3,5	180
16-DecNys	NysN	1,3 ± 0,4	1,8 ± 0,5	175
31-hydroksynystatyna	DH3	>200	-	-
33-hydroksynystatyna	DH4	>200	-	-
S48HX	ER5	19.9	-	-
NYST1068	ER5	0.23	-	-
NYST1070	ER5	0.86	-	-
S44HP	ER5	0,12 ± 0,03	0,20 ± 0,03	2,5
BSG003	ER5 DH15	-	12,0 ± 0,60	>600
BSG005	ER5 NysN	-	0,11 ± 0,03	4,0 ± 0,3
BSG013	ER5 KR17	0,25 ± 0,07	0,43 ± 0,07	3,0
BSG017	ER5 KR16	0,47 ± 0,15	0,92 ± 0,03	3,3
BSG022	ER5 NysL	-	0,20 ± 0,02	1,4 ± 0,15
BSG018	ER5 NysN DH15	-	9,0 ± 0,45	>200
BSG019	ER5 NysN NysL	-	0,12 ± 0,03	4,5 ± 0,3
BSG020	ER5 NysN KR17	0,15 ± 0,03	0,19 ± 0,03	9,0
BSG031	ER5 NysN KR16	0,18 ± 0,06	0,37 ± 0,09	3,8

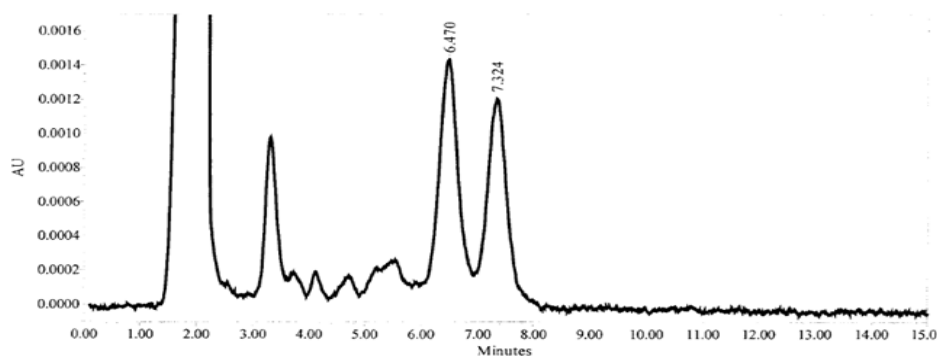
2. 1. 4. Tetraeno-dienowy chromofor a konformacja cząsteczki nystatyny A₁

Budowa chemiczna cząsteczki nystatyny A₁ została całkowicie poznana. Niemniej jednak warto zwrócić uwagę na budowę chromoforu cząsteczki antybiotyku. Nystatyna A₁ oryginalnie posiada w swej strukturze chromofor tetraeno-dienowy, a nie heptaenowy. Pomiędzy układem podwójnych wiązań występują dwa węgle o hybrydyzacji sp^3 (C28, C29), co wywołuje poważne konsekwencje strukturalne. Stwarza sposobność występowania pewnej fleksyjności pierścienia makrolatonowego. Pojawia się możliwość rotacji wokół wiązania C28-C29, dzięki której cząsteczka ma więcej wariantów konformacyjnych. Chromofor heptaenowy wyklucza taką ewentualność, wręcz zapewnia układowi sztywność, zapobiegając większym zmianom konformacyjnym. Takie przypuszczenia potwierdzają przeprowadzone symulacje komputerowe [69, 72] (**Rys. 13.**).



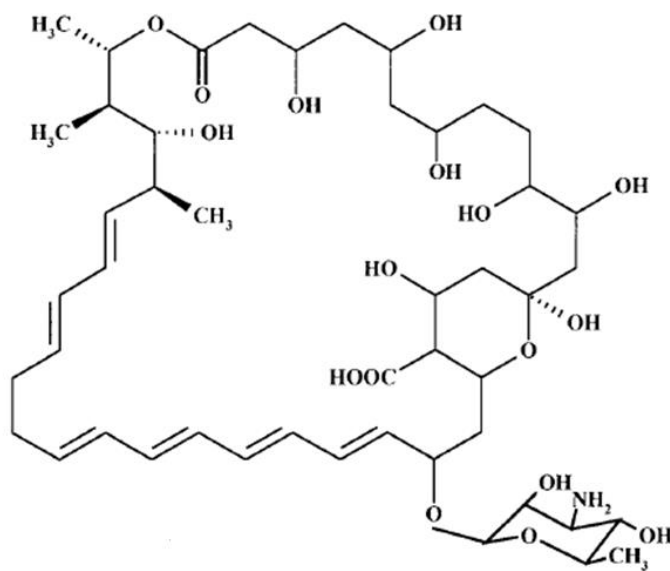
Rys. 13. Rysunek przedstawia 24 nałożone na siebie konformery każdej cząsteczki a) nystatyny A_1 i b) S44HP. Lewa strona: Widok tetraeno-dienowego chromoforu w planie horyzontalnym z resztą aminocukrową skierowaną ku dołowi. Prawa strona: Widok od strony mykozaminy. Niebieski: reszta mykozaminy. Czerwony: chromofor (C20-C33). Zielony: część hydrofilowa (C1-C11). Czarne kule: Atom tlenu z 35-OH. Czarne strzałki wskazują ekwatorialną pozycję pierścienia hemiketalowego względem płaszczyzny chromoforu [72].

W 2001 r. L. Ostrosky-Zeichner i wsp. donieśli o występowaniu konformacyjnej odmiany nystatyny A_1 [73]. Podczas analizy chromatograficznej (RP-HPLC), handlowego preparatu nystatyny A_1 inkubowanego z podłożem wzrostowym i metanolem, zaobserwowali występowanie dodatkowego maksimum (**Rys. 14.**), nieobecnego w trakcie analizy komercyjnego preparatu. Dzięki zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych, wyizolowali drugi składnik.



Rys. 14. Chromatogram nystatyny inkubowanej z podłożem RPMI. Zaznaczone czasy retencji odpowiadają wyizolowanym produktom: nystatyna A_1 - 6,470 min, konformer nystatyny A_1 – 7,324 min. [73].

Zbadali go posługując się spektrometrią mas (masa odpowiadała nystatynie A₁) oraz technikami NMR. Przeprowadzono również badania aktywności. Związki wykazywały odmienne właściwości biologiczne, przy czym drugi izomer charakteryzował się mniejszą aktywnością przeciwgrzybową. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów autorzy deklarowali, że wyizolowany przez nich związek jest innym konformerem nystatyny A₁, (**Rys. 15.**). Jak się okazało w rezultacie moich badań była to błędna interpretacja, gdyż obserwowana izomeria wynika z zachodzącej reakcji translaktonizacji cząsteczki nystatyny A₁.



Rys. 15. Proponowana struktura konformeru nystatyny A₁ [73].

3. KANDYCYDYNA D I LEWORYNA A₁

Współczesna wiedza dotycząca kompleksów Kandycydyny i Leworyny jest znacznie uboższa niż ta dotycząca Nystatyny. Niemniej jednak wiadomości na ich temat należałoby uporządkować. Kandycydyna była badana głównie w Stanach Zjednoczonych a Leworyna w ówczesnym Związku Socjalistycznych Republik Radzieckich. Można by sądzić, że mamy do czynienia z różnymi preparatami. W rzeczywistości jednak to podobne kompleksy, wytwarzane przez różne mikroorganizmy, a przez kraj pochodzenia inaczej nazywane. Badania porównawcze kompleksów Leworyny, co więcej także Heptamycyny i Askozyny, z Kandycydyną, wytwarzanych przez różne szczepy promieniowców, pozwoliły stwierdzić, że są one kompleksami tych samych antybiotyków, występujących w różnych proporcjach w danym kompleksie [74-77]. Podobną sytuację można zauważyć w historii Nystatyny, której nazewnictwo zostało ujednolicone.

3. 1. Dotychczasowy stan wiedzy o kandycydynie D

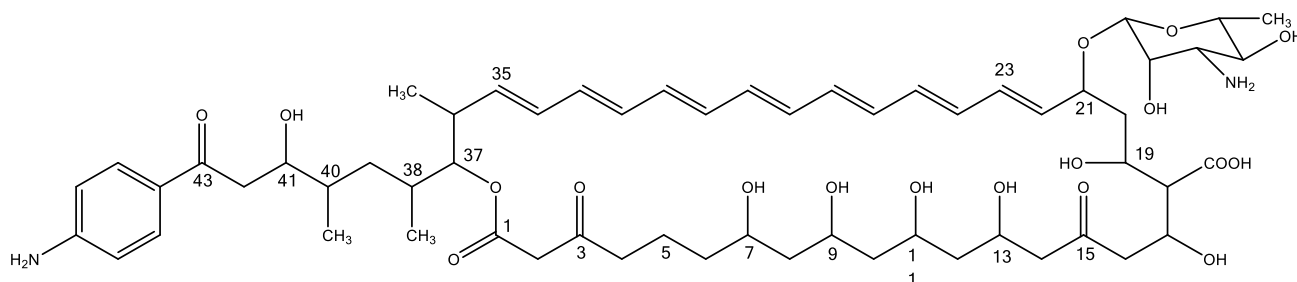
Kandycydyna została wyizolowana i opisana przez H. A. Lechevaliera i wsp. w 1953 r. [78]. Początkowo nie wiadano o złożonej naturze preparatu i sądzono, że jest to pojedynczy związek, któremu nadano symbol C135. Później ze względu na jego szczególnie wysoką aktywność przeciwgrzybową względem *Candida albicans* nazwano go Kandycydyną [79]. W 1955 r. L. C. Vining i wsp. oraz W. Oroshnik i wsp., w oparciu o wyniki badań spektroskopii UV-Vis, zaliczyli preparat do grupy heptaenów [80-82]. Jak dziś wiadomo Kandycydyna jest kilkuskładnikowym kompleksem antybiotyków przeciwgrzybowych z grupy aromatycznych makrolidów polienowych, produkowanym przez szczep *Streptomyces griseus* IMRU 3570 [83]. Prace podjęte w Instytucie Mikrobiologii Uniwersytetu Rutgers (USA) oraz w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej wykazały, że Kandycydyna nie jest pojedynczym związkiem. Metodą rozdziału przeciwpłądowego w układzie chloroform : metanol : bufor boranowy (pH = 8,32) stwierdzono obecność aż dziewięciu składników [84, 85], które zgodnie ze współczynnikiem podziału oznaczono jako:

- kandycydyna A (~ 10%),
- kandycydyna B (~ 6%),
- kandycydyna C (~ 8%),
- kandycydyna D (~ 50%) (syn. leworyna A₂),
- kandycydyna E (~ 10%),
- kandycydyna F (~ 8%),
- kandycydyna G (~ 4%),
- kandycydyna H i I (w sumie 4%).

Kandycydyna D (syn. leworyna A₂) stanowiła główną frakcję analizowanego kompleksu.

Podobne wyniki, co do ilości składników w omawianym kompleksie antybiotycznym Kandycydyny, otrzymano przez zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC), gdzie w zależności od źródła pochodzenia próbki obserwowano od 5 do 8 składników [75, 76, 86].

W 1979 r. na podstawie analizy spektrometrii mas produktów degradacji chemicznej ustalono konstytucję kandycydyny D (**Rys. 16.**) oraz stwierdzono, że jest ona jednakowa z leworyną A₂, głównym składnikiem kompleksu Leworyn [86]. Struktura ta nie uwzględniała jeszcze konfiguracji i konformacji obu związków, ani też geometrii *cis-trans* chromoforu heptaenowego, zakładając wstępnie, że jest to struktura *all-trans*, jak się później okazało błędnie.



Rys. 16. Postulowana konstytucja kandycydyny D (syn. leworyny A₂) [86].

W ostatnich latach pojawiły się również doniesienia, sugerujące wysokie podobieństwo kompleksu Kandycydyny i chińskiego preparatu FR-008, a także podobieństwo szczepów, które je wytwarzają [88-90]. Prowadzono również prace nad genetycznym podobieństwem tych szczepów oraz modyfikacjami genomów *Streptomyces griseus* i szczepu FR-008, w celu uzyskania przewagi produkcji jednego, czy kilku składników [87-89].

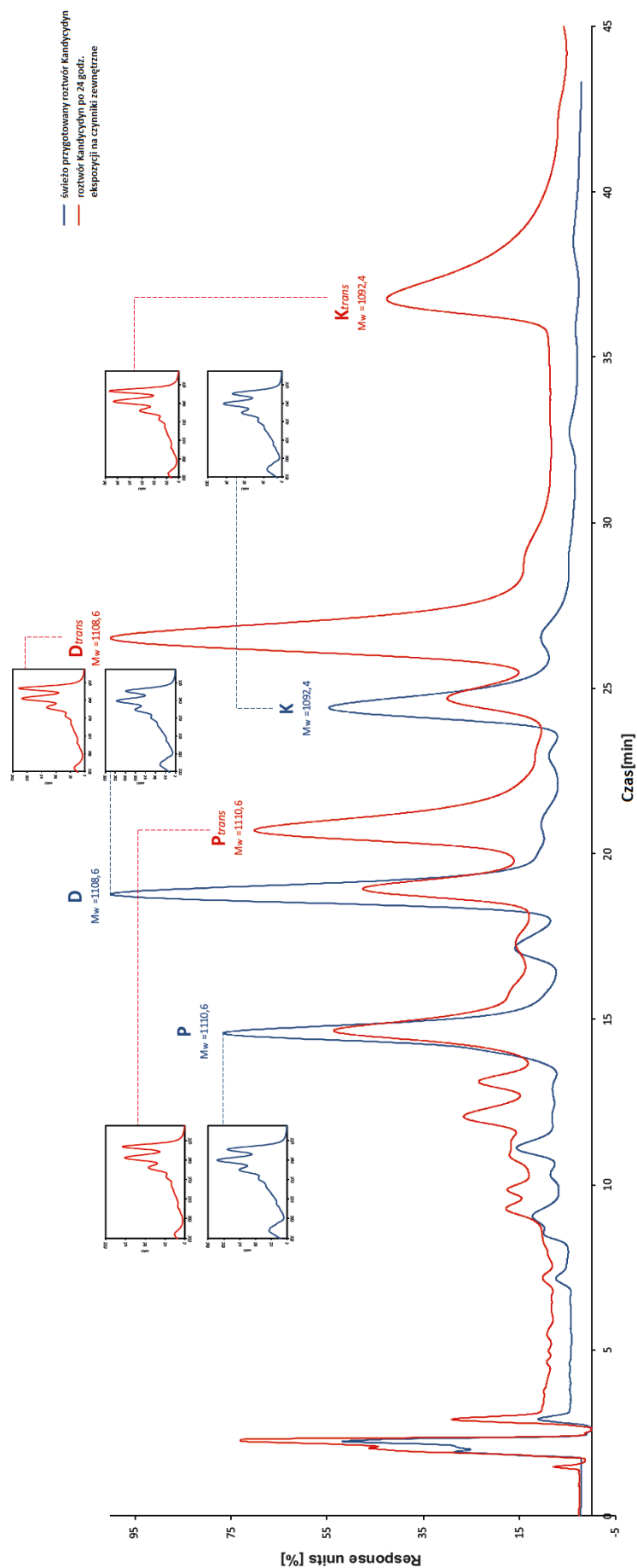
W 2013 r. w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej wykazano, że w rzeczywistości natywna Kandycydyna jest kompleksem jedynie trójskładnikowym, w którym w wyniku izomeryzacji *cis-trans* chromoforu po ekspozycji na działanie światła zachodzącej najczęściej w trakcie procesu izolacji preparatów, ilość składników ulega podwojeniu (**Rys. 17.**). Świadczy o tym pojawianie się dodatkowych pików na chromatogramie, związków o tej samej masie cząsteczkowej, różniących się widmami oscylacyjnymi charakterystycznymi dla izomerów *cis-trans* chromoforu heptaenowego [90]. W związku z uzyskanymi wynikami wprowadzono inne nazewnictwo kandycydyń. Składniki oznaczono jako kandycydyny D, K i P, co będzie przedmiotem rozprawy doktorskiej P. Szczepblewskiego.

Równolegle do badań strukturalnych prowadzone były badania aktywności omawianego kompleksu. Charakteryzuje ją wyjątkowo wysoka aktywność w stosunku do drożdżaków (2-3 rzędy wielkości wyższą niż amfoterycyna B lub nystatyna A₁). Badania ujawniły szerokie spektrum

działania grzybobójczego i grzybostatycznego, m.in. przeciw drobnoustrojom z rodzaju *Candida*, *Aspergillus* czy *Saccharomyces* [91, 92] (**Tabela 2.**).

Tabela 2. Aktywność wybranych antybiotyków polienowych na drobnoustroje z rodzajów *Candida*, *Saccharomyces* i *Aspergillus* [91, 92].

Antybiotyk	MIC (µg/ml)		
	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>
Kandycydyna	0,005	0,001	0,1
amfoterycyna B	0,15	0,09	-
Nystatyna	1,6	-	1,7



Rys. 17. Chromatogram LC-MS kompleksu Kandycydyn świeżo po przygotowaniu analitu (niebieski) i po 24 godzinnej ekspozycji na czynniki zewnętrzne (czerwony). Warunki: kolumna Agilent Eclipse XDB-C18, 125 x 4,6 mm, dp = 5µm, eluent: 38% ACN / 62% CH₃COOEt (5,5 mmol, pH = 4,5), v/v, objętościowe natężenie przepływu ω = 0,6 ml/min, temperatura pokojowa, monitorowana dl. fali λ = 380 nm. [90].

3. 2. Dotychczasowy stan wiedzy o leworynie A₁

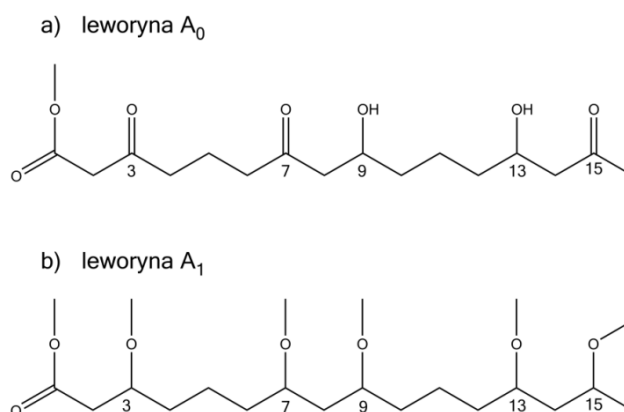
Leworyna A₁ (syn. kandycydyna K) jest jednym ze składników kompleksu antybiotyków o wspólnej nazwie – Leworyna. Produkowana jest przez promieniowce z gatunku *Actinomyces levoris* [93, 94], a izolowana z brzeczki fermentacyjnej przez ekstrakcję butanolem. Analiza kompleksu, wykorzystująca przeciwpłądową chromatografię cieczową w układzie rozpuszczalników chloroform : metanol : bufor boranowy (pH 8,2), ujawniła obecność pięciu składników:

- leworyna A₀ (k = 0,55; zawartość ok. 10%),
- leworyna A₁ (k = 0,73; zawartość ok. 10%) (syn. kandycydyna K),
- leworyna A₂ (k = 0,84; zawartość ok. 62%) (syn. kandycydyna D),
- leworyna A₃ (k = 1,13; zawartość ok. 10%) (syn. kandycydyna P),
- leworyna A₄ (k = 1,27; zawartość ok. 8%) [84].

Inne dane literaturowe podają, że liczba składników w kompleksie wynosi siedem [95]. Wszystkie poznane dotąd związki prezentują jednakową budowę szkieletu pierścienia makrolaktonowego, zmiany strukturalne zachodzą jedynie w obrębie części hydrofilowej aglikonu. Składniki w zależności od budowy cechuje zróżnicowana aktywność, toksyczność i właściwości fizykochemiczne [96-99]. Badania prowadzone przez zespół V. Tsyganova pozwoliły ustalić, że aktywność biologiczna poszczególnych makrolidów polienowych rośnie wraz z ich polarnością: A₀, A₁, A₂, A₃ natomiast ich toksyczność maleje [99]. Badania wykazują, że obok kompleksu Leworyny A, produkowana jest również niewielka ilość kompleksu - Leworyna B, która w odróżnieniu od Leworyny A charakteryzuje się widmem oscylacyjnym, typowym dla chromoforu typu *all-trans*.

Do chwili obecnej ustalono:

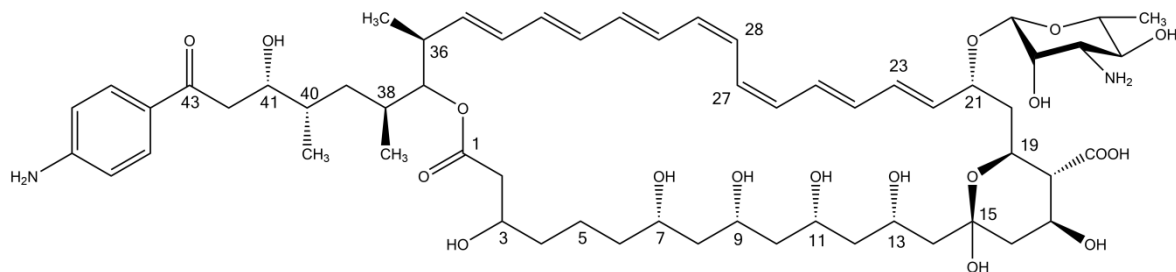
- wstępne struktury leworyny A₀ [100] i leworyny A₁ [101],



Rys. 18. Fragmenty łańcuchów hydrofilowych leworyny A₀ i A₁ [100, 101].

- konstytucję leworyny A₂ (syn. kandycydyny D) w oparciu o analizę spektrometrii mas produktów transformacji chemicznej [86] (**Rys. 16.**).

- oraz stereostrukturę leworyny A₃ (syn. kandycydyny P) dzięki zastosowaniu metod magnetycznego rezonansu jądrowego [102].



Rys. 19. Stereostruktura leworyny A₃ [102].

Stereostruktura leworyny A₁ oraz jej konformacja w roztworze pozostaje nadal niezbadana – fakt ten leży u podstaw badań w niniejszej pracy. Poznanie trójwymiarowej struktury cząsteczki ułatwi zrozumieć mechanizm oddziaływania antybiotyku w błonie patogenów grzybowych.

4. CEL I ZAKRES BADAŃ

Znajomość struktury antybiotyków przeciwgrzybowych stanowi podstawę rozważań natury mechanizmów ich działania, specyficznego oddziaływania ze sterolami w błonach patogenów grzybowych, co wpływa na ich aktywność przeciwgrzybową, oraz możliwość projektowania nowych pochodnych polienów o poprawionym indeksie terapeutycznym. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) jest jedyną metodą, która umożliwia poznanie przestrzennej struktury tej klasy związków z uwagi na niemożliwość uzyskania antybiotyków w formie kryształów i związane z tym ograniczenia w stosowaniu krystalografii rentgenowskiej.

Celem pracy było:

- wyjaśnienie natury niestabilności strukturalnej nystatyny A₁, przedstawiciela antybiotyków z grupy wielopierścieniowych makrolidów polienowych, oraz identyfikację strukturalną powstających produktów. Wytlumaczenie przemian zachodzących w cząsteczce nystatyny A₁ jest ważne z uwagi na jej praktyczne zastosowanie jako leku przeciwgrzybiczego. Zgodnie z podjętymi założeniami, makrocycliczny pierścień cząsteczki nystatyny A₁ ulega wewnątrzcząsteczkowej reakcji translaktonizacji, w wyniku której powstaje izomer konstytucyjny związku, *izo-nystatyna* A₁, przemiany te zależą od pH środowiska,
- ustalenie stereostruktury kandycydyny D, głównego składnika kompleksu Kandycydyny, przedstawiciela aromatycznych makrolidów polienowych wykazujących najwyższą aktywność przeciwgrzybową wśród polienów,
- potwierdzenie konstytucji oraz ustalenie stereostruktury leworyny A₁, jednego ze składników kompleksu Leworyny, reprezentanta aromatycznych makrolidów polienowych.

Zakres badań obejmował:

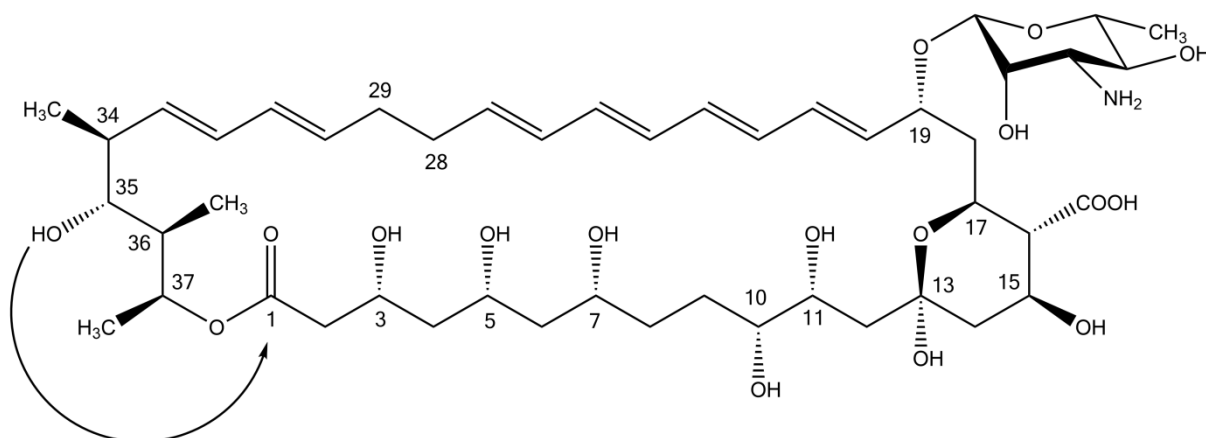
- przeprowadzenie kompleksów antybiotycznych w pochodne, na drodze *N*-acetylowania grupy aminowej mykozaminy oraz estryfikacji grupy karboksylowej omawianych makrolidów polienowych, konieczne do poprawienia rozpuszczalności związków i ułatwienia procesu izolacji składników z wykorzystaniem chromatografii,
- wykorzystanie odpowiednich metod chromatograficznych do otrzymania pochodnej o określonej czystości, niezbędnej do przeprowadzenia analizy strukturalnej (RP-HPLC w skali semipreparatywnej czy chromatografia typu FLASH),
- identyfikację strukturalną pochodnej danego związku w oparciu o analizę eksperymentów NMR, wykonanych przy pomocy spektrometru Varian Unity 500 Plus, dostępnego w Międzyuczelnianym Laboratorium Magnetycznego Rezonansu Jądrowego Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej,

- dodatkowo odnośnie nystatyny A₁, przeprowadzenie inkubacji preparatu handlowego Nystatyny w określonych warunkach celem zainicjowania reakcji translaktonizacji oraz wykonanie analizy konformacyjnej aglikonu należącego do cząsteczki nystatyny A₁ z zastosowaniem metod dynamiki molekularnej w polu siłowym CHARMM w celu poznania uwarunkowań konformacyjnych niezbędnych do zajścia reakcji translaktonizacji.

5. WYNIKI I WNIOSKI

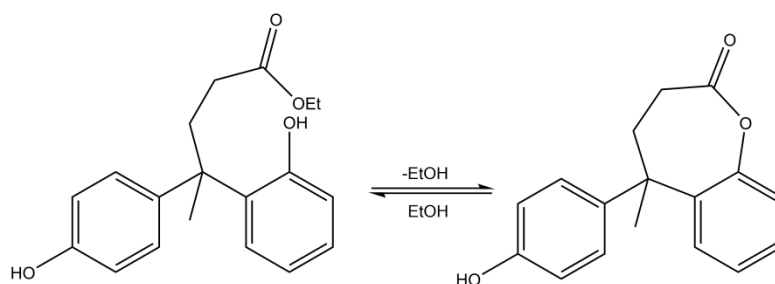
5. 1. Reakcja transestryfikacji nystatyny A_1 i powstawanie jej izomeru, *izo-nystatyny* A_1

Kontynuowane przeze mnie badania w zakresie przemian dotyczących nystatyny A_1 pozwoliły stwierdzić, że w cytowanej publikacji L. Ostrosky-Zeichner i wsp. [73] niewłaściwie zinterpretowano dane spektralne, przypisując je dwóm konformerom nystatyny A_1 . Początkowe przypuszczenia zakładały, że niestabilność strukturalna cząsteczki nystatyny A_1 może wynikać ze zmian w geometrii wiązań podwójnych chromoforu lub otwarcia pierścienia hemiacetalowego. Uzyskany przeze mnie zestaw danych spektralnych pozwolił na wysunięcie hipotezy, że wspomniane dwie formy nystatyny A_1 nie są różnymi konformerami, tylko izomerami wynikającymi ze zjawiska translaktonizacji (**Rys. 20.**), prowadzącego do powstawania nowego strukturalnie izomerycznego związku. Zmiany te zależą od pH środowiska i zachodzą już w środowisku lekko kwaśnym bądź lekko zasadowym. Wyjaśnienie natury niestabilności nystatyny A_1 jest ważne z uwagi na zastosowanie antybiotyku w celach medycznych. Wyniki przedstawiono w publikacji. Bogaty materiał badawczy znajduje się w części uzupełniającej artykułu.

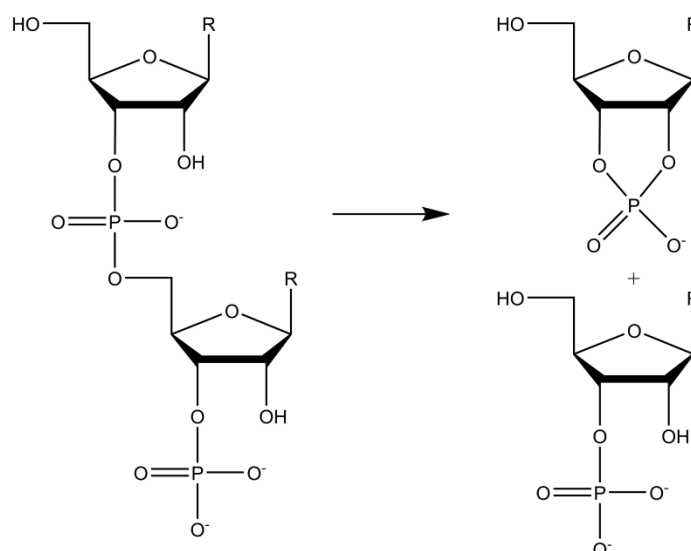


Rys. 20. Stereostruktura nystatyny A_1 . Strzałką zaznaczono postulowany kierunek reakcji translaktonizacji.

Zjawisko transestryfikacji jest dobrze poznane i zachodzi według mechanizmów podobnych do hydrolizy estrów, z tym wyjątkiem, że ROH zastępuje cząsteczkę wody, co za tym idzie odbywa się z rozpadem acyl - tlen [103]. Katalizatorami transestryfikacji mogą być kwasy i zasady, a także biokatalizatory (np. immobilizowane lipazy). Reakcji tej ulegać mogą estry wszystkich kwasów, nie tylko kwasów karboksylowych. Przykładem wewnątrzcząsteczkowej reakcji może być transestryfikacja 4-(4-hydroksyfenilo)-4-(2-hydroksyfenilo)-pentanianu etylu [104] (**Rys. 21.**) lub reakcja transestryfikacji wiązania fosfordiestrowego RNA, która jest jedną z reakcji powodujących obniżenie trwałości tego biopolimeru w stosunku do DNA [105] (**Rys. 22.**).

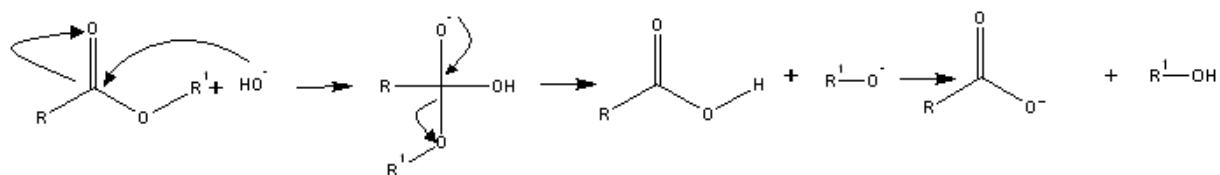


Rys. 21. Wewnętrzcząsteczkowa transestryfikacja 4-(4-hydroksyfenylo)-4-(2-hydroksyfenylo)-pentanianu etylu [104].

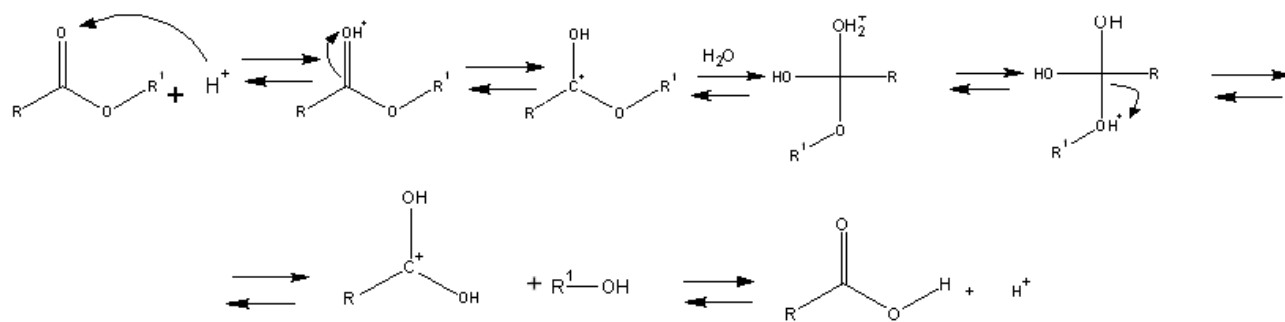


Rys. 22. Transestryfikacja diirybonukleotydu z wytworzeniem cyklicznego 2',3'-fosforanodiestru [105].

Laktony są wewnątrzcząsteczkowymi estrami hydroksykwasów, w których grupa estrowa znajduje się w ugrupowaniu cyklicznym. Hydroliza laktonów katalizowana jest zazwyczaj przez kwasy lub zasady. Gdy reakcja prowadzona jest w środowisku zasadowym, to grupą atakującą jest znacznie silniejszy odczynnik nukleofilowy, np. grupa OH^- [103] (**Rys. 23.**). Hydroliza w środowisku zasadowym prowadzi, przez tetraedryczny produkt pośredni do utworzenia soli kwasu. Kataliza kwasowa polega na zwiększaniu ładunku dodatniego na karbonylowym atomie węgla, dzięki temu grupa odchodząca odszczepia się znacznie łatwiej (**Rys. 24.**). Hydroliza estrów jest reakcją odwracalną i daje dobre wyniki tylko wówczas, kiedy istnieje możliwość przesunięcia równowagi w kierunku produktów. Ponieważ utworzenie soli kwasów, w przypadku katalizy zasadowej, przesunęła równowagę, zatem jeżeli związek nie jest labilny w pH powyżej 7, w celach preparatywnych hydrolizę estrów przeprowadza się w środowisku zasadowym [103]. W przypadku translaktonizacji grupa hydroksylowa, atakująca wiązanie laktonowe, znajduje się wewnątrz pierścienia laktonowego.



Rys. 23. Hydroliza estrów w środowisku zasadowym [103].



Rys. 24. Hydroliza estrów w środowisku kwaśnym [103].

Intramolecular transformation of an antifungal antibiotic nystatin A₁ into its isomer, *iso*-nystatin A₁ – structural and molecular modeling studies

Katarzyna Szwarz,^{a*} Marcin Płosiński,^a Karolina Czerniejewska,^a Tomasz Laskowski,^a Arkadiusz Leniak,^b Jacek Czub,^c Paweł Kubica,^d Paweł Sowiński,^e Jan Pawlak^a and Edward Borowski^a

ABSTRACT Nystatin A₁, a polyene macrolide antifungal antibiotic, in a slightly basic or acidic solution undergoes an intramolecular transformation, yielding a structural isomer, the transactonization product, *iso*-nystatin A₁ with lactone ring diminished by two carbon atoms. Structural evidence is provided by advanced NMR and Mass Spectrometry (MS) studies. Molecular dynamics simulations and quantum mechanics calculations gave the insight into the course and mechanism of the transformation and its effect on the conformation of the subject molecule. Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: NMR; ¹H; ¹³C; nystatin A₁; transactonization; isomeric form; *iso*-nystatin A₁; molecular modeling

Introduction

Nystatin A₁, **1** (Fig. 1), is an important antifungal antibiotic, which for over half a century has been broadly used in medicine for the treatment of topical fungal infections caused by a broad spectrum of fungal pathogens comprising yeast-like and filamentous species. Its antifungal activity is due to the formation in cytoplasmic membrane of a permeabilizing species that lethally affects membrane transport.^[1] It is of importance that **1** is also active towards multi-drug resistant strains. The compound is a polyene macrolide of the tetraene-diene group. It is produced by *Streptomyces noursei* strain as a complex of closely related compounds with **1** being the main component. The minor components of the antibiotic complex are nystatin A₂ and nystatin A₃.^[2] The composition^[3] and configuration^[4] of **1** have been elucidated (Fig. 1).

In our studies on the chemistry, properties and chemical modifications of **1**, we noticed, that when the water insoluble antibiotic is dissolved in organic solvents under slightly basic or acidic conditions, forming true solutions with molecular dispersion, some structural changes occur as evidenced by the NMR spectra.^[5] This observation prompted us to undertake the systematic studies on the observed phenomenon. The structure changes were confirmed by MS and advanced NMR studies. The course and mechanism of the transformation, as well as free energy changes, were analyzed by molecular dynamics and molecular mechanics methods.

Materials and Methods

Materials

Nystatin ≥70% (UV) was purchased from Sigma-Aldrich (Romania). The antibiotic complex contains 90% of nystatin A₁ (**1**) and 10%

of nystatin A₂ (NMR analysis). All organic solvents were purchased from commercial sources and used without further purification.

Methods

Generation of *iso*-nystatin A₁ (**2**)

A total of 0.5 ml of nystatin stock solution (300 mg/ml in dimethyl sulfoxide) was added to 4.5 ml of sodium phosphate buffer, pH 7.5 or 6.5 and further processed in the same way. The mixtures were vortexed for 1 min at room temperature. The formed suspensions were then diluted with 12.5 ml of methanol, vortexed for 5 min and then allowed to incubate at 37 °C overnight (16–18 h). After incubation, 5 ml of *n*-butanol was added, and water and methanol were removed from resulting solutions under reduced pressure. The precipitates formed upon the addition of 30 ml of

* Correspondence to: Katarzyna Szwarz, Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Faculty of Chemistry, Gdansk University of Technology, Narutowicza St. 11/12, 80-233 Gdansk, Poland. E-mail: katszwarz@wp.pl

a Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Faculty of Chemistry, Gdansk University of Technology, Gdansk, Poland

b Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

c Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdansk University of Technology, Gdansk, Poland

d Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdansk University of Technology, Gdansk, Poland

e Międzyuczelniane Laboratorium Magnetycznego Rezonansu Jądrowego, Faculty of Chemistry, Gdansk University of Technology, Gdansk, Poland

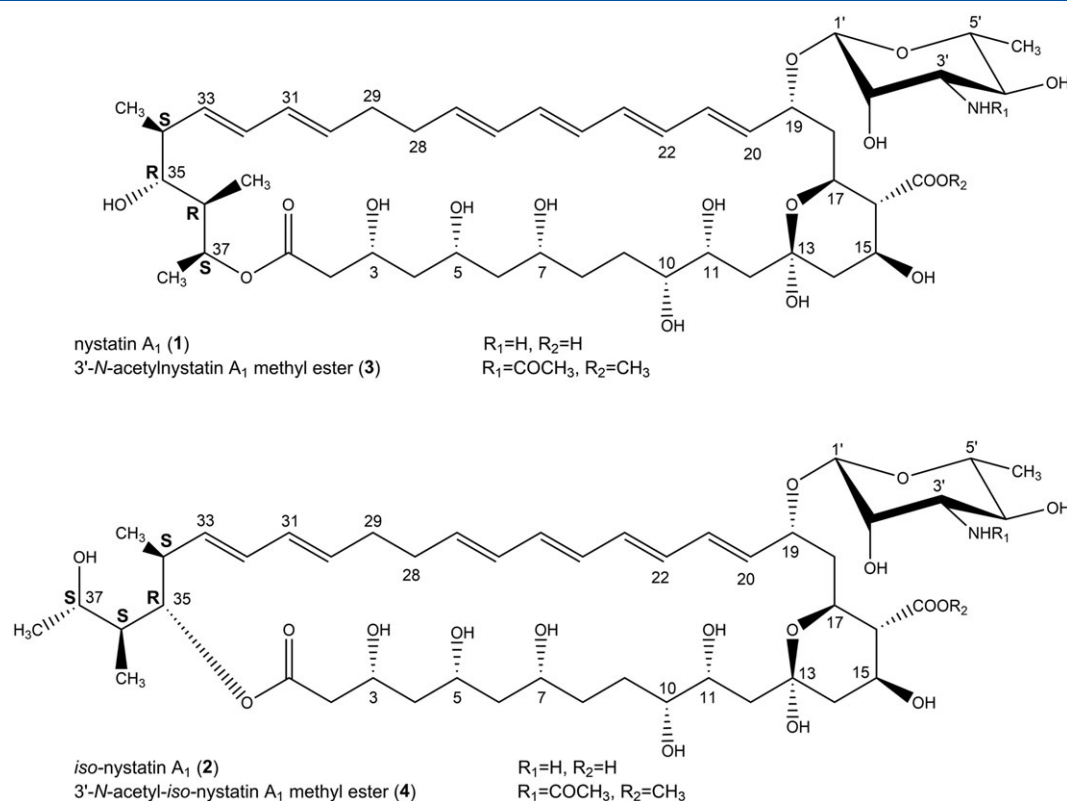


Figure 1. The stereostructure of nystatin A₁ (1) and its structural isomer *iso*-nystatin A₁ (2).

ethyl ether were centrifuged. The precipitates were washed three times with 30 ml of ethyl ether and dried under reduced pressure to yield 100 mg of crude reaction mixture. The new set of signals observed in ¹H NMR spectrum was used to monitor the reaction progress. The crude reaction mixture was derivatized, and reaction products were isolated as follows.

3'-N-acetylnystatin A₁ methyl ester (3) and 3'-N-acetyl-*iso*-nystatin A₁ methyl ester (4)

The crude reaction mixture was *N*-acetylated by the following procedure: To a suspension of 200 mg of reaction products in methanol (20 ml), acetic anhydride (80 μl) was added. The *N*-acetylation was carried out at room temperature for 15 min, and its progress was monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) (Si60, Merck, Darmstadt, Germany) using the solvent system EtOAc/AcOH/H₂O (4:1:1), 3'-N-acetylnystatin A₁ *R_f*=0.29, 3'-N-acetyl-*iso*-nystatin A₁ *R_f*=0.27. After 15 min, the reaction mixture was centrifuged, and 5 ml of *n*-butanol was added to the supernatant. Volume of the resulting solution was reduced under vacuum. The products were precipitated from *n*-butanol solution with 30 ml of ethyl ether and centrifuged. The precipitate was washed three times with 30 ml of ethyl ether and dried under reduced pressure to yield the *N*-acetylated derivatives (180 mg).

To obtain 3'-N-acetylated derivatives (180 mg), dissolved in methanol (180 ml), diazomethane in ethyl ether was added dropwise. The reaction was performed at room temperature, and its progress was monitored by TLC using the solvent system EtOAc/AcOH/H₂O (4:1:1), (3: *R_f*=0.38, 4: *R_f*=0.37), as well as the solvent system CHCl₃/MeOH/H₂O (5:1:0.1), (3: *R_f*=0.18, 4: *R_f*=0.13). After further addition of 6 ml of *n*-butanol, methanol was evaporated under reduced pressure. The mixture was then precipitated from *n*-butanol solution

with 50 ml of dry ethyl ether and centrifuged. The precipitate was washed three times with 30 ml of ethyl ether and dried under vacuum to yield a crude mixture (160 mg).

The same method was used for the derivatization of nystatin complex without conversion reaction, and isolation of 3 from it, as reference to the other analytes (LC-MS, NMR).

LC-MS analysis

Samples of crude precipitates were analyzed with an Agilent 1290 Infinity LC system containing binary pump, autosampler, thermostated column compartment and diode array detector. Reverse-phase column Poroshell 120 EC-C18 (2.7 μm, 4.6 × 150 mm) was used. The pore diameter 2.7 μm was necessary to obtain narrow and symmetrical peaks. The column oven temperature was set to 30 °C. The mobile phase was a mixture of acetonitrile, methanol and 0.1 % formic acid in water (35:35:30) in isocratic condition. Flow rate of mobile phase was set to 1 ml/min, while injection volume was set to 5 μl, and sample concentration was 1 mg/ml. The monitored wavelength was 304 nm. High-resolution mass spectrometry measurements were performed on a 6540 Ultra High Definition (UHD) accurate-mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) spectrometer using positive electrospray ionization mode.

The preliminary purification by flash chromatography

The purification of 3 and 4 mixture was performed by the flash chromatography on the Merck Kieselgel 60 high-purity grade silica gel, 0.063–0.200 mm, using the solvent system CHCl₃/MeOH/H₂O (10:1.5:0.15) to yield 150 mg. Other components of the reaction mixture including derivatized nystatin A₂ and its *iso*-version were discarded.

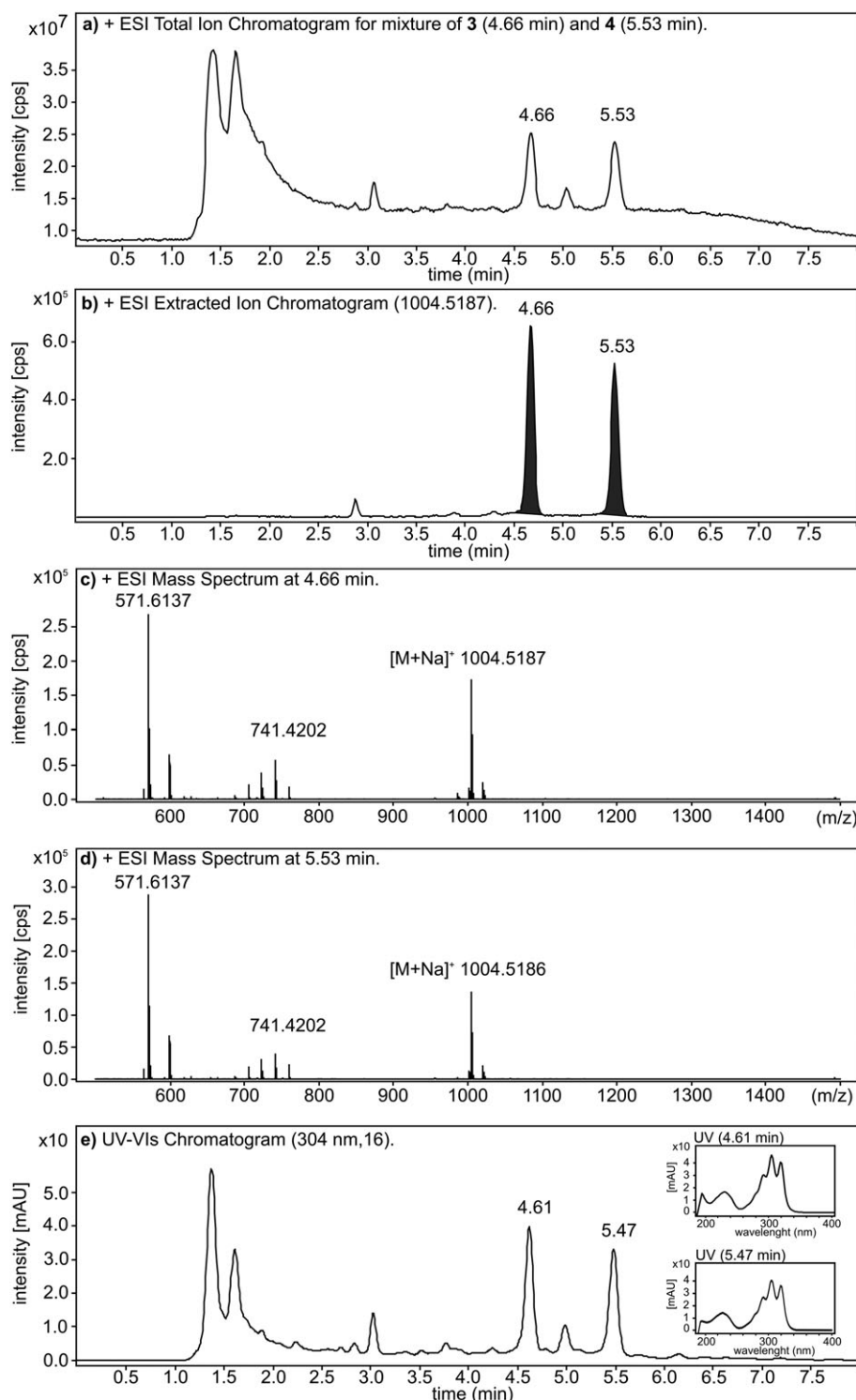


Figure 2. The LC-MS analysis of crude precipitate of **3** and **4** mixture before purification by flash chromatography. The first few peaks correspond to components of the reaction impurities. **3** elutes at a retention time of 4.66 min, and **4** elutes at a retention time of 5.53 min.

The automated flash chromatography separation

The separation of **3** and **4** mixture was performed using Interchim PuriFlash®430 automated flash chromatography system with a jumbo pack silica HP 30 μ m 12 g flash column having a flow rate of 5 ml/min and λ detection = 303 nm. The mobile phase contained chloroform, methanol and water (10:1.5:0.15), yield 7 mg of **3** and 8 mg of **4**.

NMR spectra

The NMR spectra of **3** and **4** were recorded using a Varian Unity 500 Plus spectrometer (500 MHz) at ambient temperature, with samples concentration of 10 mg/ml. Chemical shifts are reported in δ (ppm) units using ¹H (residual) from pyridine-*d*₅ (7.19 ppm) as internal standard. The 1D ¹H NMR

Table 1. ^{13}C and ^1H NMR spectroscopic data (500 MHz, pyridine- d_5) for **3**

No.	δ_{C} (p.p.m.), type	δ_{H} (p.p.m.)	$J_{\text{H,H}}$ [Hz]	ROE contacts
Aglycone				
1	171.5, C	—	—	—
2a	43.5, CH_2	2.71	15.1(2b), 4.5(3)	2b, 3, 4a, 4b
2b	—	2.80	15.1(2a), 8.3(3)	2a, 3, 4a, 4b
3	67.5, CH	4.75	4.5(2a), 8.3(2b), 4.4(4a), 8.5(4b)	2a, 2b, 4a, 4b, 5
4a	45.0, CH_2	1.87	4.4(3), 14.0(4b), 3.7(5)	2a, 2b, 3, 4b, 5
4b	—	2.01	8.5(3), 14.0(4a), 8.7(5)	2a, 2b, 3, 4a, 5
5	71.0, CH	4.48	3.7(4a), 8.7(4b), 3.5(6a), 8.6(6b)	3, 4a, 4b, 6a, 6b, 7
6a	45.0, CH_2	1.81	3.5(5), 13.9(6b), 3.1(7)	5, 6b, 7
6b	—	1.91	8.6(5), 13.9(6a), 7.0(7)	5, 6a, 8b
7	71.5, CH	4.19	3.1(6a), 7.0(6b), 3.7(8a), 9.0(8b)	5, 6a, 6b, 8a, 9a, 9b/8b, 24, 26
8a	36.0, CH_2	1.90	3.7(7), $^{\text{a}}$ (8b), $\sim$ 3(9a), $\sim$ 9.5(9b)	7, 8b, 9b, 10
8b	—	2.17	9.0(7), $^{\text{a}}$ (8a), $^{\text{a}}$ (9a), $^{\text{a}}$ (9b)	6b, 7, 8a, 10
9a	30.0, CH_2	2.09	$\sim$ 3(8a), $^{\text{a}}$ (8b), $^{\text{a}}$ (9b), 3.3(10)	7, 9b, 10, 11
9b	—	2.21	$\sim$ 9.5(8a), $^{\text{a}}$ (8b), $^{\text{a}}$ (9a), 9.1(10)	7, 8a, 9a, 11
10	75.0, CH	3.89	3.3(9a), 9.1(9b), 3.1(11)	8a, 8b, 9a, 11, 12a, 12b
11	72.0, CH	4.80	3.1(10), $\sim$ 3(12a), 10.8(12b)	9a, 10, 12a, 20, 22, 23, 24
12a	43.0, CH_2	2.17	$\sim$ 3(11), 14.0(12b)	10, 11, 12b, 14a
12b	—	2.46	10.8(11), 14.0(12a)	10, 12a, 14b
13	99.0, C	—	—	—
14a	46.0, CH_2	1.88	$\sim$ 13(14b), 10.5(15)	12a, 14b, 16
14b	—	2.66	$\sim$ 13 (14a), 4.6(15)	12b, 14a, 15
15	66.5, CH	5.08	10.5(14a), 4.6(14b), 10.5(16)	14b, 16, 17, COOMe
16	59.0, CH	2.88	10.5(15), 10.5(17)	14a, 15, 17, 18a, 18b, 19, COOMe
17	67.0, CH	4.92	10.5(16), $\sim$ 2.5(18a), 9.5(18b)	15, 16, 18a, 18b, 19, COOMe, 2', 3'
18a	38.5, CH_2	2.16	$\sim$ 2.5(17), 14.2(18b), 7.8(19)	17, 19
18b	—	2.26	9.5(17), 14.2(18a), 3.6(19)	17, 19
19	76.5, CH	4.98	7.8(18a), 3.6(18b), 7.7(20)	16, 17, 18a, 18b, 20, 21, 1', 2'
20	134.5, CH	6.17	7.7(19), 15.2(21)	11, 17, 19
21	132.0, CH	6.62	15.2(20), 10.5(22)	1', 19
22	132.5, CH	6.35	10.5(21), 15.0(23)	11
23	133.5, CH	6.23	15.0(22), 10.5(24)	21
24	131.5, CH	6.24	10.5(23), 14.1(25)	7
25	133.5, CH	6.05	14.1(24), 10.6(26)	27
26	132.0, CH	6.16	10.6(25), 15.0(27), <2 (28a), <2 (28b)	5, 7, 28a, 28b
27	132.0, CH	5.67	15.0(26), $\sim$ 6(28a), $\sim$ 6(28b)	—
28a	32.5, CH_2	2.16	$\sim$ 6(27), $^{\text{a}}$ (29a), $^{\text{a}}$ (29b), <2 (26)	26
28b	—	2.16	$\sim$ 6(27), $^{\text{a}}$ (29a), $^{\text{a}}$ (29b), <2 (26)	26
29a	32.5, CH_2	2.16	$^{\text{a}}$ (28a), $^{\text{a}}$ (28b), $\sim$ 6(30), <2 (31)	—
29b	—	2.16	$^{\text{a}}$ (28a), $^{\text{a}}$ (28b), $\sim$ 6(30), <2 (31)	—
30	134.5, CH	5.67	$\sim$ 6(29a), $\sim$ 6(29b), 14.8(31)	32
31	132.0, CH	6.19	<2 (29a), <2 (29b), 14.8(30), 10.2(32)	33
32	130.5, CH	6.35	10.2(31), 15.2(33)	30, 34, Me34
33	136.0, CH	5.83	15.2(32), 8.4(34)	31, 34, 35, Me34
34	41.5, CH	2.66	8.4(33), 6.6(Me34), 7.4(35)	32, 33, 35, 36, 37, Me34, Me36
Me34	17.5, CH_3	1.29	6.6(34)	36, 34, 35, 33, 32
35	77.5, CH	3.55	7.4(34), 4.4(36)	33, 34, 36, 37, Me34, Me36, Me37
36	40.5, CH	2.27	4.4(35), 7.2(Me36), 4.7(37)	33, 34, 35, 37, Me34, Me36, Me37
Me36	13.0, CH_3	1.12	7.2(36)	34, 35, 36, 37, Me37
37	71.5, CH	5.73	4.7(36), 6.4(Me37)	34, 35, 36, Me36, Me37
Me37	17.5, CH_3	1.41	6.4(37)	35, 36, 37, Me36
COOMe	174.5, C	—	—	—
COOMe	51.5, CH_3	3.68	—	1', 2', 3', 15, 16, 17, 18a
Mycosamine moiety				
1'	99.5, CH	4.93	<2 (2')	2', 3', 5', 18a, 18b, 19, COOMe

(Continues)

No.	δ_C (p.p.m.), type	δ_H (p.p.m.)	J_{HH} [Hz]	ROE contacts
Aglycone				
2'	71.0, CH	4.45	<2(1'), 3.0(3')	1', 17, 19, NH, COOMe
3'	56.5, CH	4.69	3.0(2'), 8.5(NH'), 9.6(4')	1', 5', 17, NH, COOMe, NHCOMe
4'	72.0, CH	4.04	9.6(3'), 9.6(5')	6', NH
5'	75.0, CH	3.68	9.6(4'), 6.2(6')	1', 2', 3', 6'
6'	18.5, CH ₃	1.55	6.2(5')	4', 5'
NH(CO)Me	—	8.85	8.5(3')	2', 3', 4', N(CO)Me
NH(CO)Me	171.0, C	—	—	—
NH(CO)Me	23.0, CH ₃	2.08	—	2', 3', NH

^a These coupling constants could not be measured.

spectra were collected with digital resolution of 0.5 Hz. The ¹H 90° pulse length was 9.2 μs.

Two-dimensional ¹H spectra were measured in the phase-sensitive mode with a spectral width of 4336 Hz.

The double-quantum filtered (DQF)–COSY spectrum was acquired in a 6016 × 750 matrix with 16 accumulations per increment and was processed in a 4 K × 2 K matrix.

The ROESY spectrum was acquired with a mix time of 300 ms in a 2048 × 300 matrix with 24 accumulations per increment in a 2 K × 1 K matrix.

The HSQC and HMBC experiments were performed with pulse field gradients.

The HSQC spectrum was acquired in the phase-sensitive mode with 1 J(CH) set to 140 Hz. The spectral windows for ¹H and ¹³C axes were 4336 Hz and 19 482 Hz, respectively. The data were collected in a 1664 × 155 matrix and processed in a 2 K × 1 K matrix.

The HMBC spectrum was acquired in absolute value mode with nJ(CH) set to 9 Hz. The spectral windows for ¹H and ¹³C axes were 4336 Hz and 22 626 Hz, respectively. The data were collected in a 1920 × 320 matrix and processed in a 2 K × 1 K matrix.

Molecular modeling – free energy profile for the nystatin A₁ (1) conformational transition

To determine the free energy profile for **1** conformational transition preceding the nucleophilic attack of the OH-35 group at the C1 atom, we used the umbrella sampling approach^[6] with the conformational coordinate defined as the distance between the O35 and C1 atoms (Fig. 5). To this end, ten independent 100-ns-long Molecular Dynamics (MD) simulations of the system described in first paragraph were performed with the harmonic potential [force constant 200 kJ/(mol·nm²)] restraining the C1–O35 distance to successive values between 0.2 and 0.45 nm with the fixed increment of 0.025 nm. The starting configurations for these equally spaced umbrella windows were prepared in steered MD simulation during which the C1–O35 distance was gradually reduced over 10 ns from 4.5 (typical for the fully extended macrolactone ring) to 2.0 Å (corresponding to the van der Waals contact between O35 and C1) using the moving harmonic potential with a force constant of 1000 kJ/(mol·nm²). The obtained umbrella sampling data were combined using the weighted histogram analysis method.^[7]

Results and Discussion

Chemistry of isomeric form of nystatin A₁ (2)

After the translactonization reaction, mixture of **1** and **2** was derivatized by *N*-acetylation and etherification, which facilitated the purification process of isomers and, more importantly, enabled their chromatographic separation. The advantage of this polyene macrolide derivative is also good solubility in a wide variety of NMR solvents.

The LC-MS analysis of crude precipitate of **3** and **4** was performed before purification by flash chromatography. Two peaks of interest of approximately equal *m/z* were observed at 4.66 and 5.53 min (Fig. 2). The first peak was identified as the ion at *m/z* 1004.5187 of the (M+Na)⁺ adduct type [calculated for C₅₀H₇₉NO₁₈ *m/z* 1004.5195 of (M+Na)⁺, error of mass measurement accuracy Δ = 1.0 p.p.m.] while the second one as the ion at similar *m/z* 1004.5186 of the (M+Na)⁺ adduct type [calculated for C₅₀H₇₉NO₁₈ *m/z* 1004.5195 of (M+Na)⁺, error of mass measurement accuracy Δ = 0.9 p.p.m.].

The same chromatographic and detection conditions were used for analysis of nystatin complex without conversion reaction (see Supporting Information for more detailed information). At a retention time of 4.66 min, the ion at *m/z* 1004.5205 of the (M+Na)⁺ adduct type and corresponding to **3** was observed [calculated for C₅₀H₇₉NO₁₈ *m/z* 1004.5195 of (M+Na)⁺, error of mass measurement accuracy Δ = 1.0 p.p.m.], on the basis of which the retention time of derivatized isomer **4** was identified as 5.53 min.

The NMR studies, consisting of DQF–COSY, ROESY, HSQC and HMBC experiments allowed for full proton and carbon assignments of **3** and **4**, which are presented in Tables 1 and 2. The vicinal coupling constants were extracted from 1D ¹H NMR spectrum of **3** and **4**, and in some cases from the analysis of the phase structure of the cross-peaks observed in the DQF–COSY spectra. Spectral data collected for **3** were used as a reference in structural analysis of the isomer **4**.

Analysis of the 1D ¹H NMR spectra of the two molecules showed that they differ structurally. There are noticeable differences in chemical shifts of the methyl groups in the area of aliphatic protons (Fig. 3). A characteristic signal observed in the spectrum of **4**, corresponding to the H37 proton, is a doublet of doublets (δ = 5.27 p.p.m.) and was not registered in the ¹H spectrum of **3**. In addition, in the spectrum of **4**, the signal with chemical shift of δ = 3.55 p.p.m. is not observed.

Table 2. ^{13}C and ^1H NMR spectroscopic data (500 MHz, pyridine- d_5) for 4

No.	δ_{C} (p.p.m.), type	δ_{H} (p.p.m.)	$J_{\text{H,H}}$ [Hz]	ROE contacts
Aglycone				
1	172.0, C	—	—	—
2a	43.5, CH_2	2.62	15.5(2b)', 4.9(3)	2b, 3, 4a, 4b
2b	—	2.75	15.5(2a), 7.8(3)	2a, 3, 4a, 4b, 37
3	67.5, CH	4.58	4.9(2a), 7.8(2b), 2.8(4a), 9.3(4b)	2a, 2b, 4a, 4b, 5
4a	45.5, CH_2	1.81	2.8(3), 13.9(4b), 4.6(5)	2a, 2b, 3, 4b, 5
4b	—	1.99	9.3(3), 13.9(4a), 8.1(5)	2a, 2b, 4a, 3, 5
5	71.5, CH	4.49	4.6(4a), 8.1(4b), 3.0(6a), 8.1(6b)	3, 4a, 4b, 6a, 6b, 7, 22, 28
6a	45.0, CH_2	1.86	3.0(5), $^a(6b)$, $^a(7)$	5, 6b, 7
6b	—	1.92	8.1(5), $^a(6a)$, $^a(7)$	5, 6a, 7
7	72.0, CH	4.23	$^a(6a)$, $^a(6b)$, $^a(8a)$, 8.9(8b)	5, 6a, 6b, 8a, 8b, 9a, 9b, 22, 24, 26
8a	36.0, CH_2	1.95	$^a(7)$, $^a(8b)$, $^a(9a)$, $^a(9b)$	7, 8b
8b	—	2.15	8.9(7), $^a(8a)$, $^a(9a)$, $^a(9b)$	7, 8a
9a	30.0, CH_2	2.15	$^a(8a)$, $^a(8b)$, $^a(9b)$, 8.6(10)	10, 9b
9b	—	2.15	$^a(8a)$, $^a(8b)$, $^a(9a)$, 3.0(10)	10, 9a
10	74.5, CH	3.91	8.6(9a), 3.0(9b), 2.8(11)	8a, 9a, 9b, 12a, 12b, 11
11	72.0, CH	4.82	2.8(10), ~3(12a), 11.0(12b)	8a, 9a, 9b, 10, 12a, 19, 20, 22, 21
12a	43.0, CH_2	2.15	~3(11), 14.2(12b)	11
12b	—	2.44	11.0(11), 14.2(12a)	11
13	99.0, C	—	—	—
14a	46.0, CH_2	1.87	12.5(14b), 10.5(15), 3.5(13-OH)	16
14b	—	2.65	12.5(14a), 4.6(15)	15
15	66.5, CH	5.08	10.5(14a), 4.6(14b), 10.5(16)	14b, 16, COOMe, 17
16	59.0, CH	2.88	10.5(15), 10.5(17)	14a, 15, 17, 18b, 18a, 19, COOMe
17	67.0, CH	4.89	10.5(16), 2.5(18a), 9.5(18b)	15, 16, 18a, 18b, 20, COOMe, 2', 3'
18a	39.0, CH_2	2.14	2.5(17), 14.0(18b), 8.2(19)	16, 17, 18b, 19, 1'
18b	—	2.26	9.5(17), 14.0(18a), 3.5(19)	16, 17, 18a, 19, 1'
19	77.0, CH	4.98	8.2(18a), 3.5(18b), 8.2(20)	11, 16, 18a, 18b, 20, 21, 1', 2'
20	135.0, CH	6.12	8.2(19), 15.3(21)	11, 17, 18a, 19, 22,
21	132.0, CH	6.65	15.3(20), 10.5(22)	11, 19, 23
22	133.0, CH	6.34	10.5(21), 14.2(23)	5, 7, 11, 19, 20
23	131.5, CH	6.23	14.2(22), 11.0(24)	21
24	133.5, CH	6.26	11.0(23), 14.0(25)	—
25	133.5, CH	5.94	14.0(24), 10.5(26)	27
26	132.0, CH	6.15	10.5(25), 15.0(27), <3.5(28a), <3.5(28b)	—
27	132.5, CH	5.62	15.0(26), ~6(28a), ~6(28b)	25
28a	32.5, CH_2	2.13	~6(27), $^a(29a)$, $^a(29b)$, <3.5(26)	—
28b	—	2.13	~6(27), $^a(29a)$, $^a(29b)$, <3.5(26)	—
29a	32.5, CH_2	2.13	$^a(28a)$, $^a(28b)$, ~6(30), <3(31)	—
29b	—	2.13	$^a(28a)$, $^a(28b)$, ~6(30), <3(31)	—
30	134.5, CH	5.63	~6(29a), ~6(29b), 14.5(31)	32
31	132.0, CH	6.19	<3(29a), <3(29b), 14.5(30), 10.9(32)	—
32	130.5, CH	6.21	10.9(31), 14.6(33)	30, 34, 35, Me34
33	135.5, CH	5.87	14.6(32), 6.5(34)	34, 35, Me34
34	37.5, CH	2.67	6.5(33), 6.7(Me34), 2.4(35)	32, 33, 35, 36, Me34, Me36
Me34	12.0, CH_3	1.11	6.7(34)	32, 33, 35, 36
35	77.5, CH	5.27	2.4(34), 10.4(36)	32, 33, 34, 36, 37, Me34, Me36, Me37
36	41.5, CH	2.38	10.4(35), 7.0(Me36), 3.9(37)	34, 35, 37, Me34, Me37
Me36	9.5, CH_3	1.07	7.0(36)	34, 35, 37, Me37
37	66.0, CH	4.38	3.9(36), 6.3(Me37)	2b, 34, 35, 36, Me36, Me37
Me37	18.0, CH_3	1.33	6.3(37)	35, 36, 37, Me36
COOMe	174.5, C	—	—	—
COOMe	51.5, CH_3	3.67	—	15, 16, 18a, 2', 3'
Mycosamine moiety				
1'	100.0, CH	4.92	<2(2')	2', 3', 5', 18a, 18b, 19, 20
2'	71.5, CH	4.44	<2(1'), 3.0(3')	1', 17, N(CO)Me, COOMe, NH

(Continues)

No.	δ_C (p.p.m.), type	δ_H (p.p.m.)	$J_{H,H}$ [Hz]	ROE contacts
Aglycone				
3'	56.5, CH	4.68	3.0(2'), 8.5(NH'), 9.5(4')	1', 5', N(CO)Me, COOMe, NH
4'	72.0, CH	4.04	9.5(3'), 9.5(5')	6', NH
5'	75.0, CH	3.68	9.5(4'), 6.2(6')	1', 3', 6'
6'	18.5, CH ₃	1.55	6.2(5')	4', 5'
NH(CO)Me	—	8.85	8.5(3')	2', 3', 4', N(CO)Me
NH(CO)Me	171.0, C	—	—	—
NH(CO)Me	23.0, CH ₃	2.09	—	2', 3', NH

^a These coupling constants could not be measured.

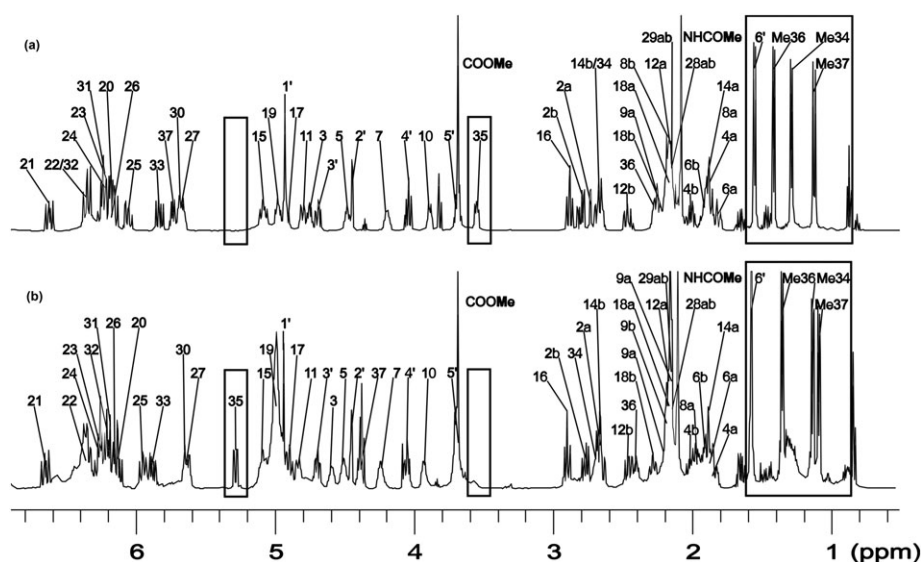


Figure 3. Comparison of 1D ¹H NMR spectra of **3** (a) and **4** (b).

The analysis of DQF-COSY spectrum of **4** revealed the connectivities within three structural blocks, namely, C2-C12, C14-C37 and sugar moieties, which were separated by carboxyl group C1 from lactone bond, hemiketal carbon (C13) and by glycosidic bond. In comparison with the DQF-COSY spectra of **3**, in the molecule **4**, chemical shift values of two protons differ significantly, namely, the H35 and H37. The chemical shift of C35 changes from $\delta = 3.55$ p.p.m. for **3** to $\delta = 5.27$ p.p.m. for **4**. The chemical shift of H37 changes from $\delta = 5.73$ p.p.m. for **3** to $\delta = 4.38$ p.p.m. for **4**. These differences suggest that in molecule **4**, proton H35 is located adjacent to the lactone bond.

The connectivities between mentioned structural blocks were found by long-range heteronuclear correlations observed in HMBC spectrum (C1/H35, C13/H12a, C13/H12b, C13/H14a, C13/H14b and C19/H1').

Due to the correlation C1/H35 observed in the HMBC spectrum (Fig. 4) of **4**, the new compound **4** was found to be a rearrangement product. It is a structural isomer of **3** with macrolactone ring closed by C1-O35 bond and diminished by two carbon atoms in comparison with **3**. The product **4** must have been formed by the translactonization reaction of **1** (followed by further derivatization). The structures of non-derivatized isomer **2** and its 3'-N-acetyl methyl ester derivative **4** are presented in (Fig. 1). Due to exchange

of oxygen functionalities (OH to O-CO), C36 carbon atom of **2** changes its absolute configuration descriptor to S.

Molecular modeling

To examine the conformational dynamics of **1** and, in particular, its tendency to adopt conformations favoring intramolecular translactonization, 200-ns-long MD simulations were performed of fully atomistic models containing a single antibiotic molecule placed either in water or pyridine environments. Furthermore, we used the umbrella sampling to compute the free energy profile along the coordinate defined as the distance between C1 and O35, i.e. atoms that need to come close to each other for translactonization to occur. Additionally, we run 200 ns equilibrium MD for the product of translactonization **2** (see Supporting Information for more detailed information).

Free energy profile underlying the conformational equilibrium of nystatin A₁ (**1**) in water

The free energy profile along the reaction coordinate defined as the C1-O35 distance confirms the existence of two conformational states of macrolactone ring of **1** (Fig. 5). The global free energy minimum, located around 0.40 nm, corresponds to the bent

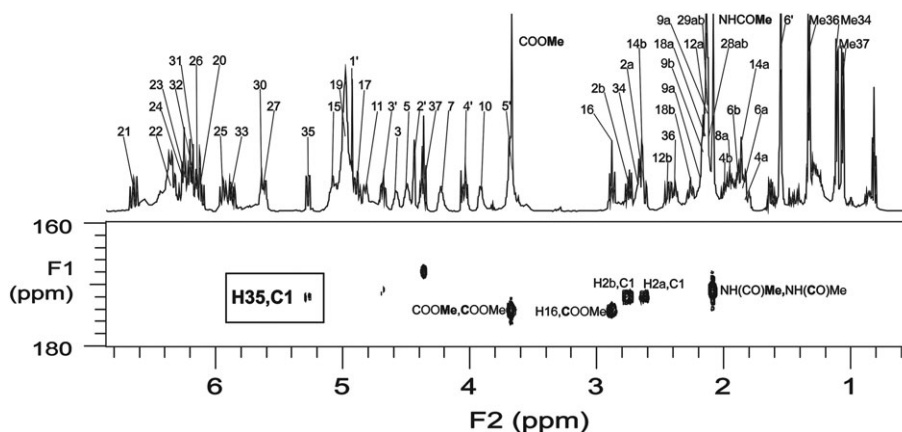


Figure 4. The fragment of HMBC spectrum of **4**.

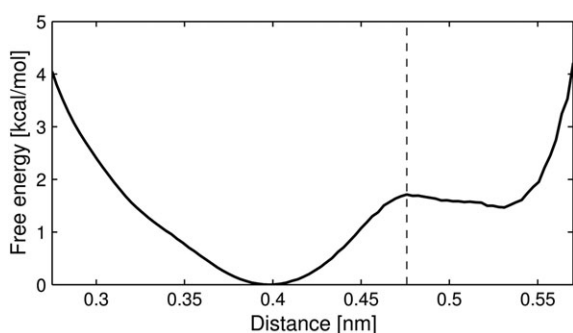


Figure 5. Free energy profile along the conformational coordinate defined as the distance between the O35 and C1 atoms of **1** in aqueous solution. The vertical dashed line shows the position of the transition state between the two conformations of the macrolactone ring.

conformation of the macrolactone. Within this broad free energy well, the C1 and O35 atoms are driven by thermal fluctuations to approach each other (with probability 1%) within 0.32 nm, which is expected to facilitate the intramolecular translaconization. The free energy profile also shows that the fully stretched conformation, contributing the most to the second minimum located around 0.53 nm, is by ~ 1.8 kcal/mol less favorable than the bent conformation. Accordingly, by integrating the probability density associated with the profile, we find that in equilibrium, the probability of finding **1** in this less favorable state is 14.9 %. The small free energy barrier (~ 0.2 kcal) for the bending conformational change indicates that this transition is diffusion controlled and thus occurs on a few nanoseconds timescale.

Conclusions

In conclusion, we have evidenced that nystatin A_1 in slightly basic or acidic environment undergoes intramolecular translaconization reaction, yielding *iso*-nystatin A_1 , a structural isomer with macrolactone ring diminished by two carbon atoms. The intramolecular isomerization of nystatin A_1 , a tetraene-diene polyene macrolide with large macrolactone ring, occurs because of the high conformational flexibility of this compound. It is of high probability that other tetraene-diene macrolides like nystatin A_2 ^[8] and amphotericin A^[9] undergo the same reaction. On the other hand, polyenes containing large macrolactone ring with heptaenic

chromophore and thus rigid, non-flexible molecules will be not susceptible to this type of isomerization.

The obtained information brings a new knowledge about the chemistry of **1**. Also, it could be of importance for the manufacturer of nystatin in the pharmaceutical industry. It should be mentioned that all registered pharmaceutical products under commercial names like *nystatin* or *mycostatin* define the active compound's structure as presented in Fig. 1. Manufacturing, processing, fermentation and handling require the use of organic solvents. Also, chemical modification of the antibiotic aimed at the improvement of its pharmacological properties^[10] is hardly imaginable without the use of organic solvents in basic or acidic conditions.

The results of our investigations are contrary to the earlier data obtained by Ostrosky-Zeichner *et al.*^[11] The authors stated that **1** in organic solvents undergoes only conformational changes, but not structural ones, yielding the defined, stable conformer with reduced antifungal activity. We consider those results as most probably erroneous, perhaps due to the misinterpretation of NMR signals.

Acknowledgements

These studies were supported by the General Fund of the Chemical Faculty, Gdansk University of Technology.

References

- [1] J. O. Lampen, P. M. Arnow, Z. Borowska, A. I. Laskin. *J. Bacteriol.* **1962**, *84* (6), 1152–1160.
- [2] Y. D. Shenin, T. V. Kotienko, O. N. Ekzemplarow. *Antibiotiki* **1968**, *13*, 387–391.
- [3] E. Borowski, J. Zieliński, L. Falkowski, T. Zimiński, J. Golik, P. Kołodziejczyk, E. Jereczek, M. Godulewicz, Y. Shenin, T. Kotienko. *Tetrahedron Lett.* **1971**, *8*, 685–690.
- [4] J. M. Lancelin, J. M. Beau. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4521–4524.
- [5] K. Czerniejewska, M. Płosiński, K. Szwarc, P. Sowiński, E. Borowski, J. Pawlak, *Book of Abstracts of VIIIth Nuclear Magnetic Resonance in Chemistry, Physics and Biological Sciences*, Polish Academy of Sciences, Warsaw, **2014**, pp. P9.
- [6] G. M. Torrie, J. P. Valleau. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 187–199.
- [7] S. Kumar, D. Bouzida, R. H. Swendsen, P. A. Kollman, J. M. Rosenberg. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 1011–1021.
- [8] J. Pawlak, P. Tabin, P. Sowiński, E. Borowski. *Polish J. Chem.* **2005**, *79*, 1673–1679.
- [9] P. Sowiński, T. Bieszczad, J. Pawlak, E. Borowski. *J. Antibiot.* **1996**, *49*(12), 1232–1235.

- [10] E. Borowski, N. Salewska, J. Boros-Majewska, M. Milewska, M. Wysocka, S. Milewski, A. Składanowski, A. Treder, E. Sadowska, I. Łącka, *International Patent Application* WO 2013/132014 A1, **2013**.
- [11] L. Ostrosky-Zeichner, S. Bazemore, V. L. Paetznik, J. R. Rodriguez, E. Chen, T. Wallace, P. Cossum, T. H. Rex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 2781–2786.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

Supplementary Material

Title: *Intramolecular transformation of an antifungal antibiotic nystatin A₁ into its isomer, iso-nystatin A₁. Structural and molecular modeling studies.*

K. Szwarc,* M. Płosiński, K. Czerniejewska, T. Laskowski, A. Leniak, J. Czub, P. Kubica, P. Sowiński, J. Pawlak and E. Borowski

Footnote: *Correspondence to: Katarzyna Szwarc, Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Faculty of Chemistry, Gdansk University of Technology, , Narutowicza St. 11/12, 80-233 Gdansk, Poland. Phone: (48 58) 347-10-27; E-mail: katszwarc@wp.pl

Abstract: Nystatin A₁, a polyene macrolide antifungal antibiotic, undergoes in solution in slightly basic or acidic environment, the intramolecular transformation, yielding a constitutional isomer, the transactonisation product, *iso*-nystatin A₁ with lactone ring diminished by two carbon atoms. Structural evidences were based on the advanced NMR and MS studies. Molecular dynamics simulations and quantum mechanics calculations gave the insight into the course and mechanism of the transformation and its effect on the conformation of the subject molecule.

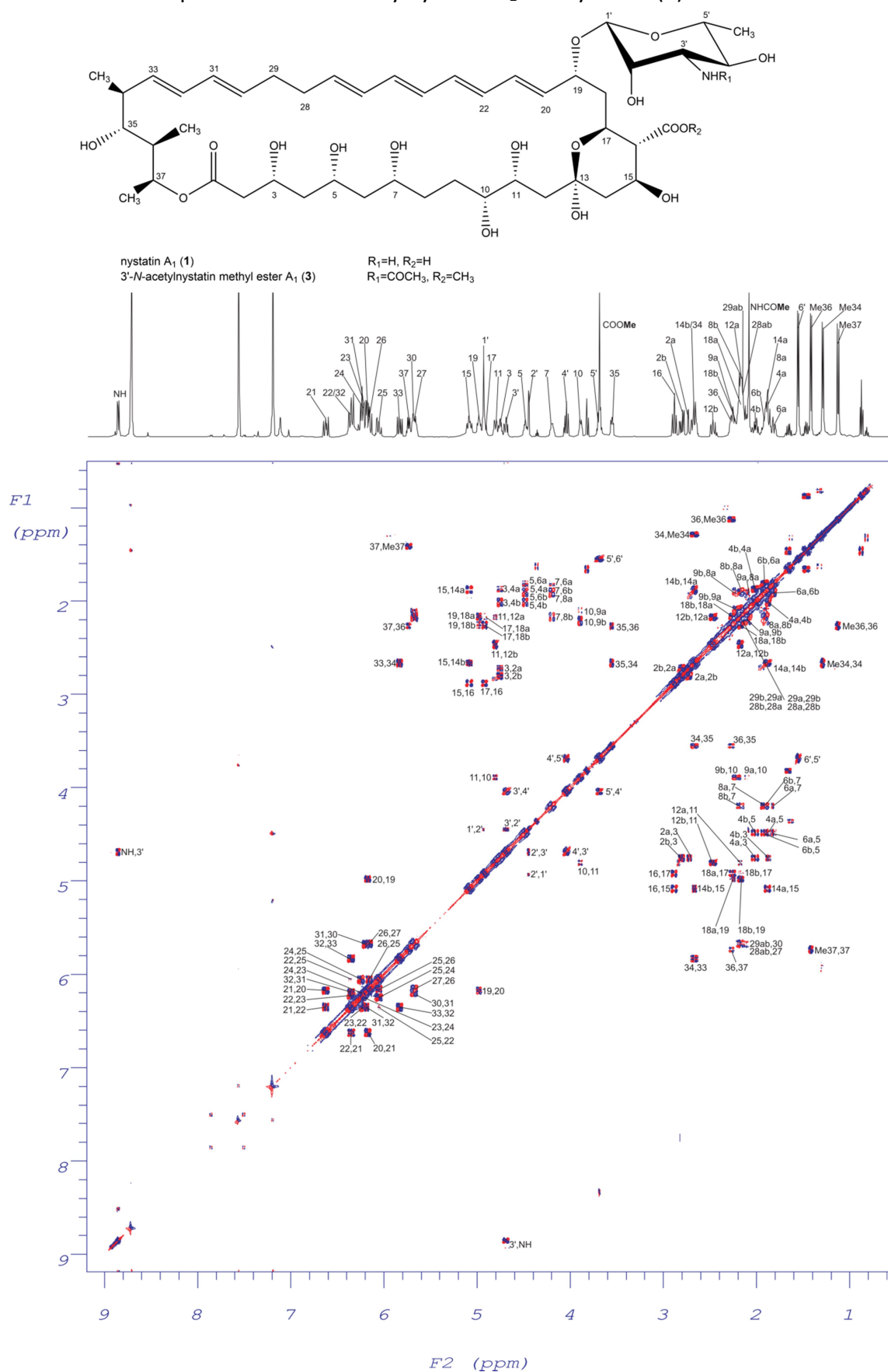
Table of contents:

1. The NMR spectra of 3'-N-acetylnystatin A₁ methyl ester (3).....	3
1.1. The DQF-COSY spectrum of 3'-N-acetylnystatin A ₁ methyl ester (3).....	3
1.2. The gHSQC spectrum of 3'-N-acetylnystatin A ₁ methyl ester (3).....	4
1.3. The gHMBC spectrum of 3'-N-acetylnystatin A ₁ methyl ester (3).....	5
1.4. The ROESY spectrum of 3'-N-acetylnystatin A ₁ methyl ester (3).....	6
2. The NMR spectra of 3'-N-acetyl-iso-nystatin A₁ methyl ester (4).....	7
2.1. The DQF-COSY spectrum of 3'-N-acetyl-iso-nystatin A ₁ methyl ester (4).....	7
2.2. The gHSQC spectrum of 3'-N-acetyl-iso-nystatin A ₁ methyl ester (4).....	8
2.3. The gHMBC spectrum of 3'-N-acetyl-iso-nystatin A ₁ methyl ester (4).....	9
2.4. The ROESY spectrum of 3'-N-acetyl-iso-nystatin A ₁ methyl ester (4).....	10
3. LC-MS analysis of crude precipitate of 3 before purification by flash chromatography.....	11
4. Quantum Mechanics	12
4.1. Experimental.....	12
4.2. Results and discussion.....	12
5. Thermochemistry data.	13
5.1. Nystatin A ₁ (linear).....	13
5.2. Nystatin A ₁ (bent).....	13
5.3. Nystatin A ₁ (intermediate product).....	14

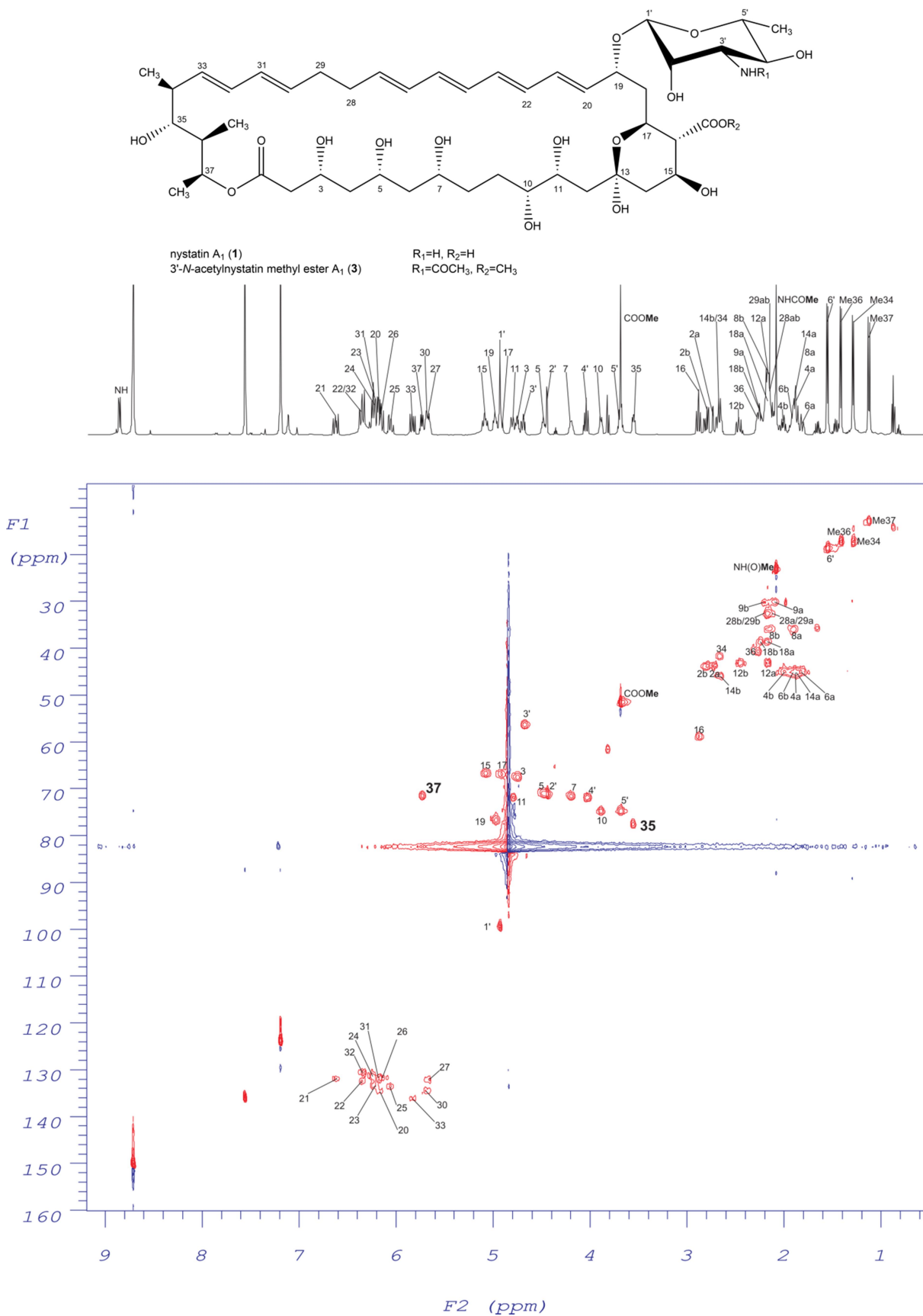
5.5.	<i>iso</i> -nystatin A ₁ (conformer 2).....	14
6.	Cartesian coordinates for DFT optimized geometries.....	15
6.1.	Nystatin A ₁ (linear).....	15
6.2.	Nystatin A ₁ (bent).....	16
6.3.	Nystatin A ₁ (intermediate product).....	17
6.4.	<i>iso</i> -nystatin A ₁ (conformer 1).....	18
6.5.	<i>iso</i> -nystatin A ₁ (conformer 2).....	19
7.	Molecular modeling	21
7.1.	Experimental.....	21
7.2.	Results and discussion.....	21
7.2.1.	Nystatin A ₁ (1) in water.	21
7.2.2.	Nystatin A ₁ (1) in pyridine.	22
7.2.3.	<i>Iso</i> -nystatin A ₁ (2) in water.....	23
8.	Molecular modeling – figures	24
8.1.	Nystatin A ₁ (linear).....	24
8.2.	Nystatin A ₁ (bent).....	25
8.3.	<i>Iso</i> -nystatin A ₁	25
8.4.	The C21-C28-C32 angle which gives an insight into the relative orientation of the diene and tetraene fragment of 1 and 2	26

1. The NMR spectra of 3'-N-acetylnystatin A₁ methyl ester (3).

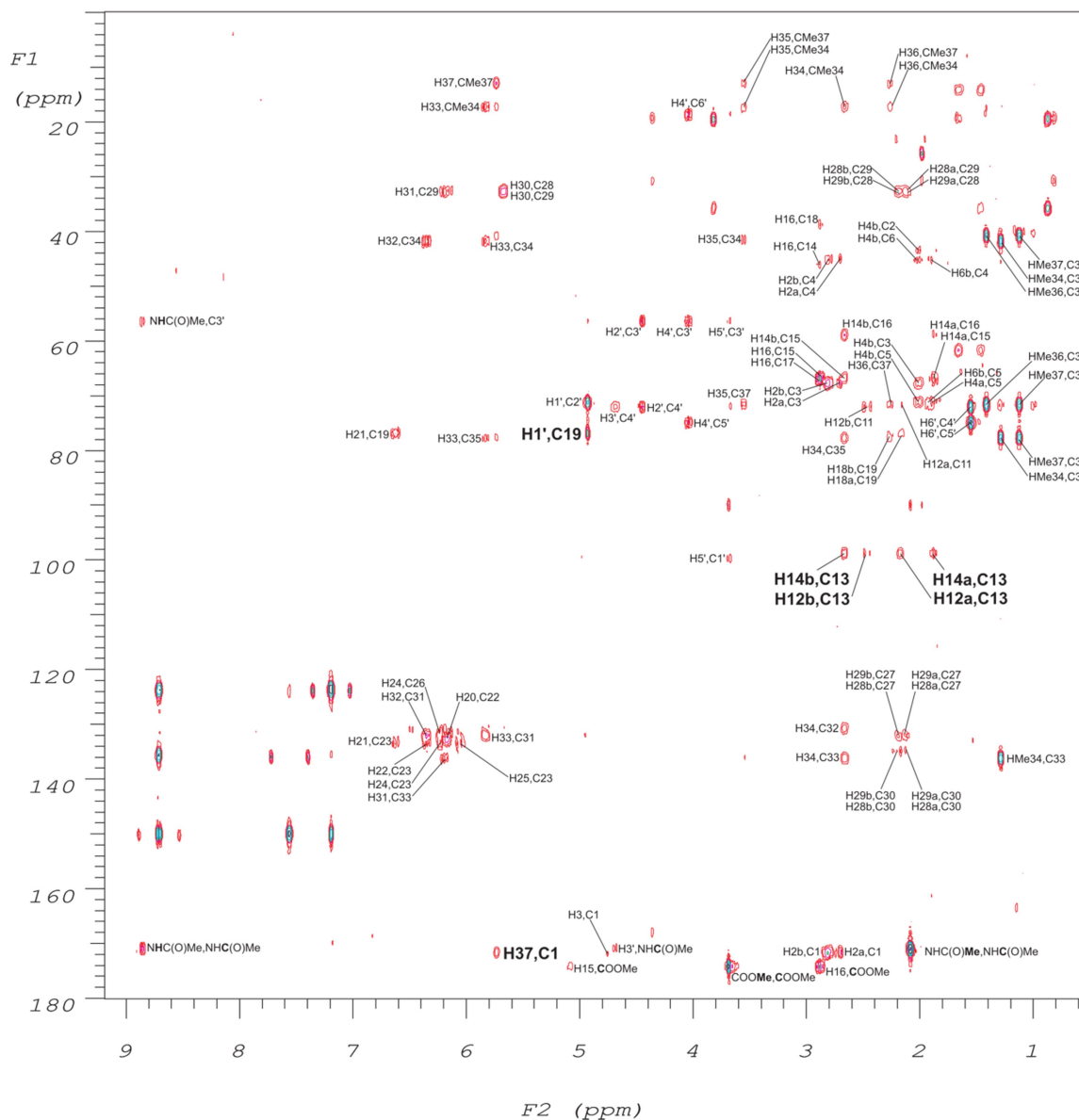
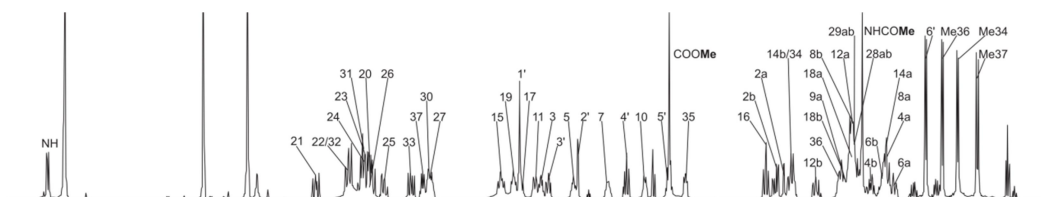
1.1. The DQF-COSY spectrum of 3'-N-acetylnystatin A₁ methyl ester (3).



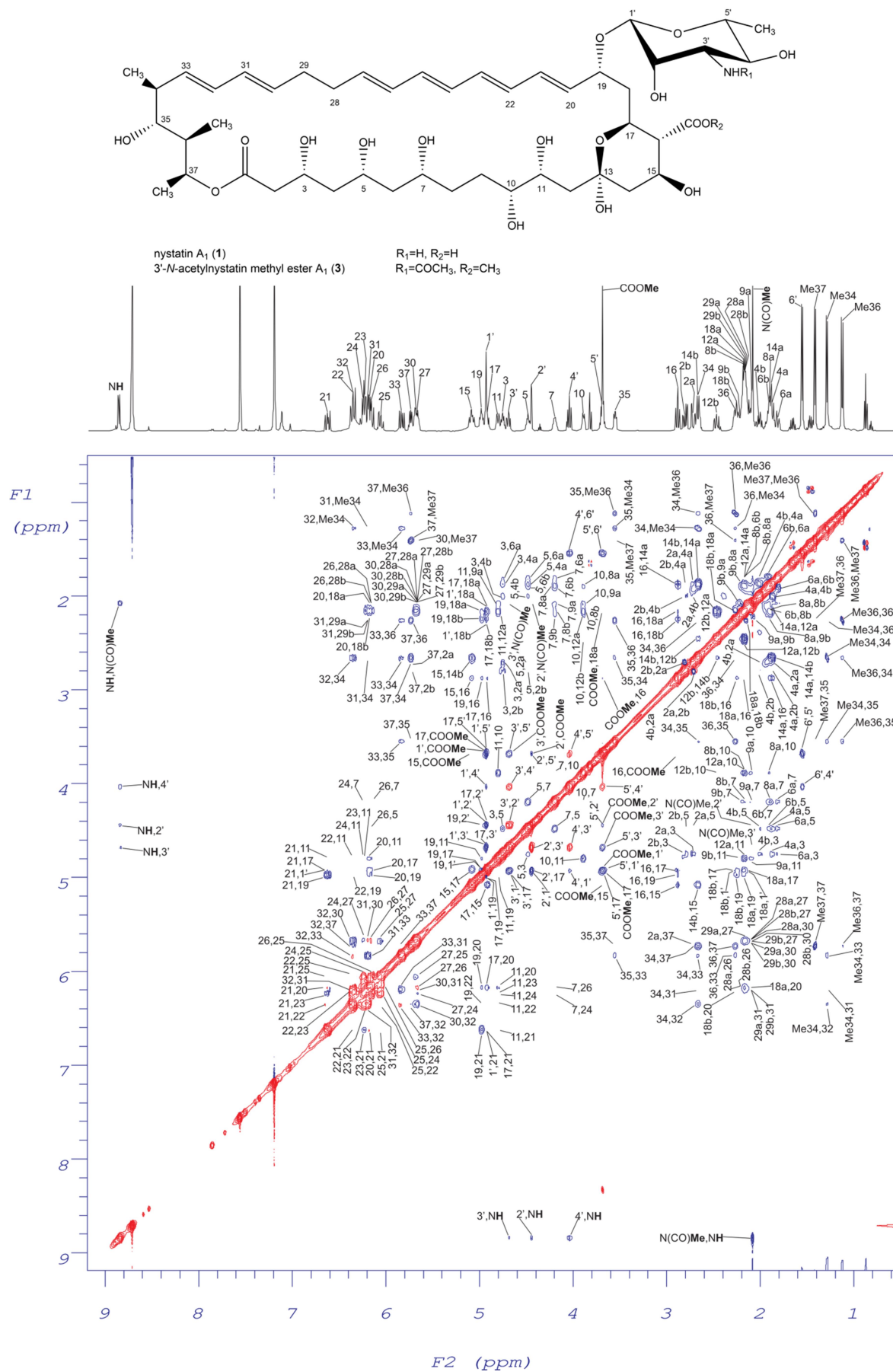
1.2. The gHSQC spectrum of 3'-*N*-acetylnystatin A₁ methyl ester (**3**).



5

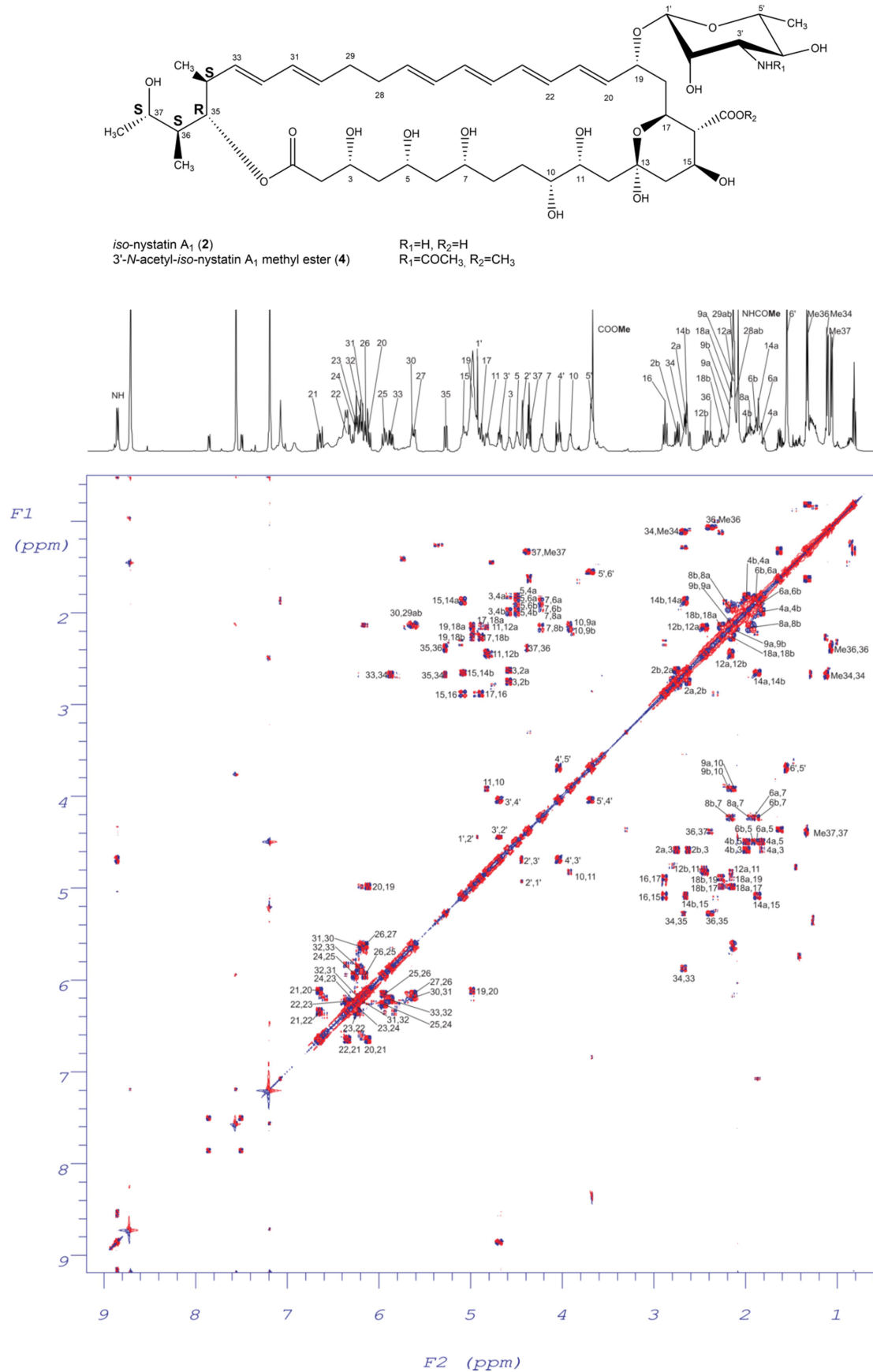


1.4. The ROESY spectrum of 3'-*N*-acetylnystatin A₁ methyl ester (**3**).

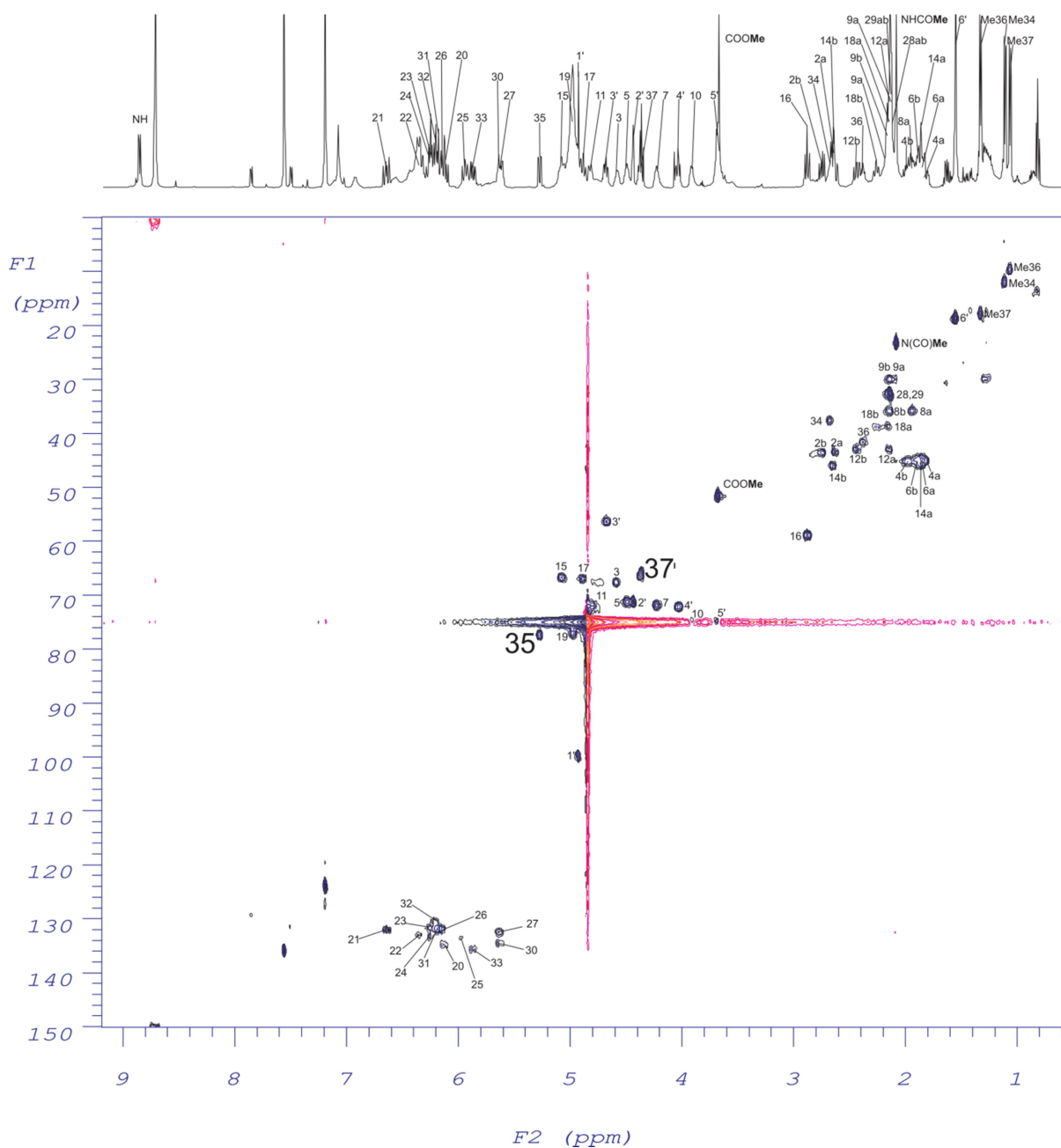
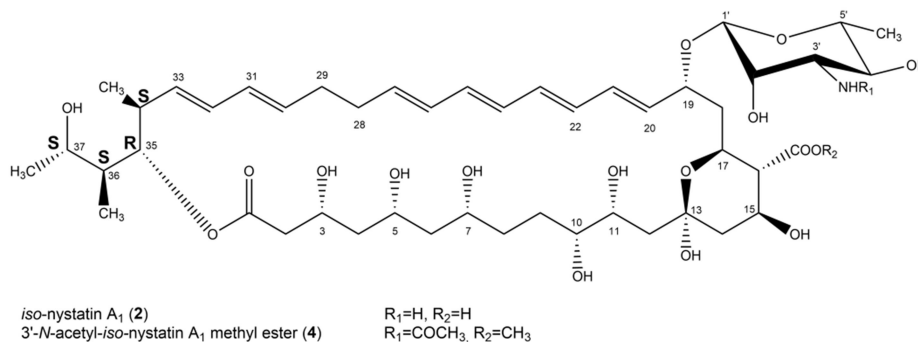


2. The NMR spectra of 3'-*N*-acetyl-*iso*-nystatin A₁ methyl ester (4).

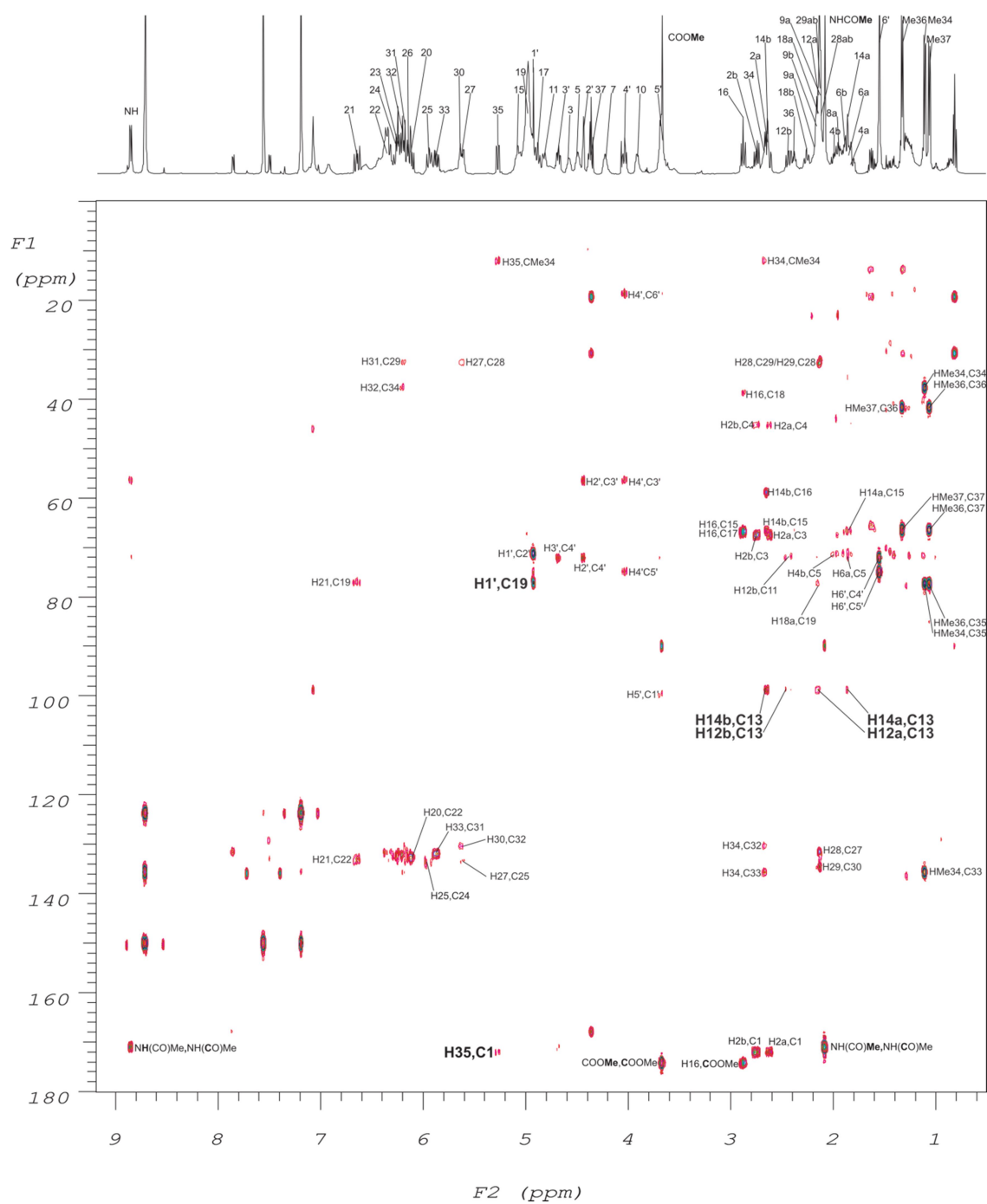
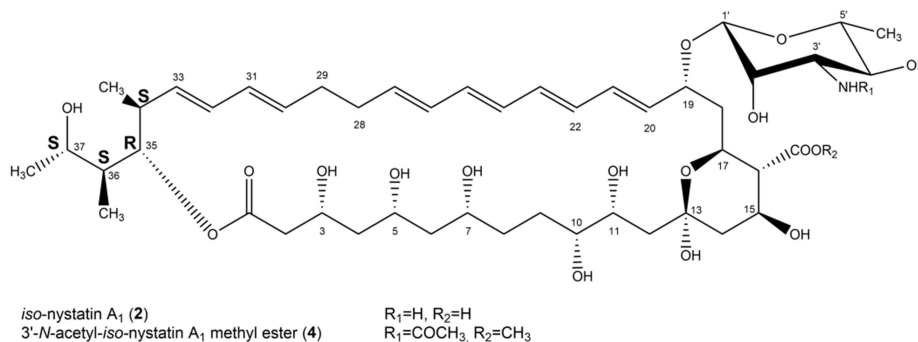
2.1. The DQF-COSY spectrum of 3'-*N*-acetyl-*iso*-nystatin A₁ methyl ester (4).



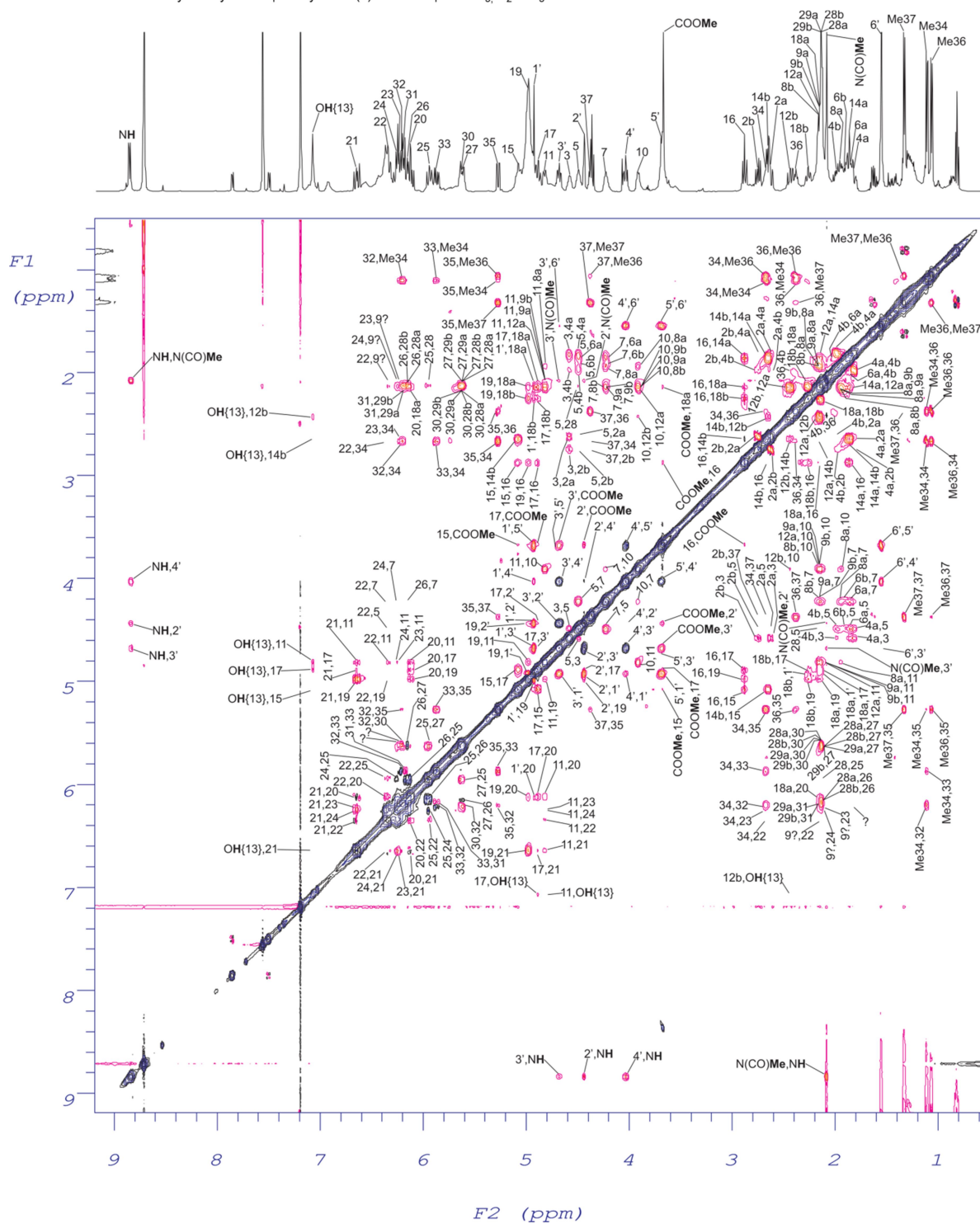
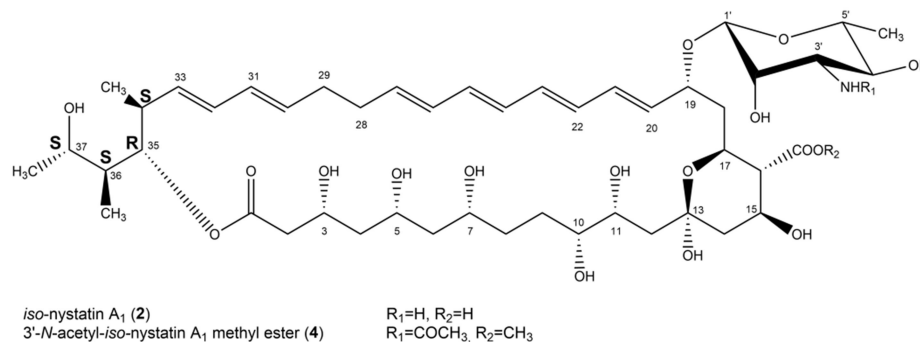
2.2. The gHSQC spectrum of 3'-*N*-acetyl-*iso*-nystatin A₁ methyl ester (**4**).



2.3. The gHMBC spectrum of 3'-*N*-acetyl-*iso*-nystatin A₁ methyl ester (4).

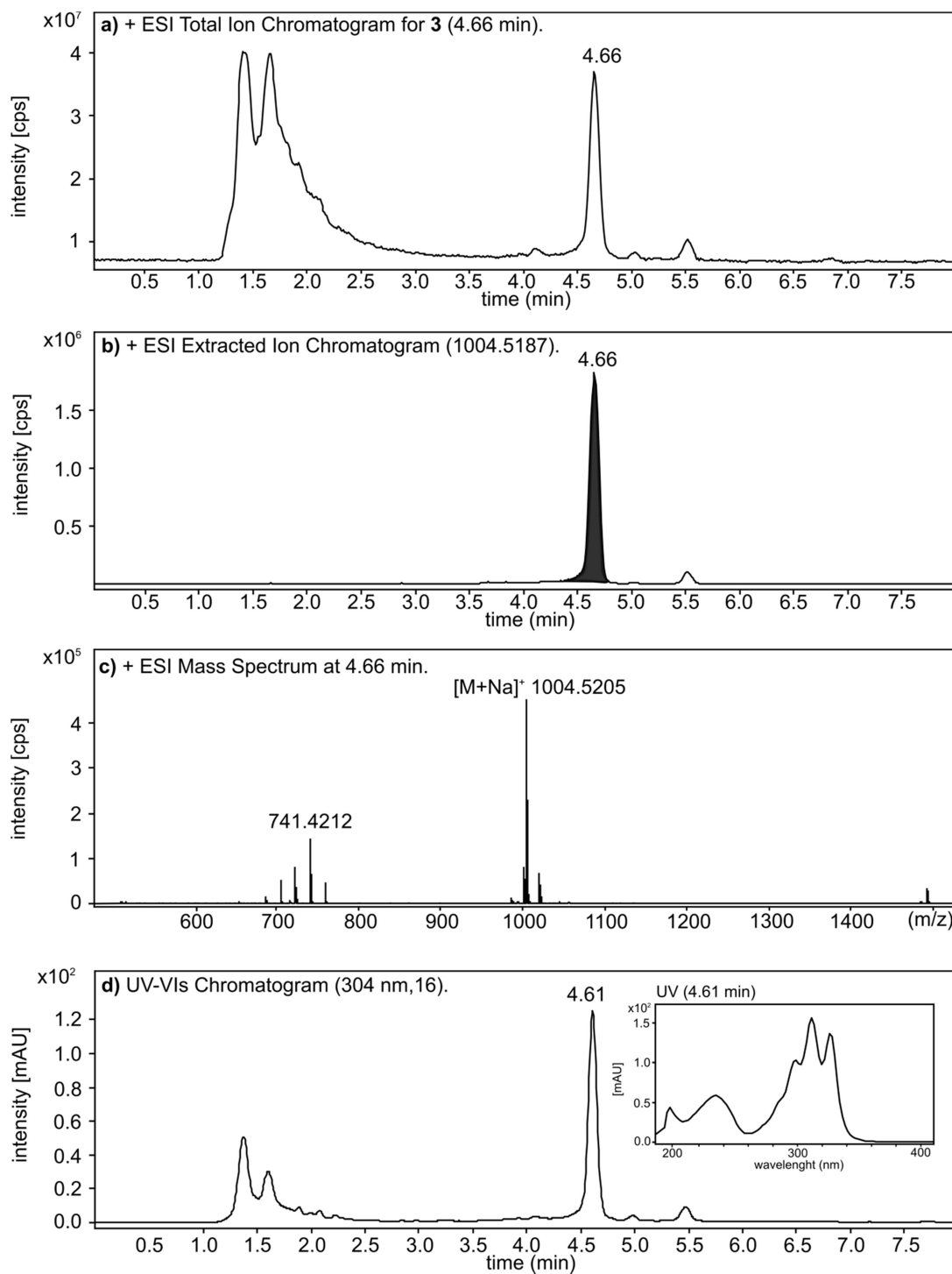


2.4. The ROESY spectrum of 3'-N-acetyl-iso-nystatin A₁ methyl ester (4).



3. LC-MS analysis of crude precipitate of **3** before purification by flash chromatography.

The first few peaks correspond to components of the reaction impurities. **3** elutes at a retention time of 4.66 min.



4. Quantum Mechanics

4.1. Experimental.

Calculations were performed at the *ab initio* level by the utilization of restricted Hartree-Fock method (rHF) and at the Density Functional Theory (DFT) level by using *Becke-Lee-Yang-Parr* functional in *closed-shell* variant (rB3LYP). Gaussian 09 and SPARTAN'04 software was used to perform described calculations. Input geometries of **1** have been optimized primarily by *ab initio* HF calculations at 3-21G basis set with the following refinement at 6-31G basis set to obtain correct initial guesses of wave function that can be further proceeded. Subsequently, the consecutive HF output data were iterated at DFT level of theory by utilization of B3LYP functional with 6-31G basis set. Further refinement was made by the addition of polarization functions to the basis set (B3LYP/6-31G*). Vibrational analysis and thermochemistry calculations were performed by DFT at the B3LYP/6-31G* functional and basis set in temperature of 298.15 K and under pressure of 1.00 atm. All calculations were performed for a single, isolated molecule in vacuum without any solvent model added.

4.2. Results and discussion.

Initial HF calculations for **1** conformer with a linear chromophore and **2** were performed on structures that were previously optimized by a molecular mechanic methods. The lowest energy conformation geometry, that was obtained by the umbrella sampling approach, has been used as the initiatory structure of **1** conformer with a folded chromophore. The second statistically relevant conformer of **2** was obtained by running a conformer distribution simulation with the *Monte Carlo* algorithm at the semi-empirical PM3 level of theory. Calculation was performed with frozen coordinates of macrolactone ring. Initial structure of the intermediate product was deduced on the basis of transesterification reaction mechanism and structures of previously optimized geometries of **1** and **2**.

Two ground state geometries were calculated for a molecule of **1**. The first one that exhibits lower potential energy value and adopts a fully-stretched conformation with a linear alignment of the chromophore. The second conformation, with a higher potential energy value, corresponds to the bent geometry which is favoring the intramolecular transesterification reaction. The conformational transition between this two geometries can be described as an endergonic process ($\Delta G^0 > 0$) with equilibrium constant ($K_{eq} < 1$) that indicates considerable *thermodynamic* advantage of the first described conformation. Increasing of the temperature will result in a shift of the transition equilibrium to the direction of a less thermodynamic favourable conformer ($\Delta S^0 > 0$ and $\Delta H^0 > 0$).

Two major conformations of **2** were determined. Transition between this two states possesses a low energy barrier (2.2 kcal/mol). Thermodynamic equilibrium is shifted to the direction of a conformer that can undergo intramolecular transesterification reaction. Boltzmann distribution that was calculated for a 298 K temperature shows more over forty-time excess of a thermodynamic preferred conformation. The lower energy conformer possesses in its structure a weak hydrogen bond between carbonyl group and a hydroxyl group.

Isomerisation reaction of **1** can be considered as an intramolecular transactonisation with nucleophilic attack of OH-35 group at C1 carbonyl group. When the reaction takes place in the presence of basic catalyst, the intermediate product can be considered as an anionic individual. Calculated structure of ground state geometry for this particular intermediate product has a formal charge that equals -2 (di anion). During the reaction a metastable six-membered ring is

forming. It comes from a nucleophilic attack of a hydroxyl group at C1 carbon. This intermediate product can undergo a reversed reaction to **1** or forward to **2**.

The formation of **2** directly from a fully-stretched conformation of **1** is thermodynamic not spontaneous at any temperature ($\Delta H^0 > 0$; $\Delta S^0 < 0$; $\Delta G^0 > 0$). By the other hand the reversed process is spontaneous in standard conditions. If a molecule **1** underwent conformational transition into the form that possesses a folded chromophore, the transactonisation reaction is spontaneous in the direction of **2** formation. This reaction performed in the standard conditions is not spontaneous by the means of entropy change ($\Delta S^0 = -13.747 \text{ cal/mol}\cdot\text{K}$), but overall heat effect ($\Delta H^0 = -7.728 \text{ kcal/mol}$) allows this reaction to be spontaneous ($\Delta G^0 = -3.629 \text{ kcal/mol}$) with the equilibrium constant $K_{298} = 4.573 \cdot 10^2$ (Table 1).

SUBSTRATE	PRODUCT	ΔH^0 [kcal/mol]	ΔS^0 [cal/mol*K]	ΔG^0 [kcal/mol]	K_{298}
nys-linear	nys-bent	18.282	9.481	15.455	$4.682 \cdot 10^{-12}$
nys-bent	iso-nys-conf-1	-7.728	-13.747	-3.629	$4.573 \cdot 10^2$
nys-linear	iso-nys-conf-1	10.554	-4,266	11.826	$2.13 \cdot 10^{-9}$
iso-nys-conf-1	iso-nys-conf-2	2.204	6.038	0.397	0.511

5. Thermochemistry data.

5.1. Nystatin A₁ (linear)

	Hartree/Particle
Zero-point correction	1.209813
Thermal correction to Energy	1.280240
Thermal correction to Enthalpy	1.281184
Thermal correction to Gibbs Free Energy	1.098593
Sum of electronic and zero-point Energies	-3168.403190
Sum of electronic and thermal Energies	-3168.332764
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-3168.331820
Sum of electronic and thermal Free Energies	-3168.514411

5.2. Nystatin A₁ (bent)

	Hartree/Particle
Zero-point correction	1.208259
Thermal correction to Energy	1.279440
Thermal correction to Enthalpy	1.280385
Thermal correction to Gibbs Free Energy	1.093289
Sum of electronic and zero-point Energies	-3168.374812
Sum of electronic and thermal Energies	-3168.303630

Sum of electronic and thermal Enthalpies	-3168.302686
Sum of electronic and thermal Free Energies	-3168.489782

5.3. Nystatin A₁ (intermediate product)

	<i>Hartree/Particle</i>
Zero-point correction	1.184086
Thermal correction to Energy	1.251971
Thermal correction to Enthalpy	1.252915
Thermal correction to Gibbs Free Energy	1.078009
Sum of electronic and zero-point Energies	-3167.257345
Sum of electronic and thermal Energies	-3167.189460
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-3167.188516
Sum of electronic and thermal Free Energies	-3167.363423

5.4. iso-nystatin A₁ (conformer 1)

	<i>Hartree/Particle</i>
Zero-point correction	1.211415
Thermal correction to Energy	1.281061
Thermal correction to Enthalpy	1.282005
Thermal correction to Gibbs Free Energy	1.101441
Sum of electronic and zero-point Energies	-3168.385592
Sum of electronic and thermal Energies	-3168.315945
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-3168.315001
Sum of electronic and thermal Free Energies	-3168.495565

5.5. iso-nystatin A₁ (conformer 2)

	<i>Hartree/Particle</i>
Zero-point correction	1.209612
Thermal correction to Energy	1.280068
Thermal correction to Enthalpy	1.281012
Thermal correction to Gibbs Free Energy	1.097570
Sum of electronic and zero-point Energies	-3168.382889
Sum of electronic and thermal Energies	-3168.312434
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-3168.311489
Sum of electronic and thermal Free Energies	-3168.494932

6. Cartesian coordinates for DFT optimized geometries.

6.1. Nystatin A₁ (linear)

C	-10.25530	2.52900	1.86580
C	-9.13540	2.74250	1.15400
C	-7.79650	2.85620	1.71180
C	-6.68750	2.96600	0.95990
C	-5.27800	3.00880	1.47320
C	-4.54080	1.66560	1.22160
C	-3.08140	1.70560	1.56870
C	-2.08720	1.35340	0.72930
C	-0.67960	1.38860	1.05980
C	0.30740	0.99390	0.21550
C	1.71050	1.03870	0.53680
C	2.70250	0.68030	-0.31750
C	4.10890	0.70850	0.01410
C	5.10270	0.34340	-0.81910
C	6.55330	0.32080	-0.43920
C	7.22800	-1.04890	-0.62470
C	-11.64020	2.40660	1.28380
C	-12.23050	0.97980	1.46760
C	-11.35160	-0.18600	0.93460
C	-11.10920	-0.15980	-0.59130
O	-9.94860	-1.02990	-0.85340
C	-8.81810	-0.49090	-1.31430
C	-7.75460	-1.53820	-1.58730
C	-6.33720	-1.02460	-1.27290
C	-5.26770	-2.07880	-1.57060
C	-3.83570	-1.61800	-1.25060
C	-12.57590	3.45980	1.91310
O	-13.57530	0.91160	0.97570
C	-11.89830	-1.53500	1.42550
C	-12.22720	-0.69640	-1.47920
O	-8.64970	0.70520	-1.51700
O	-6.03740	0.13400	-2.05690
O	-3.43110	-0.54630	-2.11340
C	-2.81950	-2.75320	-1.41150
C	-1.36060	-2.34300	-1.14160
C	-0.44220	-3.56770	-1.11210
C	1.02850	-3.22530	-0.83840
C	1.95790	-4.42630	-1.01660
C	3.44190	-4.15510	-0.69930
C	3.74190	-3.93130	0.78360
C	5.23370	-3.68680	1.08670
O	4.19470	-5.29580	-1.13120
C	5.48370	-3.37520	2.57110
C	6.91030	-2.86950	2.82310
O	7.05850	-2.38970	4.16140
O	5.58370	-2.54040	0.29340
C	7.20480	-1.68780	1.89720
C	6.93870	-2.12210	0.42790
O	6.03450	-4.79620	0.76850
O	7.31930	1.21450	-1.29180
O	-0.86590	-1.46640	-2.15470
O	1.89280	-4.93770	-2.36620
C	8.63520	-1.20600	2.03690
O	8.69550	0.14690	2.11860
O	9.61990	-1.91050	2.00460
H	-10.18820	2.44600	2.95330
H	-9.20580	2.81100	0.06860
H	-7.70710	2.83470	2.79950
H	-6.79890	2.97140	-0.12620
H	-4.72090	3.81190	0.97170
H	-5.26760	3.23440	2.54740
H	-5.05200	0.89630	1.82180
H	-4.66460	1.37420	0.17080
H	-2.82960	2.04590	2.57560
H	-2.34340	1.00660	-0.27310
H	-0.41170	1.76270	2.04950
H	0.03760	0.59640	-0.76360
H	1.97980	1.38840	1.53520
H	2.43560	0.34020	-1.31850
H	4.36290	1.02630	1.02740
H	4.87260	0.02340	-1.83550
H	6.66600	0.64580	0.60010
H	6.96410	-1.45440	-1.60820

H	8.31040	-0.87710	-0.63860
H	-11.57340	2.60990	0.20320
H	-12.33190	0.80680	2.54770
H	-10.36230	-0.03330	1.38370
H	-10.81950	0.84370	-0.90650
H	-7.98000	-2.44530	-1.01930
H	-7.81040	-1.79290	-2.65460
H	-6.29180	-0.76190	-0.20320
H	-5.49150	-2.97680	-0.98030
H	-5.32170	-2.35690	-2.63160
H	-3.80540	-1.26730	-0.20460
H	-13.59210	3.38640	1.51520
H	-12.19620	4.46910	1.72540
H	-12.63760	3.31970	2.99940
H	-11.30760	-2.36870	1.03160
H	-12.94210	-1.67250	1.12810
H	-11.85730	-1.58460	2.51960
H	-11.96170	-0.58120	-2.53510
H	-13.16160	-0.16230	-1.29150
H	-12.40730	-1.75710	-1.28380
H	-6.79950	0.74130	-1.95920
H	-4.20060	0.04680	-2.22460
H	-3.09730	-3.55970	-0.71980
H	-2.88410	-3.15540	-2.43160
H	-1.31430	-1.83880	-0.15930
H	-0.80350	-4.26700	-0.34520
H	-0.52130	-4.08280	-2.07690
H	1.34540	-2.42110	-1.51650
H	1.13280	-2.82420	0.17760
H	1.62310	-5.26790	-0.39720
H	3.76650	-3.26680	-1.26320
H	3.17820	-3.06120	1.13460
H	3.41650	-4.80720	1.35790
H	3.77830	-5.57500	-1.96800
H	4.78540	-2.59810	2.90240
H	5.29330	-4.27890	3.16170
H	7.63880	-3.66350	2.61750
H	7.11210	-3.16080	4.74660
H	6.52580	-0.87220	2.16280
H	7.59630	-2.97450	0.21540
H	5.70550	-5.14940	-0.08310
H	-1.59460	-0.85040	-2.36040
H	1.91860	-4.17170	-2.96490
C	7.23310	2.58570	-0.96900
C	8.21960	2.91350	0.17250
C	8.39820	4.42660	0.32200
C	8.69630	5.07220	-1.04370
C	7.64040	4.65580	-2.08270
C	7.92960	5.17830	-3.48120
O	8.79110	6.49430	-0.92540
O	9.48970	2.32520	-0.09960
N	9.38230	4.71240	1.36370
O	7.58080	3.22990	-2.17160
H	6.20380	2.85370	-0.67080
H	7.82640	2.51100	1.11720
H	9.30570	1.58350	-0.70420
H	7.42750	4.83110	0.66220
H	9.68020	4.74260	-1.39210
H	7.93390	6.81580	-0.59800
H	6.65630	5.03690	-1.74320
H	8.02100	6.26760	-3.46330
H	7.12890	4.89350	-4.17050
H	8.87000	4.75570	-3.85130
H	9.62840	5.70040	1.30390
H	10.23110	4.19220	1.14210
H	-13.61330	1.40650	0.14240
H	9.63470	0.41150	2.08280

6.2. Nystatin A₁ (bent)

C	8.37900	1.29340	1.06960
C	7.72660	0.13560	1.27350
C	7.74400	-0.64930	2.49770
C	6.95600	-1.72270	2.68040
C	6.88410	-2.55650	3.92840
C	5.63420	-2.26160	4.80330
C	4.34250	-2.28610	4.03780
C	3.38240	-1.34380	4.11420
C	2.16090	-1.35860	3.34150
C	1.14080	-0.47470	3.48500
C	-0.05190	-0.51520	2.67980
C	-1.14830	0.26850	2.84250
C	-2.31410	0.15160	1.99620
C	-3.49220	0.78950	2.14260
C	-4.65310	0.49010	1.23510
C	-5.74010	-0.37620	1.91260
C	8.30900	2.08970	-0.21080
C	7.27230	3.25270	-0.12600
C	5.82130	2.86960	0.25820
C	4.97560	2.27230	-0.88760
O	5.76030	1.23220	-1.55140
C	5.44790	0.93670	-2.82930
C	6.43320	-0.05570	-3.42080
C	6.56760	-1.43070	-2.72740
C	5.33840	-2.34400	-2.86370
C	4.13980	-2.00930	-1.96990
C	9.70130	2.63990	-0.57360
O	7.19310	3.97520	-1.36010
C	5.11550	4.12480	0.80990
C	3.66830	1.63880	-0.41070
O	4.51680	1.42390	-3.43810
O	7.72350	-2.09150	-3.25410
O	4.57850	-2.10680	-0.61490
C	2.95620	-2.94960	-2.26050
C	1.70930	-2.67290	-1.40830
C	0.47120	-3.44010	-1.88630
C	-0.75570	-3.22460	-0.99420
C	-2.06930	-3.73490	-1.61010
C	-3.22770	-3.59420	-0.59890
C	-4.61110	-3.60830	-1.26580
C	-5.76260	-3.35290	-0.28050
O	-3.06020	-4.68090	0.31750
C	-7.13970	-3.15650	-0.93930
C	-7.41240	-1.71380	-1.38830
O	-6.55020	-1.29140	-2.44770
O	-5.40180	-2.20560	0.47190
C	-7.18770	-0.69760	-0.23050
C	-6.43840	-1.35570	0.96180
O	-5.79860	-4.50560	0.57590
O	-5.34960	1.66520	0.76520
O	1.98390	-2.92400	-0.00640
O	-1.97980	-5.08590	-2.04470
C	-8.51240	-0.15910	0.26460
O	-9.44750	-0.85020	0.61010
O	-8.56140	1.19640	0.30680
H	8.99130	1.70880	1.87420
H	7.09580	-0.25510	0.47450
H	8.41960	-0.32850	3.29330
H	6.28410	-2.00420	1.86840
H	6.87020	-3.62080	3.65160
H	7.77990	-2.40330	4.54300
H	5.60710	-3.01070	5.61110
H	5.75110	-1.28310	5.28500
H	4.18910	-3.13480	3.36750
H	3.52410	-0.50220	4.79440
H	2.06810	-2.13280	2.57920
H	1.20850	0.30110	4.24900
H	-0.06020	-1.25660	1.87920
H	-1.17360	1.00430	3.64670
H	-2.21670	-0.55340	1.16770
H	-3.65740	1.50340	2.94660
H	-4.26940	-0.05580	0.36280

H	-5.27680	-0.97710	2.70070
H	-6.47290	0.28580	2.38770
H	7.98040	1.42770	-1.01390
H	7.63130	3.93070	0.66870
H	5.88520	2.12560	1.05960
H	4.77600	3.04130	-1.63750
H	6.15200	-0.19350	-4.47100
H	7.42700	0.40650	-3.39430
H	6.79080	-1.28740	-1.66830
H	5.01000	-2.35420	-3.91430
H	5.67000	-3.35870	-2.61180
H	3.79940	-0.98240	-2.18030
H	9.70050	3.12810	-1.55530
H	10.43660	1.82960	-0.61700
H	10.05290	3.36590	0.17300
H	8.02710	4.45110	-1.48310
H	5.65570	4.50940	1.68220
H	4.08860	3.92320	1.12760
H	5.09320	4.91540	0.05190
H	3.08430	1.30600	-1.27250
H	3.05740	2.35190	0.14960
H	3.87710	0.77580	0.23100
H	7.54030	-2.29540	-4.18610
H	3.77510	-2.18940	-0.06700
H	2.68280	-2.85250	-3.31960
H	3.27230	-3.99320	-2.10930
H	1.48910	-1.59810	-1.43090
H	0.25020	-3.11230	-2.91210
H	0.69330	-4.51350	-1.95800
H	-0.60430	-3.70670	-0.02140
H	-0.87270	-2.14920	-0.79160
H	-2.29370	-3.13790	-2.50480
H	-3.11430	-2.64100	-0.06590
H	-4.65330	-2.81730	-2.02020
H	-4.76840	-4.57140	-1.76460
H	-3.92690	-4.82620	0.74130
H	-7.23850	-3.84930	-1.78330
H	-7.92460	-3.43270	-0.22290
H	-8.45790	-1.65920	-1.72010
H	-6.73390	-1.84950	-3.22060
H	-6.58410	0.11970	-0.62400
H	-7.16580	-1.94440	1.54240
H	-6.41400	-4.32670	1.30620
H	-2.13730	-3.87940	0.09000
H	-2.18770	-5.60260	-1.24240
C	-4.59050	2.66370	0.14300
C	-5.50300	3.33430	-0.90240
C	-4.84760	4.61880	-1.42950
C	-4.35530	5.50060	-0.27130
C	-3.43300	4.69170	0.64660
C	-2.93410	5.48060	1.84560
O	-3.65050	6.61470	-0.78950
O	-6.76140	3.68240	-0.35270
N	-5.69890	5.44240	-2.29710
O	-4.16150	3.56130	1.14750
H	-3.71030	2.22940	-0.36650
H	-5.63120	2.61770	-1.73410
H	-7.11130	2.88410	0.08100
H	-3.95930	4.33820	-2.01210
H	-5.22490	5.82370	0.32440
H	-4.18410	6.89100	-1.55960
H	-2.57240	4.34130	0.05010
H	-2.38890	6.36510	1.50550
H	-2.27160	4.86310	2.46040
H	-3.77900	5.80440	2.46340
H	-5.80710	5.00310	-3.20970
H	-6.63060	5.47870	-1.88230
H	-9.44540	1.43130	0.65060

6.3. Nystatin A₁ (intermediate product)

C	8.89010	-0.87770	-1.86270
C	8.68990	-1.94290	-0.75000
C	7.49500	-1.73170	0.18890
C	6.23230	-2.45600	-0.30640
C	4.92940	-2.00900	0.35730
C	3.72810	-2.83360	-0.13380
C	2.34080	-2.23850	0.15050
C	1.23730	-3.27370	-0.09990
O	2.26260	-1.75310	1.52940
O	5.05190	-2.15460	1.78700
O	7.85540	-2.20410	1.50930
O	9.74080	-1.08860	-2.76380
O	7.46730	-0.60250	-2.36760
H	1.42870	-3.68590	-1.09910
H	1.38480	-4.10930	0.59980
H	2.17890	-1.37330	-0.50630
H	2.18700	-0.78100	1.50530
H	3.80340	-3.82780	0.32790
H	3.80530	-2.97820	-1.21920
H	4.77080	-0.94370	0.11760
H	4.16750	-1.96590	2.14800
H	6.36580	-3.53780	-0.15470
H	6.14320	-2.26480	-1.38020
H	7.28850	-0.65630	0.23550
H	7.01960	-2.20720	2.00820
H	8.63580	-2.92400	-1.23950
H	9.60440	-1.93090	-0.14770
C	-0.22640	-2.78010	-0.03820
C	-0.92520	-2.91750	1.32180
C	-2.42210	-2.54630	1.23140
C	-3.31140	-3.65310	0.66210
C	-4.77890	-3.22120	0.43420
C	-5.60130	-4.31490	-0.25480
C	-6.97130	-3.80450	-0.70390
C	-6.82910	-2.52550	-1.56340
C	-5.94620	-1.49580	-0.84730
C	-8.25360	-1.97660	-1.94590
O	-8.46750	-0.74360	-1.83490
O	-9.06960	-2.85720	-2.34620
O	-7.61660	-4.83730	-1.42480
O	-5.41680	-2.92220	1.66320
O	-4.69100	-2.07680	-0.40720
O	-2.90820	-2.22250	2.54530
O	-0.37270	-2.03720	2.30390
H	-6.48690	-1.12730	0.03150
H	-6.33010	-2.83120	-2.49770
H	-7.55210	-3.54000	0.19780
H	-8.33650	-4.32910	-1.89710
H	-5.72200	-5.16950	0.42150
H	-5.05910	-4.66130	-1.14360
H	-4.77110	-2.42290	2.19750
H	-3.30430	-4.51230	1.34400
H	-2.90390	-3.98120	-0.30040
H	-2.51200	-1.66150	0.59000
H	-2.15760	-1.79330	2.99470
H	0.60300	-2.03460	2.20380
H	-0.83120	-3.95990	1.67610
H	-0.80990	-3.35310	-0.76880
H	-0.28870	-1.72970	-0.35200
C	-5.54270	-0.31830	-1.73800
C	-5.20590	0.98460	-0.98320
C	-4.07790	0.83600	-0.00490
C	-2.82640	1.30740	-0.17200
C	-1.78020	1.09380	0.80180
C	-0.48530	1.49080	0.69570
C	0.47740	1.28570	1.74780
C	1.78240	1.67170	1.73050
H	2.18740	2.14330	0.83360
H	0.09730	0.80260	2.64890
H	-0.15280	2.01220	-0.20310
H	-2.07570	0.55780	1.70410
H	-2.57150	1.86530	-1.07450

H	-4.31320	0.26880	0.89320
H	-4.95480	1.76490	-1.71480
H	-6.36900	-0.11810	-2.42180
H	-4.66650	-0.61080	-2.33120
O	-6.33080	1.44540	-0.19950
C	-7.40430	2.02150	-0.91990
C	-8.63500	1.98470	0.01750
C	-9.48060	3.23690	-0.19630
C	-8.63290	4.47020	0.15640
C	-7.22890	4.42850	-0.51380
C	-6.08710	4.50940	0.50490
O	-9.39450	5.62170	-0.25560
O	-8.26110	1.96220	1.40180
N	-10.73370	3.15030	0.55860
O	-7.08650	3.31860	-1.40860
H	-7.63060	1.43300	-1.80910
H	-9.20330	1.08250	-0.23490
H	-7.50150	1.35520	1.43990
H	-9.72880	3.30190	-1.26330
H	-8.51220	4.49000	1.24750
H	-8.97080	6.40030	0.13640
H	-7.17400	5.29450	-1.18520
H	-6.15570	3.69390	1.22830
H	-6.13250	5.46360	1.04890
H	-5.11760	4.44520	0.00090
C	2.66720	1.56270	2.87480
C	3.96110	1.93920	2.89960
C	4.84040	1.85630	4.11540
C	5.91210	0.74610	4.04450
C	7.02010	0.91430	3.04090
C	7.32280	1.99530	2.29810
C	8.38950	1.96120	1.30990
C	8.63080	2.87210	0.35060
H	8.01760	3.77620	0.29410
H	8.98950	1.05480	1.30170
H	6.73870	2.91440	2.38020
H	7.61670	0.01570	2.87650
H	5.33870	2.82350	4.27930
H	4.21340	1.67510	4.99840
H	4.41810	2.31150	1.98350
H	2.21890	1.17030	3.79100
H	5.40970	-0.20810	3.83090
H	6.35100	0.62650	5.04990
C	9.65640	2.65060	-0.73890
C	9.19280	1.56600	-1.77950
C	7.84800	1.79740	-2.52640
C	7.46280	0.48040	-3.26230
C	6.07010	0.51690	-3.89830
C	7.89380	2.98250	-3.50350
C	10.18320	3.97270	-1.32100
O	9.14530	0.38570	-1.02680
H	5.30780	0.76430	-3.14710
H	5.83840	-0.47740	-4.29610
H	5.99310	1.23950	-4.71970
H	8.21660	0.30010	-4.04860
H	7.07080	1.97750	-1.76870
H	8.71010	2.86100	-4.22900
H	8.04500	3.93930	-2.99480
H	6.96100	3.07060	-4.07240
H	9.98960	1.49230	-2.54450
H	10.51470	2.14390	-0.27840
H	9.37860	4.65270	-1.62260
H	10.81550	3.79440	-2.19930
H	10.78770	4.50450	-0.57370
H	-11.15320	4.07940	0.57370
H	-10.50010	2.91610	1.52360

6.4. *iso*-nystatin A₁ (conformer 1)

C	8.42180	-0.30970	-2.23530
C	8.49960	-1.60890	-1.45340
C	7.34850	-1.82220	-0.45180
C	6.08050	-2.36620	-1.12960
C	4.82470	-2.21360	-0.26760
C	3.62520	-2.96060	-0.86690
C	2.25750	-2.56100	-0.29100
C	1.18080	-3.58360	-0.67320
O	2.33840	-2.43790	1.16170
O	5.11840	-2.73440	1.03970
O	7.83210	-2.72280	0.53930
O	8.48890	-0.19290	-3.43910
O	5.65200	1.51350	-0.57670
H	1.32610	-3.79960	-1.73940
H	1.39560	-4.52430	-0.14620
H	1.97650	-1.57540	-0.68550
H	2.26680	-1.48890	1.38510
H	3.79580	-4.03410	-0.70980
H	3.58830	-2.79810	-1.95230
H	4.60020	-1.13720	-0.18530
H	4.27090	-2.73340	1.52240
H	6.25090	-3.42460	-1.36920
H	5.90330	-1.84050	-2.07750
H	7.10900	-0.85880	0.01620
H	7.05090	-2.94750	1.07930
H	8.56500	-2.43580	-2.16540
H	9.42900	-1.58780	-0.87140
C	-0.28990	-3.16320	-0.46100
C	-0.90390	-3.48250	0.90880
C	-2.38180	-3.04820	0.97070
C	-3.36230	-3.98280	0.25990
C	-4.77400	-3.37880	0.13860
C	-5.75910	-4.30730	-0.58820
C	-7.07780	-3.58970	-0.88770
C	-6.80350	-2.28200	-1.66720
C	-5.76720	-1.42500	-0.90000
C	-8.09900	-1.51780	-1.83630
O	-8.69090	-0.95230	-0.94070
O	-8.54060	-1.51610	-3.11650
O	-8.00590	-4.42450	-1.57090
O	-5.33910	-3.07940	1.38920
O	-4.58870	-2.19320	-0.65420
O	-2.80130	-2.96710	2.34130
O	-0.27610	-2.76430	1.97050
H	-6.22470	-1.13050	0.05030
H	-6.39980	-2.53540	-2.65650
H	-7.57110	-3.33180	0.05330
H	-7.61450	-4.66560	-2.42660
H	-5.95800	-5.19170	0.02460
H	-5.30260	-4.63770	-1.53180
H	-4.61230	-2.82320	1.99320
H	-3.42690	-4.92700	0.81300
H	-3.00260	-4.20180	-0.75050
H	-2.44980	-2.05260	0.51480
H	-2.02800	-2.63350	2.83240
H	0.69550	-2.82630	1.86110
H	-0.83030	-4.56710	1.10300
H	-0.89630	-3.66990	-1.22180
H	-0.39920	-2.08620	-0.64540
C	-5.31490	-0.18150	-1.67540
C	-4.86780	0.99670	-0.78350
C	-3.78970	0.64140	0.19860
C	-2.50120	1.02160	0.10200
C	-1.48820	0.62040	1.05340
C	-0.16730	0.92440	0.98090
C	0.78380	0.52310	1.98740
C	2.11430	0.81090	1.98440
H	2.54360	1.35640	1.14220
H	0.37630	-0.02820	2.83550
H	0.20190	1.51960	0.14440
H	-1.83160	0.01600	1.89310
H	-2.18510	1.65080	-0.73150

H	-4.10070	0.01090	1.02950
H	-4.51760	1.81490	-1.42450
H	-6.13000	0.17820	-2.31580
H	-4.49370	-0.46970	-2.34230
O	-5.99690	1.46220	-0.01270
C	-6.79420	2.44790	-0.64620
C	-8.14410	2.48680	0.10720
C	-8.70660	3.90230	0.04390
C	-7.73930	4.86050	0.76440
C	-6.25560	4.61180	0.36090
C	-5.37150	4.20300	1.54070
O	-8.17950	6.18230	0.42580
O	-8.00870	2.14120	1.48330
N	-10.07760	3.93140	0.54630
O	-6.14570	3.69330	-0.74720
H	-6.97430	2.16510	-1.69160
H	-8.83280	1.78680	-0.38350
H	-7.49710	1.31520	1.50100
H	-8.72900	4.21000	-1.01000
H	-7.84700	4.70010	1.84520
H	-7.77780	6.80190	1.05350
H	-5.88080	5.54630	-0.06980
H	-5.77440	3.31920	2.04020
H	-5.32270	5.02100	2.27130
H	-4.35510	3.98280	1.20040
C	3.00930	0.49630	3.08210
C	4.32120	0.80370	3.10390
C	5.23460	0.54400	4.26950
C	6.41460	-0.39970	3.95230
C	7.44760	0.10790	2.98290
C	7.56540	1.35500	2.49230
C	8.48280	1.67770	1.40880
C	8.37220	2.73950	0.58970
H	7.60880	3.49240	0.78970
H	9.23100	0.91930	1.17870
H	6.88620	2.14430	2.81140
H	8.12760	-0.65690	2.60310
H	5.63440	1.49870	4.64400
H	4.65510	0.11180	5.09450
H	4.75430	1.27530	2.22240
H	2.56080	0.01300	3.95280
H	6.01440	-1.34010	3.54710
H	6.91130	-0.67460	4.89630
C	9.13530	2.85640	-0.70880
C	8.39220	2.10590	-1.85680
C	7.00240	2.69800	-2.27190
C	5.80230	1.76170	-1.97930
C	4.46380	2.34220	-2.43040
C	7.06380	3.12030	-3.75130
C	9.46200	4.30750	-1.09070
O	8.29720	0.73540	-1.37760
H	4.30940	3.34220	-2.00840
H	3.65730	1.69550	-2.06970
H	4.39030	2.40300	-3.51950
H	5.96240	0.81240	-2.51390
H	6.82290	3.59410	-1.66370
H	7.17830	2.24310	-4.39850
H	7.92510	3.77440	-3.92830
H	6.17000	3.67050	-4.05880
H	9.04210	2.08230	-2.73620
H	10.08420	2.31570	-0.59360
H	8.55810	4.91890	-1.19350
H	10.01170	4.35720	-2.03800
H	10.08330	4.76900	-0.31610
H	-10.36920	4.90510	0.61960
H	-10.08470	3.54710	1.49090
H	6.51350	1.22630	-0.23080
H	-9.38910	-1.03190	-3.10920

6.5. *iso*-nystatin A₁ (conformer 2)

C	-9.42000	-0.69330	0.29240
C	-9.10930	-1.08630	-1.14180
C	-7.77870	-0.54330	-1.70280
C	-6.59100	-1.50140	-1.49160
C	-5.22620	-0.81940	-1.63140
C	-4.07550	-1.83260	-1.71900
C	-2.67870	-1.23220	-1.50730
C	-1.58000	-2.24440	-1.85880
O	-2.54680	-0.04990	-2.32770
O	-5.24530	0.00380	-2.80520
O	-7.99240	-0.32510	-3.09420
O	-10.51190	-0.35130	0.69290
O	-5.75350	-2.87140	3.41270
H	-1.76990	-3.17140	-1.29870
H	-1.70700	-2.48470	-2.92500
H	-2.57860	-0.93750	-0.45180
H	-2.03920	0.61730	-1.83550
H	-4.12920	-2.30910	-2.70720
H	-4.21710	-2.62410	-0.97150
H	-5.07360	-0.17830	-0.74570
H	-4.32260	0.30350	-2.92480
H	-6.68670	-2.30910	-2.23050
H	-6.63740	-1.95440	-0.49550
H	-7.55800	0.41140	-1.20790
H	-7.13090	-0.01840	-3.43240
H	-9.14010	-2.18210	-1.22000
H	-9.92650	-0.69890	-1.75430
C	-0.15160	-1.75950	-1.58370
C	0.91680	-2.80660	-1.92470
C	2.34240	-2.36330	-1.56140
C	3.33940	-3.53070	-1.61560
C	4.77480	-3.13550	-1.23040
C	5.70460	-4.34790	-1.14960
C	7.06370	-4.00130	-0.54690
C	6.88440	-3.21950	0.79860
C	5.87690	-2.05980	0.64300
C	8.27660	-2.83480	1.25970
O	8.53510	-1.50760	1.28660
O	9.14140	-3.65010	1.52990
O	7.75130	-5.22220	-0.35310
O	5.32810	-2.22120	-2.14630
O	4.65870	-2.55680	0.07780
O	2.74110	-1.29170	-2.44200
O	0.97750	-3.07950	-3.33330
H	6.30770	-1.31300	-0.03150
H	6.50110	-3.94510	1.52790
H	7.60990	-3.34850	-1.24640
H	8.52180	-5.03510	0.21470
H	5.85340	-4.77630	-2.14570
H	5.23990	-5.11240	-0.51710
H	4.60950	-1.59200	-2.36560
H	3.35320	-3.96370	-2.62200
H	2.99610	-4.31010	-0.92490
H	2.34930	-1.93570	-0.55650
H	2.42260	-1.56360	-3.32390
H	0.08240	-3.25600	-3.65840
H	0.69410	-3.73610	-1.37560
H	-0.05210	-1.50280	-0.52030
H	0.05510	-0.84640	-2.15240
C	5.46050	-1.40190	1.96830
C	5.09780	0.08950	1.83820
C	4.08350	0.40620	0.77670
C	2.85770	0.90840	1.02060
C	1.91910	1.26020	-0.02300
C	0.70600	1.82890	0.19390
C	-0.17480	2.28830	-0.85170
C	-1.36450	2.91090	-0.63160
H	-1.70360	3.02990	0.39890
H	0.18100	2.17960	-1.87810
H	0.38020	2.00200	1.22090
H	2.23870	1.06890	-1.04740
H	2.55050	1.10180	2.05020
H	4.39570	0.22930	-0.24870
H	4.72930	0.44540	2.81300
H	6.27130	-1.46330	2.70140

H	4.60310	-1.95500	2.36600
O	6.36670	0.72000	1.57220
C	6.46150	2.11100	1.53840
C	7.94750	2.41770	1.79780
C	8.25800	3.89280	1.53530
C	7.70510	4.30920	0.16110
C	6.20810	3.96370	0.06230
C	5.58650	4.29870	-1.28570
O	7.92640	5.71750	0.04360
O	8.76350	1.62780	0.94140
N	9.68280	4.14140	1.73140
O	6.03770	2.55680	0.26220
H	5.83160	2.57320	2.32130
H	8.16520	2.18750	2.85260
H	8.32480	0.76060	0.87300
H	7.71260	4.48670	2.28510
H	8.24460	3.75690	-0.62170
H	7.87890	5.95210	-0.89480
H	5.67900	4.51950	0.85670
H	6.09870	3.75760	-2.08980
H	5.65030	5.37460	-1.48050
H	4.53090	4.01120	-1.29810
C	-2.21000	3.48470	-1.65650
C	-3.36880	4.12660	-1.40450
C	-4.27470	4.70660	-2.44910
C	-5.54740	3.84360	-2.69550
C	-6.50270	3.74180	-1.53200
C	-6.37090	2.86280	-0.52280
C	-7.36590	2.61320	0.50860
C	-7.23340	1.68320	1.47050
H	-6.28460	1.15020	1.55210
H	-8.30800	3.15740	0.42030
H	-5.49930	2.20720	-0.51420
H	-7.37200	4.40070	-1.54380
H	-4.58190	5.72030	-2.15640
H	-3.73420	4.79610	-3.39990
H	-3.70730	4.20420	-0.37130
H	-1.86300	3.39870	-2.68820
H	-5.22660	2.83460	-2.98100
H	-6.07660	4.26450	-3.55910
C	-8.33660	1.26170	2.41130
C	-8.43730	-0.29620	2.46710
C	-7.35960	-1.02450	3.31400
C	-6.92830	-2.40530	2.73820
C	-8.01460	-3.48280	2.73680
C	-7.81160	-1.15910	4.78010
C	-8.21400	1.94560	3.78710
O	-8.32540	-0.77760	1.09280
H	-8.32650	-3.74150	3.75690
H	-7.62850	-4.39270	2.26610
H	-8.90500	-3.16130	2.18780
H	-6.59360	-2.24470	1.71220
H	-6.43890	-0.42620	3.29960
H	-8.74490	-1.72760	4.86390
H	-7.97630	-0.19050	5.25440
H	-7.04430	-1.67240	5.37100
H	-9.43610	-0.56730	2.82290
H	-9.28510	1.59450	1.97390
H	-7.26000	1.72510	4.27830
H	-9.02840	1.65140	4.45930
H	-8.26820	3.03080	3.65290
H	-6.02900	-3.23360	4.26920
H	9.47040	-1.41260	1.55450
H	10.20440	3.50040	1.13440
H	9.88620	5.08530	1.40630

7. Molecular modeling

7.1. Experimental.

Nystatin A₁ (1) and iso-nystatin A₁ (2) in water. Molecular dynamics (MD) simulations were performed for zwitterionic form of **1** and zwitterionic form of **2** explicitly solvated in a dodecahedron box with 2341 and 1675 of TIP3P water molecules, respectively. The force field parameters for **1** and **2** were taken from the CHARMM Generalized Force Field (CGenFF).¹ All energy minimizations and MD simulations were carried out using GROMACS 4.5.² The particle Mesh Ewald technique with a cutoff of 1 nm and grid spacing of approx. 0.1 nm was used to evaluate electrostatic forces.³ The van der Waals interactions were calculated using Lennard-Jones potential with a cutoff of 1 nm. The simulation was conducted at a constant temperature of 300 K and at a constant pressure of 1 bar, using the weak coupling method⁴ with relaxation times of 0.1 ps and 0.5 ps, respectively. All covalent bonds lengths were constrained using P-LINCS⁵ and SETTLE⁶ thermalization of 2 ns, the two systems were simulated for 200 ns using the leapfrog scheme with a time step of 2 fs.

Nystatin A₁ (1) in pyridine. Molecular dynamics (MD) simulations were performed for **1** explicitly solvated with 485 pyridine molecules in a dodecahedron box. The force field parameters for **1** and pyridine were taken from the CHARMM Generalized Force Field (CGenFF).¹ All energy minimizations and MD simulations were carried out using GROMACS 4.5.² using the simulation setup described above. After initial thermalization of 2 ns, the system was simulated for 200 ns using the leapfrog scheme with a time step of 2 fs.

- (1) K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, A. D. Mackerell, *J. Comput. Chem.*, **2010**, 31 (4), 671-690.
- (2) B. Hess, C. Kutzner, D. Van Der Spoel, E. Lindahl, *J. Chem. Theory Comput.*, **2008**, 4 (3), 435-447.
- (3) T. Darden, D. York, L. Pedersen, *The Journal of chemical physics*, **1993**, 98 (12), 10089-10092.
- (4) H. J. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. R. H. J. DiNola, J. R. Haak, *J. Chem. Phys.*, **1984**, 81 (8), 3684-3690.
- (5) B. Hess, *J. Chem. Theory Comput.*, **2008**, 4, 116-122.
- (6) S. Miyamoto, P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.*, **1992**, 13, 952-962.

7.2. Results and discussion.

7.2.1. Nystatin A₁ (1) in water.

As can be seen from (Figure 1), compound **1**, originally in the fully-stretched conformation (the angle C21-C28-C32 equal to ~160° and the dihedral angle C27-C28-C29-C30 equal to ~180°), known to be essential for the formation of lethal for eukaryotes membrane permeability changes, after 5 ns of simulation underwent a transition to a bent conformation, characterized by the angle C21-C28-C32 oscillating around 90° and the dihedral angle C27-C28-C29-C30 switching between the two gauche conformers (60° and 300°). At the same time, the separation distance between C1 and O35, critical for translocation, changed from the value of ~0.5 nm, typical for the fully-stretched conformation, to the values ranging from 0.32 to 0.45 nm in the bent conformation. After this initial conformational transition, the molecule existed largely in the bent state, occasionally switching back to the fully-stretched conformation (~16 % of the total simulation time).

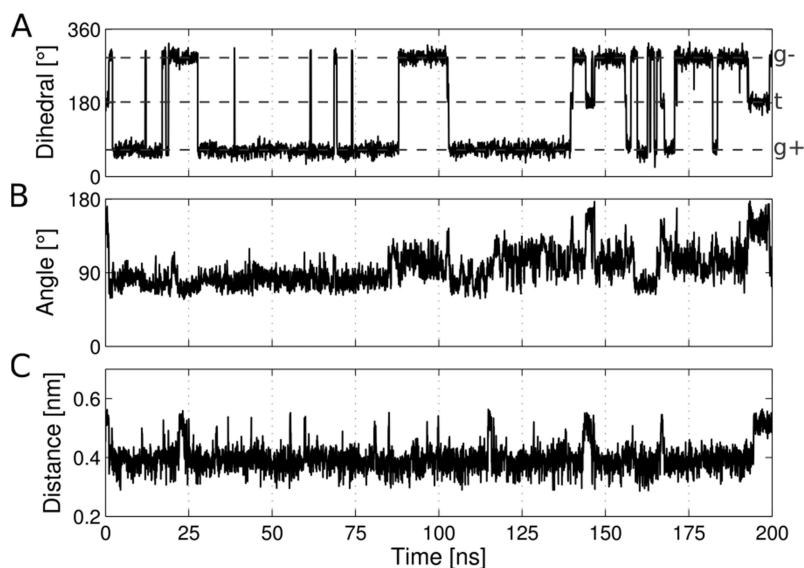


Figure 1. Time evolution of the geometric parameters defining the conformational state of **1** in aqueous solution: dihedral angle C27-C28-C29-C30 (A), the angle C21-C28-C32 (B) and the C1-O35 distance (C). Horizontal dashed line in the top panel (A) show the average values of the dihedral in trans (t) and gauche (g+, g-) conformations.

7.2.2. Nystatin A₁ (**1**) in pyridine.

The simulation of **1** in the pyridine (chosen as environment due to the use of pyridine as NMR solvent) led to similar results as described above for water. (Figure 2) clearly shows that the antibiotic molecule, originally in fully-stretched conformation, after 3 ns of the simulation adopted the bent conformation favoring intramolecular translaconisation. Afterwards, the molecule was structurally more stable than it was the case in water, with only one event of moving back to the fully-stretched state around 102 ns. Interestingly, the average C1-O35 distance in the bent conformation is noticeably smaller in pyridine than in water (0.38 and 0.39 nm, respectively).

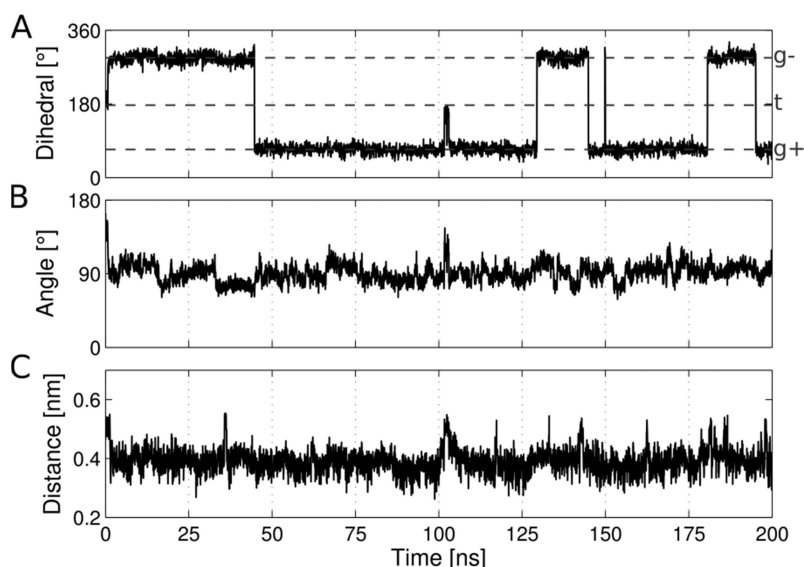


Figure 2. Time evolution of the geometric parameters defining the conformational state of **1** in pyridine solution: dihedral angle C27-C28-C29-C30 (A), the angle C21-C28-C32 (B) and the C1-O35 distance (C). Horizontal dashed line in the top panel (A) show the average values of the dihedral in trans (t) and gauche (g+, g-) conformations.

7.2.3. *Iso*-nystatin A₁ (**2**) in water.

The time evolution of the angle C21-C28-C32 and the dihedral angle C27-C28-C29-C30 clearly shows that after translactonisation the antibiotic molecule adopts a stable bent conformation (Figure 3), which is expected to interfere with the ability of the antibiotic to assemble into specific membrane channels in eukaryotes cells. As a result of shortening of the macrolactone ring by two carbon atoms, the product of isomerisation is also conformationally less flexible than **1**. Still, the dihedral angle C27-C28-C29-C30 switches between the two gauche conformers (60° and 300°). At the same time, the separation distance between C1 and O37, critical for reverse translactonisation to the native isomer of nystatin A₁, remains in the range from 0.35 to 0.45 nm, infrequently changing to ~0.55 nm. Notably, both the average C1- O37 distance and the fluctuations around it in **2** are similar to these found for the C1-O35 distance in the bent conformation of the native **1**, suggesting the similar character of the pre-reaction conformational dynamics. Assuming that the rate of translactonisation in both directions is limited by the time scale at which the two functional groups approach each other, this similarity is consistent with a near 1:1 ratio of **1** to **2** in “post-translactonisation” steady state, observed in the ¹H NMR spectrum of **1** and **2** mixture.

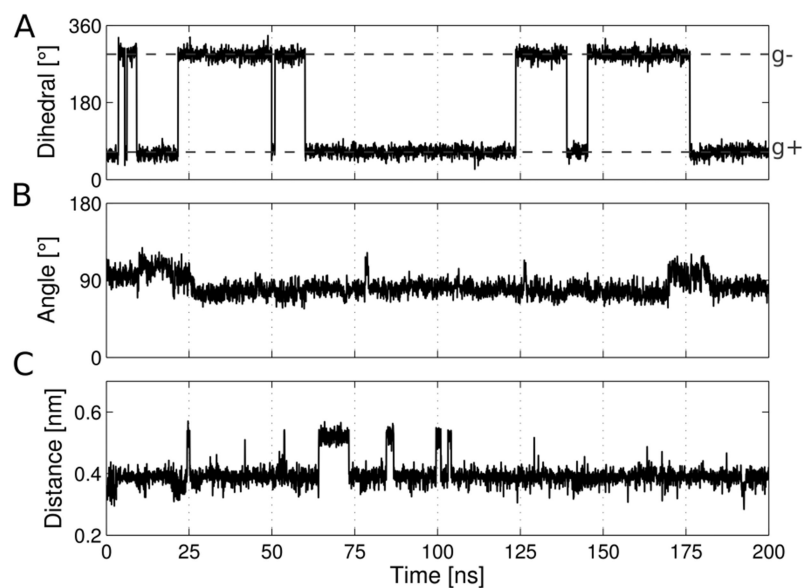
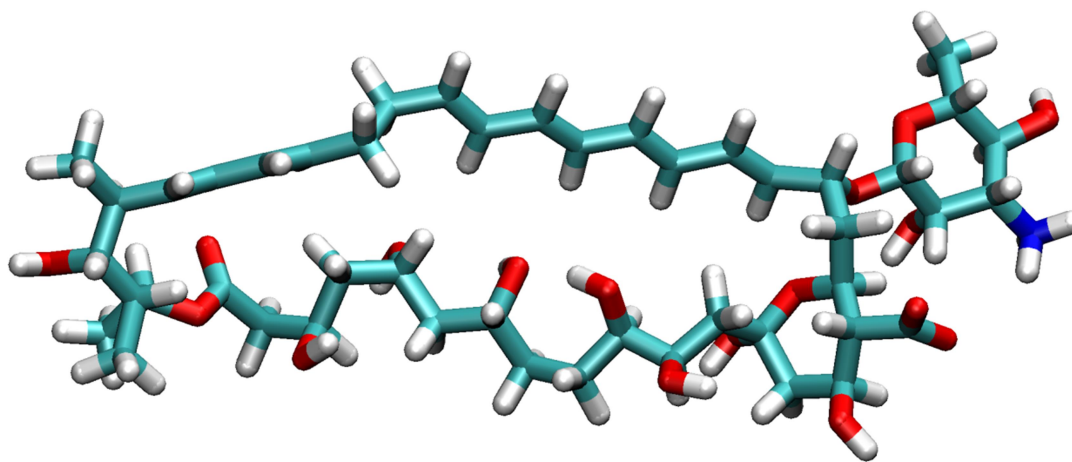


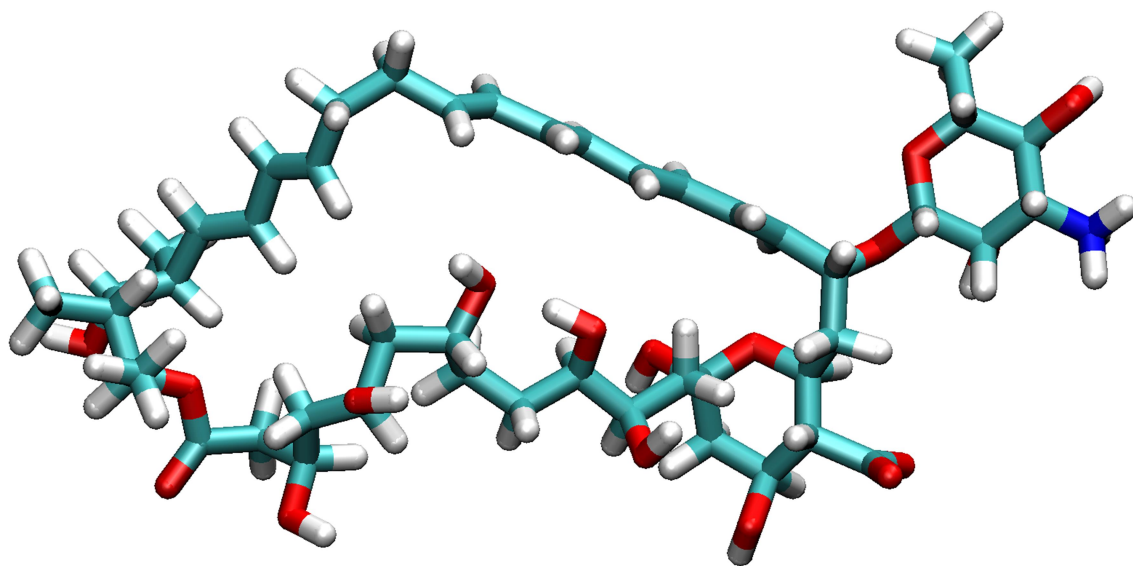
Figure 3. Time evolution of the geometric parameters defining the conformational state of **2** in aqueous solution: dihedral angle C27-C28-C29-C30 (A), the angle C21-C28-C32 (B) and the C1-O37 distance (C). Horizontal dashed line in the top panel (A) show the average values of the dihedral in gauche (g+, g-) conformations.

8. Molecular modeling – figures

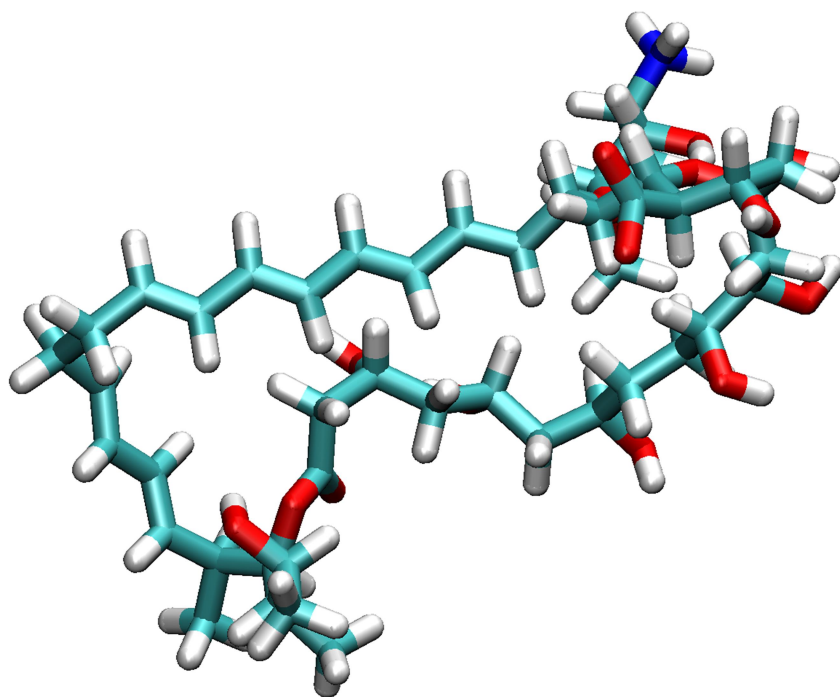
8.1. Nystatin A₁ (linear)



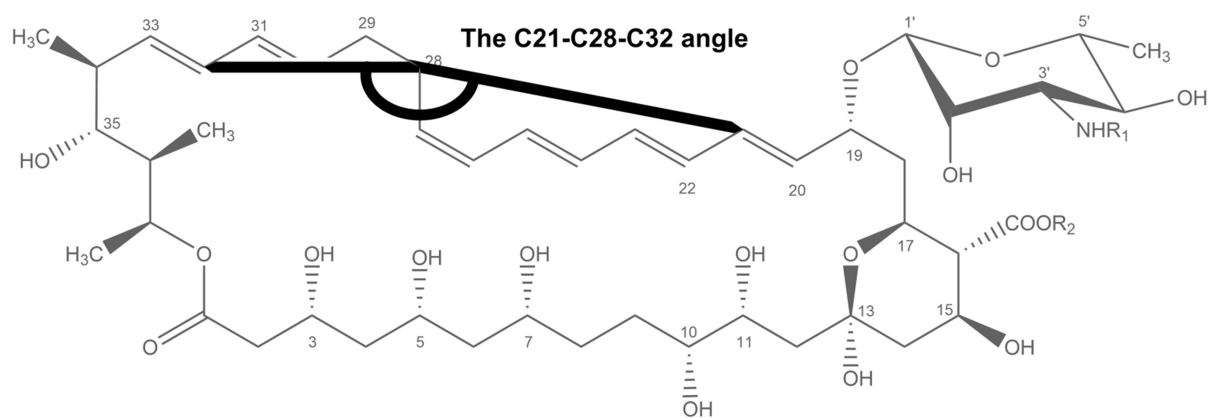
8.2. Nystatin A₁ (**bent**)



8.3. *Iso*-nystatin A₁



8.4. The C21-C28-C32 angle which gives an insight into the relative orientation of the diene and tetraene fragment of **1** and **2**.



nystatin A₁ (**1**)

3'-*N*-acetylnystatin methyl ester A₁ (**3**)

R₁=H, R₂=H

R₁=COCH₃, R₂=CH₃

Przyczyną izomeryzacji nystatyny A_1 jest wewnątrzcząsteczkowa reakcja translaktonizacji antybiotyku, w wyniku której powstaje izomer związku, *izo*-nystatyna A_1 . Na podstawie widma HMBC wykazano, że w stosunku do cząsteczki natywnej, makrocykliczny pierścień *izo*-nystatyny A_1 jest pomniejszony o dwa atomy węgla. Reakcja zachodzi z udziałem grupy hydroksylowej związanej z węglem C35. Kluczowa dla zjawiska jest obecność chromoforu o układzie tetraenodienowym. Dzięki pewnej swobodzie obrotu wokół wiązania pojedynczego części chromoforowej aglikonu istnieje możliwość zbliżenia się, na odpowiednio małą odległość, grupy hydroksylowej związanej z węglem C35 do wiązania laktonowego i tym samym utworzenie nowego wiązania. Połączenie techniki NMR, umożliwiającej pełne i precyzyjne zdefiniowanie struktury, wspomagane modelowaniem molekularnym, pozwoliły określić dynamikę badanych układów w roztworze. Ze względu na to, że o kierunkowości samorzutnych procesów decydują różnice energii swobodnej poszczególnych konformerów nystatyny A_1 , metody obliczeniowe pomogły ustalić szczegóły dotyczące przebiegu reakcji translaktonizacji antybiotyku.

5. 2. Stereostruktura kandycydyny D

Spośród całej grupy polienów, aromatyczne makrolidy polienowe, do których zaliczany jest kompleks Kandycydyny, wykazują najwyższą aktywność przeciwgrzybową [106], dlatego zasługują na szczególne zainteresowanie. Dotychczasowy stan wiedzy na temat kandycydyny D nie uwzględniał wiedzy na temat jej stereostruktury, co było podstawą podjęcia badań w niniejszej pracy. Aktualne możliwości techniczne spektroskopii NMR umożliwiają potwierdzenie stereostruktury pierścienia makrolidowego antybiotyków z grupy makrolidów polienowych na związkach o nienaruszonym szkielecie węglowym w jednej serii eksperymentów.

W celu wykonania badań stereochemicznych kandycydyny D, należało wydzielić ją z badanego kompleksu antybiotyków. Przed przystąpieniem do izolacji wyjściowy kompleks antybiotyków poddano modyfikacjom chemicznym, głównie w celu oczyszczenia badanego kompleksu ze zbędnych polienów o krótszych chromoforach. Aby uzyskać pochodną odpowiednią do badań stereochemicznych przeprowadzono acetylowanie grupy aminowej reszty cukrowej mykozaminy oraz estryfikację grupy karboksylowej związanej z węglem C18 pierścienia makrolaktonowego. Po każdej reakcji otrzymany produkt oczyszczano, stosując chromatografię cieczową typu FLASH oraz ekstrakcję butanolem. W rezultacie otrzymano estry metylowe *N*-acetylo-kandycydyn. Zabiegi te przyczyniły się nie tylko do oczyszczenia, ale również zmniejszyły tendencję antybiotyku do asocjacji, zwiększyły jego rozpuszczalność w układach zawierających wodę. W ten sposób znacząco poprawiły efektywność procesu rozdzielania badanego kompleksu z zastosowaniem chromatografii cieczowej (RP-HPLC). Miały również, co istotne, wpływ na żywotność kolumny chromatograficznej podczas pracy, ze względu na zaobserwowane zjawisko trwałej sorpcji. Ponadto, modyfikacje nie wprowadziły dużej ilości dodatkowych sygnałów w eksperymentach NMR. Uzyskanie odpowiedniej ilości pochodnej było procesem bardzo pracochłonnym. Wyniki przedstawiono w publikacji.

ORIGINAL ARTICLE

The stereostructure of candicidin D

Katarzyna Szwarc, Paweł Szczęblewski, Paweł Sowiński, Edward Borowski and Jan Pawlak

The candicidin D stereostructure was established based on NMR studies including DQF-COSY, ROESY, HSQC and HMBC experiments. The relative configurations of the candicidin D stereogenic centers were assigned as the following: $9R^*$, $11S^*$, $13S^*$, $15R^*$, $17S^*$, $18R^*$, $19S^*$, $21R^*$, $36S^*$, $37R^*$, $38S^*$, $40S^*$ and $41S^*$. The geometry of the heptaene chromophore was defined as $22E$, $24E$, $26Z$, $28Z$, $30E$, $32E$ and $34E$.

The Journal of Antibiotics advance online publication, 25 February 2015; doi:10.1038/ja.2015.17

INTRODUCTION

The antifungal antibiotic candicidin D, an aromatic heptaene¹ macrolide, is the main component of the candicidin complex produced by *Streptomyces griseus* IMRU 3570.^{2,3} This antibiotic complex belongs to the polyene macrolide family, the most promising antifungal agents for topical and systemic fungal infection treatment due to their unique (among antifungal chemotherapeutics) properties. These properties include a high antifungal activity, broad antifungal spectrum, fungicidal action and the ability to overcome fungal multidrug resistance by not being the substrates of multidrug-resistant proteins exporting the drugs from the fungal cells.⁴

Candidicins, as well as other polyene macrolide aromatic subgroup, are of interest due to their highest antifungal activity among polyene macrolides³ and other activities comprising inhibitory action on prostate cancer growth⁵ as well as their significant antiviral activity.⁶ However, these compounds exhibit several negative features, such as the lack of water solubility and rather high animal toxicity, which limit the applications for their clinical use in the treatment of systemic fungal infections. Nevertheless, topical applications of the candicidin

complex, partricins, levorins and trichomycin complexes are still continued.

Efforts have been made to overcome the compounds' disadvantages by chemical modifications.⁷ In the latter case, the achievements have not been satisfactory due to the lack of structural data indispensable for the rational modification of native compounds. The available structural data comprise levorins,^{8,9} trichomycins,^{10,11} 67-121-A, 67-121-C,¹² perimicin A¹³ and aureofacin complex components, vacidin¹⁴ (syn. partricin A¹⁵) and gedamycin¹⁶ (syn. partricin B¹⁵). However, the first discovered and most studied antifungal aromatic heptaenes, candicidins,² lack complete stereostructures.¹⁷ In this study, we report the NMR studies of candicidin D, which result in its complete stereostructure assignment (Figure 1).

RESULTS AND DISCUSSION

The candicidin complex was derivatized by *N*-acetylation followed by esterification with diazomethane, which facilitated the purification process and chromatographic separation of the candicidin complex components. This type of derivative allowed for utilization of a wide

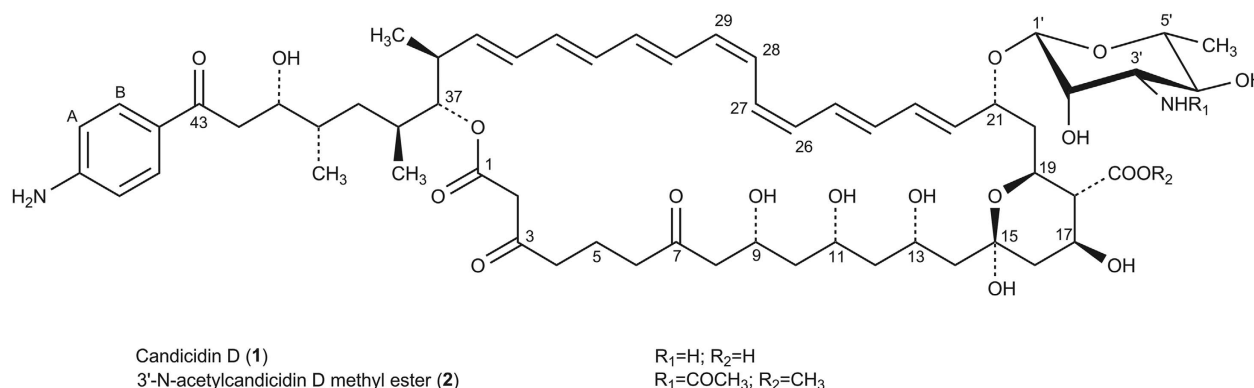


Figure 1 The structures of candicidin D (1) and its derivative, 3'-*N*-acetylcandicidin D methyl ester (2).

Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland
Correspondence: K Szwarc, Chemical Faculty, Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Gdańsk University of Technology, Narutowicza St 11/12, Gdańsk 80-233, Poland.

E-mail: katszwarz@wp.pl

Received 23 January 2014; Received 13 August 2014; accepted 29 January 2015

variety of NMR solvents. The isolated 3'-*N*-acetylcandicidin D methyl ester (**2**) (Figure 1) was analyzed by UV, MS, IR and NMR methods.

The UV spectrum (Figure 2) of the methyl ester of 3'-*N*-acetylcandicidin D (**2**) displayed three absorption maxima at $\lambda_1 = 360$ nm, $\lambda_2 = 380$ nm and $\lambda_3 = 401$ nm, which were attributed to seven conjugated double bonds. The intensity of the longest wavelength absorption peak at 401 nm was lower than that at 380 nm. According to the literature,³ this result suggested the presence of internal *cis* double bonds, which was further proved by our NMR studies.

The ESI quadrupole time-of-flight mass spectrum (ESI-Q-TOF MS) of the methyl ester of 3'-*N*-acetylcandicidin D (**2**) showed the ion at m/z 1163.5973 of the (M-H)⁻ type (calculated for C₆₂H₈₈O₁₉N₂ m/z 1163.5908 of (M-H)⁻ type, error of mass measurement accuracy $\Delta = 5.6$ p.p.m.). Taking into account performed derivatization of the antibiotic molecule, the MW of unsubstituted candicidin D (**1**) was

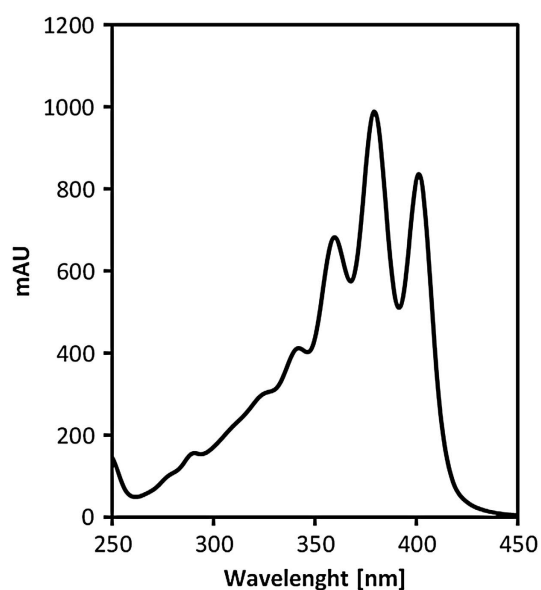


Figure 2 The UV spectrum of 3'-*N*-acetylcandicidin D methyl ester (**2**) in methanol.

deduced as 1108 mass units, which corresponded to its known molecular formula, C₅₉H₈₄O₁₈N₂.¹⁷

The IR spectrum of **2** was recorded to fulfill the new compounds (Figure 3). However, due to the multifunctional character of the candicidin D molecule, an IR spectrum may be useful as a fingerprinting standard.

The NMR studies of **2**, consisting of double-quantum filtered-COSY (DQF-COSY), ROESY, HSQC and HMBC experiments, allowed for full proton and carbon assignments, which are presented in Table 1 and Table 2, respectively. The vicinal coupling constants, shown in Table 1 were extracted from 1D ¹H NMR spectrum of **2**, and in some cases from the analysis of the phase structure of the cross-peaks observed in the DQF-COSY spectrum of **2**.

The DQF-COSY spectrum analysis of **2** revealed the connectivities within five of the six structural blocks, namely C4-C6, C8-C14, C16-C42, which are aromatic and sugar moieties that are separated by the quaternary carbons C-1, C-3, C-7, C-15 and C-43 as well as by a glycosidic bond. The isolated methylene group, C-2, was found by long-range heteronuclear connectivities observed in the HMBC spectrum (2a-H/C-1, 2b-H/C-1, 2a-H/C-3 and 2b-H/C-3).

The sequence and orientation of the aforementioned structural blocks were assembled based on the HMBC experiment, the results of which were in accordance with data derived from the ROESY spectrum. Thus, blocks C4-C6 and C8-C14 were linked via C-7 due to couplings 8b-H/C-7 and 6-H/C-7. The connection of the blocks C8-C14 and C16-C42 resulted from 14a-H/C-15 and 16a-H/C-15. The acyloxy proton chemical shift (37-H, 5.04 p.p.m.), associated with correlations 2a-H/C-1, 2b-H/C-1 and 37-H/C-1, revealed the presence of the lactone bond between C-1 and C-37. The macro-lactone ring was finally closed by the C-3 keto group due to the couplings 2a-H/C-3, 2b-H/C-3, 4a-H/C-3 and 4b-H/C-3. The attachment of aromatic moiety via C-43 to the C16-C42 fragment was established based on 42a-H/C-43, 42b-H/C-43 and B-H/C-43 connectivities. The location of the 3'-*N*-acetylmicosaminyl substituent at C-21 was noted by the 1'-H/C-21 correlation.

The geometry of the heptaene chromophore was established as 22*E*, 24*E*, 26*Z*, 28*Z*, 30*E*, 32*E* and 34*E*, as derived from a set of vicinal coupling constants that were extracted from high-resolution DQF-COSY spectrum. The following coupling constants, $J_{22,23}$, $J_{24,25}$, $J_{30,31}$, $J_{32,33}$, $J_{34,35}$, contained within a range from 15 to 16 Hz, determined E

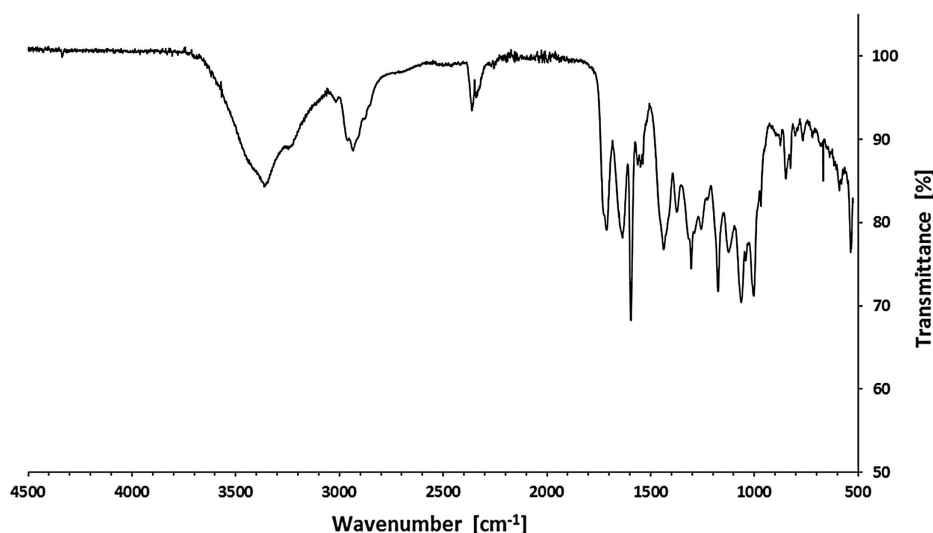


Figure 3 The IR spectrum of 3'-*N*-acetylcandicidin D methyl ester (**2**). The following bands were recorded: 3350, 2910, 1710 and 1630 cm⁻¹.

Table 1 ^1H NMR data for 2

Proton no.	^1H δ (p.p.m.)	$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	ROE contacts
Aglycone			
2a	3.53	15.0 (2b)	2b
2b	3.63	15.0 (2a)	2a
4a	2.51	17.4 (4b), 5.3 (5)	5, 4b
4b	2.60	17.4 (4a), 10.4 (5)	4a
5 (2H)	1.89	5.3 (4a), 10.4 (4b), 7.6 (6)	4a, 6
6 (2H)	2.39	7.6 (5)	5
8a	2.43	16.8 (8b), 4.2 (9)	8b, 9, 10a
8b	2.71	16.8 (8a), 9.0 (9)	8a, 10b
9	4.67	4.2 (8a), 9.0 (8b), 3.9 (10a), 8.4 (10b)	8a, 10a, 11, 26, 27
10a	1.53	3.9 (9), 14.0 (10b), 3.6 (11)	8a, 9, 10b, 11
10b	1.77	8.4 (9), 14.0 (10a), 9.1 (11)	8b, 10a
11	4.27	3.6 (10a), 9.1 (10b), 4.0 (12a), 9.1 (12b)	9, 10a, 12a, 13
12a	1.46	4.0 (11), 14.3 (12b), 3.5 (13)	10a, 11, 12b, 13
12b	1.72	9.1 (11), 14.3 (12a), 10.1 (13)	12a, 14b
13	4.70	3.5 (12a), 10.1 (12b), 4.2 (14a), 10.1 (14b)	11, 12a, 14a, 22, 24
14a	1.78	14.0 (14b), 4.2 (13)	14b, 16a
14b	1.96	14.0 (14a), 10.1 (13)	12b, 14a, 16b
16a	1.73	14.0 (16b), 8.6 (17)	14a, 18, 16b
16b	2.52	14.0 (16a), 4.8 (17)	14b, 17, 16a
17	4.96	8.6 (16a), 4.8 (16b), 10.5 (18)	16b
18	2.81	10.5 (17), 10.5 (19)	16a, COOMe, 20a
19	4.95	10.5 (18), 6.4 (20a), 2.3 (20b)	22
20a	2.02	6.4 (19), 15.6 (20b), 1.5 (21)	18, 21
20b	2.32	2.3 (19), 15.6 (20a), 5.1 (21)	1'
21	4.87	1.5 (20a), 5.1 (20b), 8.0 (22)	1', 20a, 22
22	6.31	8.0 (21), 15.0 (23)	13, 19, 21
23	6.43	15.0 (22), 11.0 (24)	25
24	6.56	11.0 (23), 16.0 (25)	11, 13, 22, 26
25	6.88	16.0 (24), 11.0 (26)	23, 28
26	6.40	11.0 (25), 11.0 (27)	9, 11, 27
27	6.87	11.0 (26), 11.0 (28)	9, 26, 30
28	6.68	11.0 (27), 11.0 (29)	25, 29
29	6.26	11.0 (28), 11.0 (30)	28, 31
30	7.12	11.0 (29), 16.0 (31)	27, 32
31	6.41	16.0 (30), 11.0 (32)	29
32	6.50	11.0 (31), 15.0 (33)	30, 34
33	6.39	15.0 (32), 10.0 (34)	35
34	6.18	10.0 (33), 15.0 (35)	32, 36
35	5.58	15.3 (34), 9.0 (36)	33, 36, 37, Me36
36	2.50	9.0 (35), 6.8 (Me36), 9.7 (37)	34, 35, Me36, Me38
37	5.04	9.7 (36), 3.5 (38)	35, 38, 39a, Me36
38	2.04	3.5 (37), 6.9 (Me38), 4.2 (39a), 7.8 (39b)	37, 39a, Me36, Me38, Me40
39a	1.34	4.2 (38), 16.0 (39b), 11.1 (40)	38, 41
39b	1.72	7.8 (38), 16.0 (39a), 4.0 (40),	39a, 41
40	1.98	11.1 (39a), 4.0 (39b), 7.3 (Me40), 8.7 (41)	41, 42a, 42b, Me38, Me40
41	4.45	8.7 (40), 4.4 (42a), 9.0 (42b)	39b, 40, 42a, Me40, B
42a	3.09	4.4 (41), 15.6 (42b)	40, 41, Me40, B
42b	3.33	9.0 (41), 15.6 (42a)	40, B
Me36	0.95	6.8 (36)	35, 36, 37, 38
Me38	0.96	6.9 (38)	36, 38, 39b, 40
Me40	1.06	7.3 (40)	38, 39a, 40, 41, 42a, 42b
COOMe	3.74	—	18, 1'
Aromatic protons			
A (2H)	6.91	8.8 (B)	B
B (2H)	8.10	8.8 (A)	41, 42a, 42b, A
3'-N-acetylmicosamine moiety			
1'	4.91	~0 (2')	2', 3', 5', 20b, 21
2'	4.40	~0 (1'), 4.4 (3')	1'
3'	4.63	4.4 (2'), 9.5 (4')	1', 5'
4'	3.98	9.5 (3'), 9.5 (5')	NHCOMe
5'	3.71	9.5 (4'), 6.6 (6')	1', 3', 6'
6'	1.52	6.6 (5')	5'
NHCOMe	8.82	—	4', NHCOMe
NHCOMe	2.04	—	NHCOMe

Table 2 ^{13}C NMR data for 2

^{13}C atom no.	^{13}C δ (p.p.m.)	^{13}C atom no.	^{13}C δ (p.p.m.)
Aglycone		32	132.6
1	166.7	33	133.5
2	48.5	34	131.5
3	201.6	35	137.3
4	42.0	36	40.0
5	17.1	37	81.1
6	42.4	38	31.0
7	208.8	39	36.8
8	50.1	40	36.3
9	67.2	41	71.9
10	43.7	42	41.8
11	72.2	43	197.5
12	43.8	Me36	16.1
13	68.8	Me38	12.0
14	46.5	Me40	15.4
15	97.9	COOMe	173.7
16	44.8	COOMe	51.3
17	66.0	Aromatic carbons	
18	58.2	CA	113.0
19	66.0	CB	131.0
20	37.8	C*CO	154.1
21	76.0	C*NH2	126.7
22	136.8		
23	130.3	3'-N-acetylmicosamine moiety	
24	134.2	1'	98.3
25	127.2	2'	70.6
26	133.1	3'	55.8
27	124.8	4'	71.4
28	124.8	5'	74.2
29	130.5	6'	18.0
30	128.7	NHCOOMe	170.7
31	134.2	NHCOOMe	22.4

geometry; $J_{26,27}$ and $J_{28,29}$, equal to 11 Hz, are indicative of the presence of two double bonds with *Z* geometry. This assignment was in full agreement with the ROEs of 25-H/28-H, 26-H/27-H, 27-H/30-H and 28-H/29-H.

The chemical shifts of the heptaene chromophore resonances observed in the ^{13}C NMR spectrum of 2 (C-25, C-27, C-28 and C-30) were shielded by ~ 5 p.p.m. due to the C25-C28 and C27-C30 γ effects.¹⁸ Consequently, all olefinic carbons signals appear in wider range (124.5–137.0 p.p.m.) compared with the more condensed correlation patterns in all *trans*-heptaenes (130–138 p.p.m.).^{19,20} The proton chemical shifts (25-H, 27-H, 28-H and 30-H) reflected deshielding effects typical of *cis* double bonds,²¹ which explains why the signals of all olefinic protons occupied a range of chemical shifts almost twice as wide as that of non-aromatic heptaenes.

The C15-C21 segment geometry was derived as follows: the characteristic C-15 chemical shift observed in the ^{13}C NMR spectrum at 97.9 p.p.m. revealed the presence of a hemiketal carbon. This chemical shift suggested the existence of a six-membered hemiketal ring with an oxygen bridge between C-15 and C-19, which had only been previously suggested.¹⁷ Taking into account the values of vicinal coupling constants ($J_{16a,17} = 8.6$ Hz, $J_{17,18} = 10.5$ Hz, $J_{18,19} = 10.5$ Hz), the orientation of all protons in hemiketal ring was established as an axial, and thereby the hemiketal ring was found to adopt a chair conformation. The antiperiplanar orientation of proton 20a-H with relation to the 19-H resulted from the vicinal coupling constant

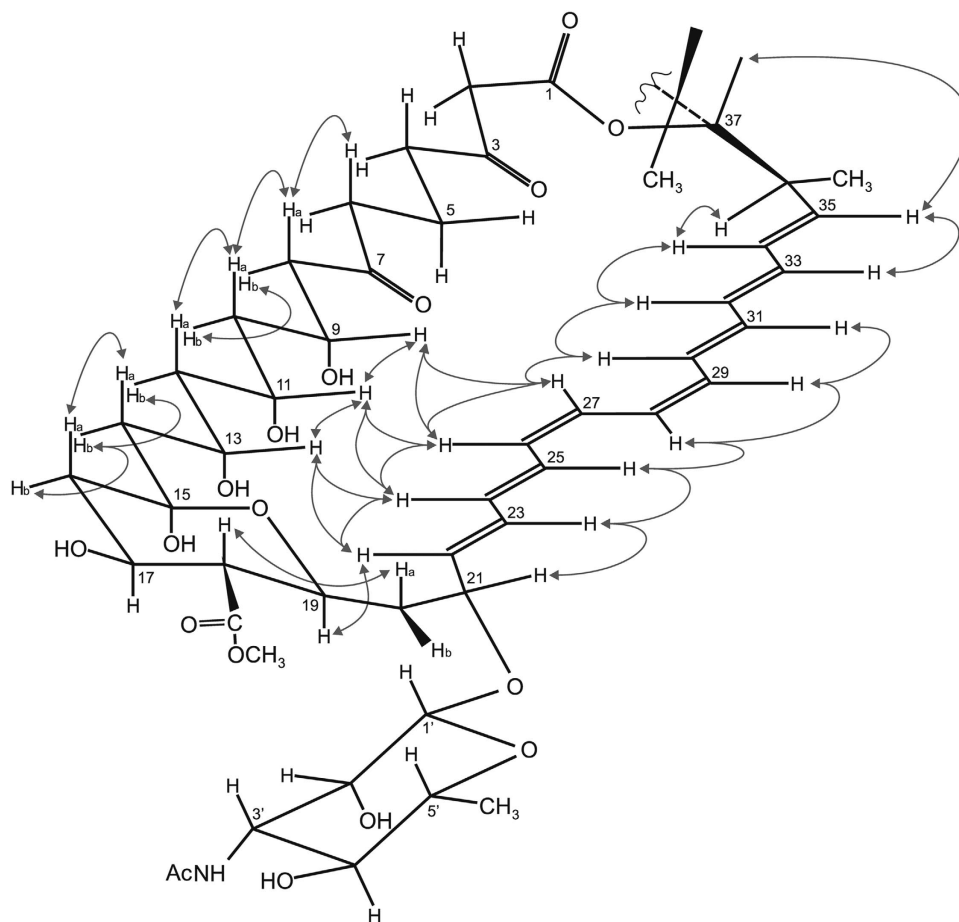
$J_{19,20a} = 6.0$ Hz and ROE 18-H/20a-H. The remaining hemiketal ring substituent, the C-14 methylene group, was determined to occupy an equatorial position on ROEs: 14a-H/16a-H and 14b-H/16b-H. The DQF-COSY data, $J_{20a,21} = 1.5$ Hz, $J_{20b,21} = 5.1$ Hz, $J_{21,22} = 8.0$ Hz, combined with the ROEs, 19-H/22-H and 21-H/23-H, situated the C15-C21 fragment in relation to the heptaene chromophore plane. On the basis of this study, the relative configuration of chiral centers within the discussed fragment was assigned as 15*R**, 17*S**, 18*R**, 19*S** and 21*R**.

The C8-C14 fragment geometry of 2 was established based on the scalar couplings and adequate ROEs. The hydroxymethine protons, coupled to four protons of adjacent methylene groups, exhibited characteristic multiplicity resulting from two pairs of small (from 3.5 to 4.2 Hz) and large (from 8.4 to 10.0 Hz) vicinal couplings. This regular alignment of the protons, 9-H, 11-H, 13-H, is supported by a set of ROEs, as follows: 9-H/26-H, 9-H/27-H, 11-H/24-H, 11-H/26-H, 13-H/22-H, 13-H/24-H (Figure 4). Thus, the C8-C14 segment relative configuration was defined as 9*R**, 11*S** and 13*S**.

Within the C4-C6 fragment, we observed a strong, coupled six-spin system in the DQF-COSY spectrum. However, we established the mutual orientation of the fragments C4-C6 and C8-C14 by 8a-H/6-H ROE. This Overhauser effect correlated with the ROEs (8a-H/10a-H, 10a-H/12a-H, 14a-H/16a-H and 9-H/11-H, 11-H/13-H) strongly suggested a full, stretched conformation of the C6-C14 fragment. The conformation was determined by the aforementioned spatial relationships of the hydroxymethine protons to the heptaene chromophore (Figure 4).

The conformation determination of the mycosaminyl substituent resulted from the analysis of the vicinal coupling constants: $J_{2',3'} = 4.4$ Hz, $J_{3',4'} = 9.5$ Hz, $J_{4',5'} = 9.5$ Hz. This data pointed out the chair conformation with 3'-H, 4'-H and 5'-H in axial positions, while 2'-H was found to be equatorial. The β -configuration of the glycosidic bond was assigned from ROEs: 1'-H/3'-H, 1'-H/5'-H and 3'-H/5'-H. The D-configuration of the mycosamine moiety was determined by the comparison of the specific rotations of $[\alpha]_D^{20}$ -D-O-methyl-N-acetylmicosaminide ($[\alpha]_D^{20} +46.0$ ($c=1$, methanol), obtained via standard deglycosylation of the N-acetylcandicidin complex with that obtained from nystatin A₁ ($[\alpha]_D^{23} +47.0$ ($c=0.9$, ethanol)).²² These specific rotations were comparable. The complete stereostructure of mycosamine from nystatin was previously elucidated by specific chemical degradation²³ and its resynthesis.²⁴

It was assumed during elucidation of the stereochemistry of the C36-C42 fragment that one major conformer population represented it. The vicinal coupling constants within the fragment exhibited both small and large values, which indicated that the rotation of the side chain is limited due to the steric interactions. On the basis of scalar couplings and ROEs (Figure 5, Table 1), the relative configuration of the C36-C42 fragment was established as 36*S**, 37*R**, 38*S**, 40*S**, 41*S**. The absolute configuration was deduced as follows. Within the fragment C36-C42, only one of two enantiomers possible for closing the macrolactone ring was in full agreement with the spectral data, situating the polyol chain above the chromophore plane. In the case of the opposite configuration of the discussed fragment, the lactone bond should be located below the chromophore plane. This location would imply the crossing of the chromophore and polyol chains. As a consequence, the distance between the chromophore and the C4-C6 fragment protons would be reduced, and thereby the appropriate correlations in the ROESY spectrum should be observed. Such a conformation of the macrolactone ring would disrupt the regular alignment of the C9-C11 fragment, and the evidence of this was described in this study.



↔ Selected ROEs, essential to establish conformation of macrolactone ring.

Figure 4 The stereostructure of 3'-*N*-acetylcandicidin D methyl ester (**2**). Diagnostic ROEs, observed in the ROESY spectrum of **2**, are depicted as bidirectional arrows.

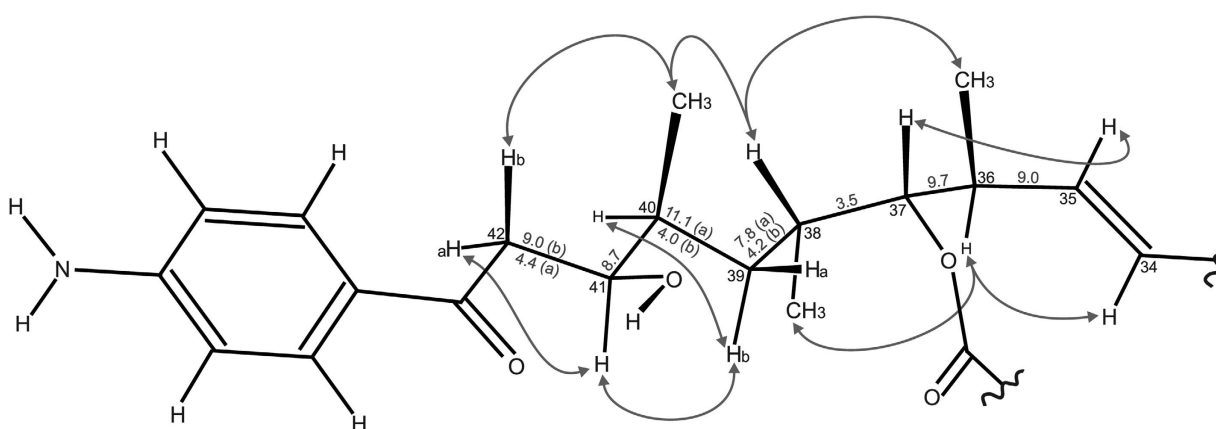


Figure 5 The candicidin D side chain configuration and conformation. Diagnostic ROEs, observed in the ROESY spectrum of **2**, are depicted as bidirectional arrows. The values of appropriate coupling constants are situated near the bonds.

METHODS

Candicidin complex

A crude candicidin complex sample, with an extinction coefficient UV λ_{max} (MeOH) 196 (380) nm (~20% purity), was supplied by Tarchomin Pharmaceutical Industry, 'Polfa' (Warsaw, Poland).

3'-*N*-acetylcandicidin D methyl ester (**2**)

The crude candicidin complex was *N*-acetylated by the following procedure: to suspension of 200 mg of candicidin complex in MeOH/H₂O(9:1, 20 ml), acetic anhydride (80 μ l) was added. The reaction was carried out at room temperature, and its progress was monitored by TLC (Merck, Darmstadt, Germany)

using the solvent system EtOAc/AcOH/H₂O(4:1:1). After 30 min, the reaction mixture was centrifuged, and 5 ml of *n*-butanol was added to the supernatant. A volume of the resulting solution was reduced to ~1 ml under reduced pressure. The product was precipitated from an *n*-butanol solution with 30 ml of dry ethyl ether and centrifuged. The precipitate was washed three times with 30 ml of dry ethyl ether and dried under reduced pressure to yield the *N*-acetylated candididin complex (70 mg). The procedure was repeated several times to obtain the required amount of final product.

3'-*N*-acetylcandididin complex (5.3 mg) was purified by flash chromatography on Merck Kieselgel 60 high-purity grade silica gel, 0.063–0.200 mm, using the solvent system CHCl₃/MeOH/H₂O (5:2:0.2). The obtained 3'-*N*-acetylcandididin complex (480 mg), UV λ_{max} (MeOH) 644 (380) nm, was dissolved in MeOH/H₂O (9:1, 150 ml), and diazomethane in ethyl ether was added dropwise. The reaction was performed at room temperature, and its progress was monitored by TLC (Merck, Darmstadt, Germany) using the solvent system EtOAc/AcOH/H₂O (4:1:1). After further addition of 35 ml of *n*-butanol, methanol and water were evaporated under reduced pressure. The complex was then precipitated from *n*-butanol with 120 ml of dry ethyl ether and centrifuged. The precipitate was washed three times with 50 ml of dry ethyl ether and dried under reduced pressure to yield a crude mixture (320 mg), UV λ_{max} (MeOH) 960 (380) nm. The flash chromatography on the Merck Kieselgel 60 high-purity grade silica gel, 0.063–0.200 mm, using the solvent system CHCl₃/MeOH/H₂O (5:0.75:0.075) was performed to separate the product from the non-esterified antibiotics and obtain the esterified mixture (110 mg), UV λ_{max} (MeOH) 966 (380) nm.

The purification of 3'-*N*-acetylcandididin D methyl ester (2) from the derivatized antibiotic complex (110 mg) was performed using HPLC on a Merck-Hitachi apparatus L-6200A (Hitachi, Tokyo, Japan), equipped with a Merck-Hitachi L-4250 UV-VIS detector (Hitachi) (380 nm). The separation conditions were as follows: column LiChrospher 100 RP-18e, 250 × 10 mm, dp = 10 μ m. Mobile phase composition: MeOH/H₂O (68:32), at a flow rate of 6.25 ml min⁻¹. The sample (8.25 mg) dissolved in MeOH/H₂O (95:5, 625 μ l) was injected. The retention time of the 3'-*N*-acetylcandididin D methyl ester (2) was 43 min. HPLC separation (12 times) gives 11 mg of 2. The ESI-Q-TOF MS gave the signal of *m/z* 1163.5973 (M-H)⁺; UV λ_{max} (MeOH) 990 (380) nm.

[α]-D-O-methyl-*N*-acetylmicosaminide

The 3'-*N*-acetylcandididin complex (50 mg) was dissolved in a 10 ml solution of 2% HCl in methanol and stirred overnight. Then, the reaction mixture was neutralized with sodium carbonate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The product was isolated by flash chromatography on Merck Kieselgel 60, 0.063–0.200 mm, using the solvent system CHCl₃/MeOH (5:1) to yield [α]-D-O-methyl-*N*-acetylmicosaminide (6 mg), [α]_D²⁰ +46.0 (c = 1, MeOH).

MS spectra

MS spectra were recorded with a 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF spectrometer using the negative ESI mode.

IR spectra

IR spectra of 3'-*N*-acetylcandididin D methyl ester were measured using FT-IR with the ATR sampling mode (Nicolet 8700 FT-IR, Thermo Nicolet, Madison, WI, USA; Thermo Electron Corporation). Spectra were acquired at 2 cm⁻¹ resolution in the spectral range 4500–500 cm⁻¹ with 128 scans.

UV-VIS spectrum

The UV-VIS spectrum of 3'-*N*-acetylcandididin D methyl ester was recorded with a PerkinElmer Lambda Bio UV/VIS spectrometer.

Optical rotation

The optical rotation of 3'-*N*-acetylcandididin D methyl ester was measured with an Autopol II automatic polarimeter (Rudolph Research, Flanders, NJ, USA) in the solvent system pyridine-*d*₅—methanol-*d*₄, 9:1 (v/v) with a sample concentration of 7.8 mg ml⁻¹ at λ = 589 nm. The recorded optical rotation value was [α]_D²⁰ +0.87.

NMR spectra

The NMR spectra were recorded with a Varian Unity 500 Plus spectrometer in solvent system pyridine-*d*₅—methanol-*d*₄, 9:1 (v/v) with a sample concentration of 10 mg ml⁻¹.

The ¹³C and one-dimensional ¹H spectra were collected using standard parameters.

Two-dimensional ¹H spectra were measured in the phase-sensitive mode with a spectral width of 4344 Hz.

The DQF-COSY spectrum was acquired in a 6080 × 750 matrix with eight accumulations per increment and was processed in a 4 K × 2 K matrix.

The NOESY spectrum was acquired with a mix time of 350 ms in a 2048 × 320 matrix with 16 accumulations per increment in a 2 K × 1 K matrix.

The ROESY spectrum was acquired with a mix time of 300 ms in a 2048 × 320 matrix with 16 accumulations per increment in a 2 K × 1 K matrix.

HSQC and HMBC experiments were performed with pulse field gradients.

The HSQC spectrum was acquired in the phase-sensitive mode. The spectral windows for ¹H and ¹³C axes were 4344 Hz and 20 111 Hz, respectively. The data were collected in a 1728 × 210 matrix and processed in a 2 K × 1 K matrix.

The HMBC spectrum was acquired in absolute value mode. The spectral windows for ¹H and ¹³C axes were 4344 and 27 024 Hz, respectively. The data were collected in a 1920 × 280 matrix and processed in a 2 K × 1 K matrix.

ACKNOWLEDGEMENTS

These studies were supported by the General Fund of the Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology. The experimental IR data were obtained through the courtesy of Dr M. Śmiechowski.

- Borowski, E. & Schaffner, C. P. Structural relationships among the heptaene macrolide antibiotics. *Abstract of Papers of Vth Internat. Congr. Of Biochem., Moscow* p. 3 (Pergamon Press: London, 1961).
- Lechevalier, H., Acker, R. F., Corke, C. T., Haenseler, C. M. & Waksman, S. A. Candididin, a new antifungal antibiotic. *Mycol.* **45**, 155–171 (1953).
- Waksman, S. A., Lechevalier, H. A. & Schaffner, C. P. Candididin and other polyenic antifungal antibiotics. *Bull. Wild Hlth Org.* **33**, 219–226 (1965).
- Ślisz, M. *et al.* The mechanism of overcoming multidrug resistance (MDR) of fungi by amphotericin B and its derivatives. *J. Antibiot.* **60**, 436–446 (2007).
- Gordon, H. W. & Schaffner, C. P. The effect of polyene macrolides on the prostate gland and canine prostatic hyperplasia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **60**, 1201–1208 (1968).
- Malewicz, B., Momsen, M., Jenkin, H. M. & Borowski, E. Potentiation of antiviral activity of acyclovir by polyene macrolide antibiotics. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **25**, 772–774 (1984).
- Schaffner, C. P. & Borowski, E. Polyenic compounds and procedures related thereto. US3244590 (1966).
- Pawlak, J., Sowiński, P., Bieszczad, T. & Borowski, E. The structure of levorin A₃, a minor component of levorin complex. *Polish J. Chem.* **79**, 1667–1672 (2005).
- Szwarc, K., Szczepkowski, P., Pawlak, J., Sowiński, P. & Borowski, E. The structure of levorin A₁, a minor component of levorin complex. *Book of Abstracts of 7th NMR in chemistry, physics and biological sciences P-35* (Warsaw: Poland, 2012).
- Komori, T., Morimoto, Y., Niwa, M. & Hirata, Y. Structure of trichomycin A, a polyene macrolide from *Streptomyces*. *Tetrahedron Lett.* **30**, 3813–3816 (1989).
- Komori, T. Trichomycin B, a polyene macrolide from *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **43**, 778–782 (1990).
- Wright, J. J., Greeves, D., Mallams, A. K. & Picker, D. H. Structural elucidation of heptaene macrolide antibiotics 67-121-A and 67-121-C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 710–712 (1977).
- Pawlak, J., Sowiński, P. & Borowski, E. Stereostructure of perimycin A. *J. Antibiot.* **48**, 1034–1038 (1995).
- Sowiński, P., Gariboldi, P., Pawlak, J. K. & Borowski, E. The structure of vacidin A, an aromatic heptaene macrolide antibiotic. II. Stereochemistry of the antibiotic. *J. Antibiot.* **42**, 1639–1642 (1989).
- Tweit, R. C., Pandey, R. C. & Rinehart, K. L. Characterization of the antifungal and antiprotazoal antibiotic partricin and structural studies on partricins A and B. *J. Antibiot.* **35**, 997–1112 (1982).
- Sowiński, P., Pawlak, J. K., Borowski, E. & Gariboldi, P. Stereostructure of gedamycin. *Polish J. Chem.* **69**, 213–217 (1995).
- Zieliński, J. *et al.* The structure of levorin A₂ and candididin D. *Tetrahedron Lett.* **20**, 1791–1794 (1979).
- Barlow, L. & Pattenden, G. Synthesis of poly-Z-isomers of 2,6,11,15-Tetramethylhexadeca-2,6,8,10,14-pentaene, a C₂₀ analogue of phytoene. Re-examination of the stereochemistry of a new isomer of phytoene from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1029–1034 (1976).

- 19 Pawlak, J., Sowiński, P. & Borowski, E. Stereostructure and NMR characterization of the antibiotic candidin. *J. Antibiot.* **46**, 1598–1604 (1993).
- 20 Płosiński, M., Laskowski, T., Sowiński, P. & Pawlak, J. Stereostructure of mycoheptin A₂. *Magn. Reson. Chem.* **50**, 818–822 (2012).
- 21 Barber, M. S., Hardisson, A., Jackman, L. M. & Weedon, B. C. L. Studies in nuclear magnetic resonance. Part IV. Stereochemistry of the Bixins. *J. Chem. Soc.* 1625–1630 (1961).
- 22 Dutcher, J. D., Walters, D. R. & Wintersteiner, O. Nystatin. III. Mycosamine: preparation and determination of structure. *J. Org. Chem.* **28**, 995–999 (1963).
- 23 Saltza, M., Dutcher, J. D., Reid, J. & Wintersteiner, O. Nystatin. IV. The stereochemistry of Mycosamine. *J. Org. Chem.* **28**, 999–1004 (1963).
- 24 Saltza, M., Reid, J., Dutcher, J. D. & Wintersteiner, O. Nystatin. II. The stereochemistry of Mycosamine. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 2785–2785 (1961).

Na podstawie wykonanych widm NMR w pełni zdefiniowano konfigurację względną wszystkich centrów asymetrii kandycydyny D, jako: 9R*, 11S*, 13S*, 15R*, 17S*, 18R*, 19S*, 21R*, 36S*, 37R*, 38S* i 41S*, geometrię chromoforu heptaenowego 22E, 24E, 26Z, 28Z, 30E, 32E i 34E oraz określono konformację pierścienia makrolidowego w roztworze. Analizę strukturalną kandycydyny D rozpoczęto od interpretacji widm ^1H NMR oraz DQF-COSY estru metylowego *N*-acetylo-kandycydyny D, dzięki którym wyodrębniono w cząsteczce sześć izolowanych systemów spinowych. Eksperymenty HSQC i HMBC pozwoliły określić częstotliwość rezonansową wszystkich atomów węgla kandycydyny D oraz umożliwiły połączenie bloków strukturalnych ze sobą, natomiast informacje zawarte w widmie ROESY dały podstawę rozważań konformacyjnych cząsteczki kandycydyny D w roztworze. Ze względu na nakładające się sygnały w zakresie cukrowym, niemożliwym okazało się wykorzystanie glikozydowo związanej mykozaminy jako sondy chiralnej do określenia konfiguracji absolutnej centrów chiralnych antybiotyku.

5. 3. Struktura i stereostruktura leworyny A₁

Leworyna A₁ jest kolejnym przedstawicielem wielkopierścieniowych aromatycznych makrolidów polienowych. Podjęte badania miały na celu zweryfikowanie struktury oraz określenie stereostruktury cząsteczki antybiotyku. Ze względu na fakt, że zmiany strukturalne składników w obrębie jednego kompleksu dotyczą najczęściej części hydrofilowej antybiotyku, w oparciu o uwarunkowania biogenetyczne arbitralnie założono podobieństwo szkieletu węglowego leworyny A₁ do szkieletów węglowych znanych już składników kompleksu Leworyny – leworyny A₂ i leworyny A₃. W badaniach strukturalnych leworyny A₁ dysponowano preparatem antybiotyku, otrzymanym w wyniku ekstrakcji przeciwpądowej z wykorzystaniem aparatu Craiga. Aby poprawić rozpuszczalność związku w rozpuszczalnikach stosowanych w spektroskopii NMR, przeprowadzono go w pochodną, ester metylowy *N*-acetylo-leworyny A₁. Wykonano serię eksperymentów NMR, których wyniki przedstawiono w załączonej publikacji.

The structure, including stereochemistry, of levorin A₁

Katarzyna Szwarc,* Paweł Szczepkowski, Paweł Sowiński, Edward Borowski and Jan Pawlak

Introduction

This study is a contribution to the structural chemistry of subgroup of polyene macrolides, the so-called aromatic heptaenes. This group is of interest, as among polyene macrolides, they exhibit the highest antifungal activity.^[1,2] The subject matter of this study is the elucidation of constitution and of partial stereochemistry of the antibiotic levorin A₁, the member of aromatic heptaene group.

Polyenic macrolides (usually called polyenes) constitute the subgenus of a very large group of natural products macrolides, which are characterised by a large macrocyclic lactone ring (macrolide) and a number of hydrophilic substituents, including glycosidically bound sugars, mainly aminosugars.^[3] Macrolides, depending on their structures, exhibit the broad range of biological activities and mechanism of their action. Nonpolyenic macrolides are valuable antibacterial antibiotics (e.g. erythromycin), acting as inhibitors of bacterial protein biosynthesis^[4], and polyenic macrolides are most prospective clinical antifungal agents acting as membrane active compounds, inducing formation of lethal membrane channels, annulling cellular control of membrane transport.^[5–7]

Antibiotic levorin, produced by *Actinomyces levoris* (Krass), was discovered in Russia in 1959.^[8] Its isolation^[9] and general characterization^[10] have led to the conclusion that this antifungal antibiotic is a polyene macrolide belonging to the group of aromatic heptaenes. Countercurrent distribution (CCD) analysis has shown that the crude product is composed of two entities, called levorin A and levorin B.^[11] Further chemical analysis was carried out using only levorin A, as it was available as commercial product for the medical use in Russia as antifungal drug for the treatment of topical fungal infections. This product contained almost solely levorin A with only negligible amounts of levorin B.

More detailed analysis of levorin A by the extensive CCD method with great number of transfers (up to 1000) has revealed that this product is a complex of closely related compounds, including levorin A₀, A₁, A₂, A₃ and A₄.^[12,13] The structure of levorin A₂^[14] and the stereostructure of levorin A₃^[15] have been elucidated to date. Preliminary results concerning structural studies on levorin A₁ have been presented earlier.^[16] However, because of the erroneous interpretation of mass spectrometry (MS) data, the revised structure of the antibiotic, based on the NMR spectroscopy, is presented in the present contribution.

Results and Discussion

Levorin A₁ 1 was derivatized by means of N-acetylation followed by esterification with diazomethane, which facilitated the purification

process and allowed for application of a wide variety of NMR solvents. The isolated 3'-N-acetyllevorin A₁ methyl ester 2 (Fig. 1) was analysed by UV, MS and NMR methods.

The UV spectrum (Fig. 2) of 2 displayed three absorption maxima at $\lambda_1 = 360$ nm, $\lambda_2 = 379$ nm and $\lambda_3 = 403$ nm, which were attributed to seven conjugated double bonds. The intensity of the longest wavelength absorption peak at 403 nm was lower than that at 379 nm. This fact, according to literature^[17], suggested the presence of some internal *cis* double bonds, which was further confirmed and their location established by our NMR studies.

The electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrum (ESI-Q-TOF MS) of 2 showed the ion at m/z 1147.5988 of the [M-H]⁺ type, which allowed to deduce the molecular weight of unsubstituted levorin A₁ as 1092 mass units. The difference of 16 mass units between levorin A₂^[14] and A₁, taking also into account the biogenetic studies^[18] on levorin complex, pointed to the lack of oxygen atom in the discussed compound in comparison with levorin A₂. Thus, the elemental composition of levorin A₁ was assigned as C₅₉H₈₄O₁₇N₂. This assignment was in full agreement with NMR experiments.

The NMR studies of 2, consisting of double-quantum filtered correlated spectroscopy (DQF COSY), rotating frame nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (ROESY), Heteronuclear single-quantum coherence (HSQC) and Heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) experiments, allowed full proton assignments, and carbon assignments are presented in Table 1. The vicinal coupling constants (Table 1) were extracted from ¹H NMR spectrum of 2 and from the analysis of the phase structure of the cross-peaks observed in DQF COSY spectrum of 2.

An analysis of the DQF COSY spectrum of 2 revealed the connectivities within five of the six structural blocks, namely C4-C6, C8-C14, C16-C42, aromatic and sugar moieties, which were separated by four carbonyl group: C-1, C-3, C-7, C-43, hemiketal carbon (C-15) as well as by glycosidic bond. The isolated methylene group C-2 was found by long-range heteronuclear connectivities observed in HMBC spectrum (H-2/C-1, H-2/C-3). The sequence and orientation of mentioned structural blocks were assembled based upon the HMBC experiment, the results of which were in line with data derived from the ROESY spectrum. Thus, the blocks C4-C6 and C8-C14 were linked via C7 because of couplings: H-6b/C-7, H-6a/

* Correspondence to: Katarzyna Szwarc, Chemical Faculty, Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Gdańsk University of Technology, Narutowicza St. 11/12, 80233 Gdańsk, Poland. E-mail: katszwarz@wp.pl

Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Gdańsk University of Technology, Narutowicza St. 11/12, 80233, Gdańsk, Poland

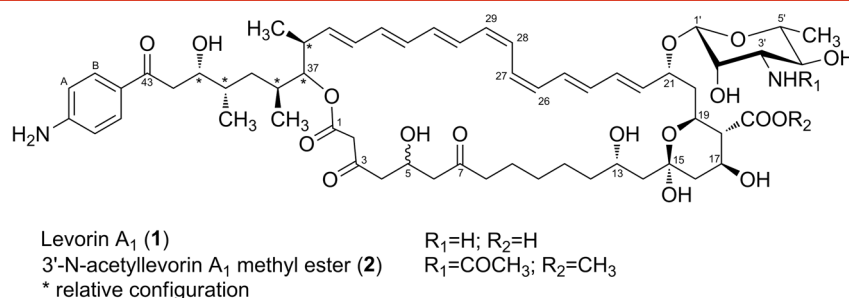


Figure 1. The stereostructure of levorin A₁ (1).

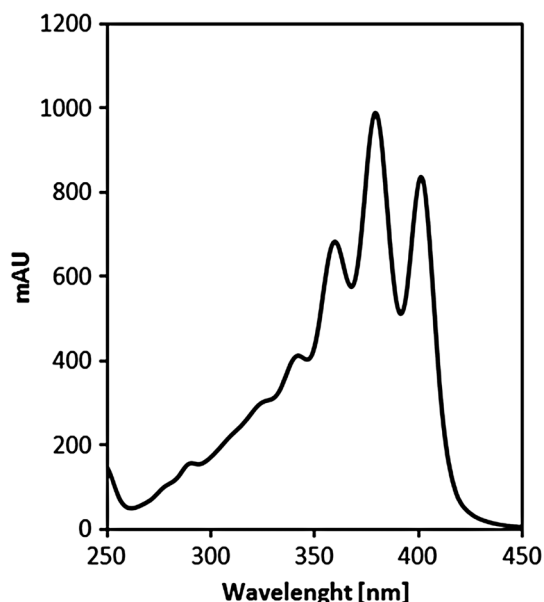


Figure 2. UV spectrum of levorin A₁ (1).

C-7 and H-8a/C-7, H-8b/C-7. The connection of the blocks C8-C14 and C16-C42 resulted from H-14a/C-15, H-14b/C-15 and H-16a/C-15, H-16b/C-15 couplings. The chemical shift of an acyloxy proton (H-37, 5.04 ppm) associated with correlations H-2/C-1 and H-37/C-1 revealed the presence of the lactone bond between C-1 and C-37. The macrolactone ring was finally closed by the C-3 keto group (H-2/C-3, H-4a/C-3, H-4b/C-3). The attachment of aromatic moiety via C-43 to the C16-C42 fragment was established based upon H-42a/C-43, H-42b/C-43 and H-B/C-43 connectivities. The location of the 3'-N-acetylmicosaminyl substituent at C-21 was pointed out by the H-1'/C-21 and H-21/C-1' correlations.

The geometry of the C13-C21 segment was derived as follows. The characteristic of the C-15 chemical shift observed in the ¹³C NMR spectrum at 98.2 ppm revealed the presence of hemiketal carbon. This provided the presumption of the existence of six-membered hemiketal ring with an oxygen bridge between C-15 and C-19. Taking into account the values of vicinal coupling constants (³J_{16a,17} = 10.5 Hz, ³J_{17,18} = 10.4 Hz, ³J_{18,19} = 10.4 Hz), the orientation of all protons in hemiketal ring was established as an axial, and thereby, the hemiketal ring was found to adopt a chair conformation. The antiperiplanar orientation of proton H-20a with relation to the H-19 resulted from the vicinal coupling constant ³J_{19,20a} = 9.5 Hz and ROE H-18/H-20a. The remaining substituent of the hemiketal ring, the C-14 methylene group, was determined to occupy an equatorial position upon ROEs: H-14a/H-16a and H-14b/H-16b. The DQF COSY data: ³J_{20a,21} = ~0 Hz, ³J_{20b,21} = 7.0 Hz,

³J_{21,22} = 8.0 Hz combined with the ROEs: H-19/H-22 and H-21/H-23 situated the C15-C21 fragment in relation to the plane of the heptaene chromophore. The chair conformation of the hemiketal ring drives its equatorial substituent C14, while ³J_{12a,13} = 4.0 Hz, ³J_{12b,13} = 10.0 Hz, ³J_{13,14a} = 3.5 Hz, ³J_{13,14b} = 12.0 Hz combined with ROEs: H-13/H-22, H-13/H-24 situated H-13 inside the macrolactone ring. Based on this study, the relative configuration of chiral centers within the discussed fragment was assigned as 13S*, 15R*, 17S*, 18R*, 19S* and 21R*.

The geometry of the heptaene chromophore was established as 22E, 24E, 26Z, 28Z, 30E, 32E and 34E as derived from a set of vicinal coupling constants, extracted from the high-resolution DQF COSY spectrum and in some cases, from a set of rotating-frame nuclear Overhauser effects (ROEs). The coupling constants: ³J_{26,27} and ³J_{28,29} (equal 10.5 Hz) pointed out the presence of two double bonds with Z geometry, what was in full agreement with ROEs: H-25/H-28, H-26/H-27, H-27/H-30 and H-28/H-29. The following coupling constants: ³J_{24,25}, ³J_{30,31}, ³J_{32,33}, ³J_{34,35} (all within a range from 15 Hz to 16 Hz) determined the E geometry of the appropriate olefinic bonds, and the ROEs: H-23/H-26, H-13/H-22, H-13/H-24 and H-33/H-35 determined the E geometry of remaining ones (22E, 24E and 34E).

It is worth mentioning that the chemical shifts of heptaene chromophore resonances: C-25, C-27, C-28 and C-30, observed in ¹³C NMR spectrum of 2, were shielded by approximately 5 ppm because of C-25/C-28 and C-27/C-30 γ effects.^[19] Consequently, all signals of olefinic carbons appear in wider range (124.8–138.3 ppm) in comparison to more condensed correlations pattern in all *trans* heptaenes (130–138 ppm).^[20,21] Furthermore, the chemical shifts of protons: H-25, H-27, H-28 and H-30, reflected deshielding effects typical of *cis* double bonds^[22], which explains why the signals of all olefinic protons occupied almost twice as wide a range of chemical shift as nonaromatic heptaenes.

The conformation of the mycosaminyl substituent resulted from the analysis of vicinal coupling constants: ³J_{2',3} = 2.8 Hz, ³J_{3',4} = 9.6 Hz and ³J_{4',5} = 9.6 Hz. This pointed out the chair conformation with H-3', H-4' and H-5' in axial positions while H-2' was found to be equatorial. The β configuration of glycosidic bond was assigned from ROEs: H-1'/H-3', H-1'/H-5' and H-3'/H-5'. The D-configuration of the mycosamine moiety was determined by the comparison of the specific rotations of α-D-O-methyl-N-acetylmicosaminide (α_D = +46.0; c = 1, methanol), obtained via standard deglycosilation of 3'-N-acetyllevorin A₁ with that obtained from nystatin A₁ (α_D = +47.0; c = 0.9, ethanol).^[23] These specific rotations were comparable. The complete stereostructure of mycosamine from nystatin was elucidated earlier by specific chemical degradation^[24] and its resynthesis.^[25]

It has been evidenced that the mycosamine moiety could be used as an internal chiral reference for assignment of the absolute

Table 1. ¹³C and ¹H NMR spectroscopic data (500 MHz, pyridine-*d*₅-methanol-*d*₄ (9 : 1)) for 2.

3'-N-acetyllevorin A ₁ methyl ester (2)				
No.	δ _C (ppm), type	δ _H (ppm)	J _{H,H} (Hz)	ROE contacts
Aglycone				
1	166.9, C	—	—	—
2	51.5, CH ₂	3.72	—	—
3	200.9, C	—	—	—
4a	30.2, CH ₂	2.69	16.0(4b), ^b (5)	4b, 5, 6a, 6b
4b		3.09	16.0(4a), 8.0(5)	4a, 5, 6b
5	31.2, CH	4.96	^b (4a), 8.0(4b), 4.0(6a), ^b (6b)	4a, 4b, 6a, 6b
6a	44.1, CH ₂	2.45	4.0(5), 16.0(6b)	4a, 5, 6b
6b		2.70	^b (5), 16.0(6a)	4b, 5, 6a, 8b
7	208.8, C	—	—	—
8a	50.2, CH ₂	2.38	17.0(8b), 9.5(9)	9, 10
8b		2.45	17.0(8a), 9.5(9)	6b, 9, 10
9	63.6, CH ₂	1.52	9.5(8a), 9.5(8b), ^b (10)	8a, 8b, 10, 26, 27
10	50.2, CH ₂	1.13	^b (9), ^b (11)	8a, 8b, 9, 11, 12b, 13
11	63.6, CH ₂	1.25	^b (10), ^b (12a), ^b (12b)	9, 10, 12a, 12b, 13
12a	39.4, CH ₂	1.41	^b (11), 14.0(12b), 4.0(13)	11, 12b, 13, 14a
12b		1.57	^b (11), 14.0(12a), 10.0(13)	8b, 10, 11, 12a, 13, 14b
13	68.5, CH	4.42	4.0(12a), 10.0(12b), 3.5(14a), 12.0(14b)	11, 12a, 12b, 14a, 14b, 22, 24
14a	46.5, CH ₂	1.79	3.5(13), 14.0(14b)	12a, 13, 14b
14b		1.88	12.0(13), 14.0(14a)	12b, 13, 14a, 16b
15	98.2, C	—	—	—
16a	45.3, CH ₂	1.76	13.0(16b), 10.5(17)	16b, 18
16b		2.54	13.0(16a), 3.5(17)	14b, 16a, 17
17	66.3, CH	4.98	10.5(16a), 3.5(16b), 10.4(18)	16b, 18
18	58.2, CH	2.84	10.4(17), 10.4(19)	16a, 20a, COOMe
19	66.3, CH	4.98	10.4(18), 9.5(20a), ~0(20b)	2', 20b
20a	38.1, CH ₂	1.98	9.5(19), 14.0(20b), ~0(21)	18, 20b, 21
20b		2.36	~0(19), 14.0(20a), 7.0(21)	1', 19, 20a, 21, COOMe
21	75.8, CH	4.88	~0(20a), 7.0(20b), 8.0(22)	1', 18, 20a, 20b, 22
22	137.7, CH	6.27	8.0(21), ^b (23)	13, 21
23	^a , CH	6.22	^b (22), ^b (24)	21, 25
24	132.5, CH	6.49	^b (23), 15.0(25)	13, 26
25	^a , CH	6.82	15.0(24), 10.5(26)	23, 28
26	^a , CH	6.15	10.5(25), 10.5(27)	9, 24, 27
27	124.8, CH	6.70	10.5(26), 12.0(28)	9, 26, 30
28	^a , CH	6.63	12.0(27), 10.5(29)	25, 29
29	^a , CH	6.23	10.5(28), 11.0(30)	28, 31
30	^a , CH	7.30	11.0(29), 15.0(31)	27
31	^a , CH	6.42	15.0(30), ^b (32)	29
32	^a , CH	6.39	^b (31), 15.0(33)	—
33	^a , CH	6.27	15.0(32), 10.5(34)	35
34	^a , CH	6.14	10.5(33), 15.0(35)	36
35	138.3, CH	5.58	15.0(34), 9.0(36)	33, 36, Me36
36	40.2, CH	2.50	9.0(35), 10.0(37), 6.8(Me36)	34, 35, 37, 38, Me36, Me38
37	81.3, CH	5.04	2.0(38), 10.0(36)	35, 36, 38, 39a, 40, Me36
38	31.2, CH	2.07	2.0(37), 6.5(Me38), ~0(39a), 8.0(39b)	36, 37, 39a, Me36, Me38, Me40, 41
39a	37.2, CH ₂	1.34	~0(38), 16.0(39b), 8.0(40)	37, 38, 39b, 42a, Me40
39b		1.73	8.0(38), 16.0(39a), ~0(40)	39a, 41, 42a, 42b, Me38
40	36.4, CH	1.99	8.0(39a), ~0(39b), 7.0(Me40), 10.5(41)	37, 39b, 41, 42a, 42b, Me38, Me40
41	72.1, CH	4.44	10.5(40), 3.5(42a), 9.5(42b)	39a, 39b, 40, 42a, 42b, Me40, B
42a	42.1, CH ₂	3.11	3.5(41), 15.1(42b)	39a, 39b, 40, 41, 42b, Me40, B
42b		3.34	9.5(41), 15.1(42a)	39b, 40, 41, 42a, Me40, B
43	197.6, C	—	—	—
Me36	16.4, CH ₃	0.95	6.8(36)	35, 36, 37, 38
Me38	12.1, CH ₃	0.96	6.5(38)	36, 38, 39b, 40
Me40	15.7, CH ₃	1.08	7.0(40)	38, 39a, 40, 41, 42a, 42b

(Continues)

Table 1. (Continued)

3'-N-acetyllevorin A ₁ methyl ester (2)				
No.	δ_C (ppm), type	δ_H (ppm)	$J_{H,H}$ (Hz)	ROE contacts
COOMe	174.1, C	—	—	—
COOMe	51.7, CH ₃	3.77	—	2', 3', 18, 20b
Mycosamine moiety				
1'	98.4, CH	4.93	1.0(2')	2', 3', 5', 21
2'	70.8, CH	4.39	1.0(1'), 2.8(3')	1', 3'NH, 3'NHCOMe, 19, COOMe
3'	56.0, CH	4.61	2.8(2'), 9.6(4')	1', 5', 3'NH, 3'NHCOMe, COOMe
4'	71.5, CH	3.97	9.6(3'), 9.6(5')	6', 3'NH
5'	74.4, CH	3.75	9.6(4'), 5.9(6')	1', 3', 6'
6'	18.2, CH ₃	1.54	5.9(5')	4', 5'
NHCOMe	174.1, C	—	—	—
NHCOMe	22.7, CH ₃	2.07	—	2', 3', NHCOMe
NHCOMe	—	8.93	—	2', 3', 4', NHCOMe
Aromatic moiety				
A	113.3, CH	8.09	8.4(B)	B, 35
B	131.8, CH	6.93	8.4(A)	A, 42a, 42b, 41
C-NH ₂	154.8, C	—	—	—
C-CO	126.7, C	—	—	—

^aObserved within a range of 124.8–138.3 ppm.

^bCould not be measured.

configuration of the aglycone through the analysis of Overhauser effects.^[20,26–29] Strong steric and possibly electrostatic interactions between sugar moiety and aglycone restrict the freedom of mycosaminyl residue rotation around the glycosidic bond. In consequence of limited rotation, in a number of previously studied polyene macrolide molecules of this type, it was found that the spatial relationship between the mentioned fragments can be defined by single dominant conformation of the glycosidic bond. As a result, the sugar moiety can be used as an internal chiral probe to assign the absolute configuration of the chiral centres of the aglycone. Spatial relationship between sugar moiety and macrolactone ring defines a set of the following ROE effects: H-1'/H-21, H-1'/H-20b, H-2'/H-19 and additionally less frequent COOMe/H-2' and COOMe/H-3'.

Within the fragment C8–C12, strong coupled spin system was observed in DQF COSY spectrum that made the measurement of particular coupling constants impossible. The location of hydroxyl group within the C4–C6 segment should also be remarked as a differentiating levorin A₁ from the other known members of levorin complex. The hydroxyl group linked to the C-5 creates a new stereogenic center, the configuration of which could not be assigned because of the lack of appropriate ROEs.

Finally, the C36–C42 fragment will be discussed. It was assumed that during the elucidation of the stereochemistry of the C36–C42 fragment, it was represented by one major conformer. The vicinal coupling constants within the fragment exhibited both small and large values, which indicated that the rotation of side chain is limited because of the steric interactions. Therefore, based upon scalar couplings and ROEs (Table 1), the relative configuration of the C36–C42 was established as 36S*, 37R*, 38S*, 40S* and 41S*.

The only differences between the molecules of levorins A₁, A₂^[14] and A₃^[15] concern the hydrophilic part of their macrolidones (Fig. 3). Taking into account the available knowledge on the mode of action of polyene macrolides^[4], it can be suggested that the

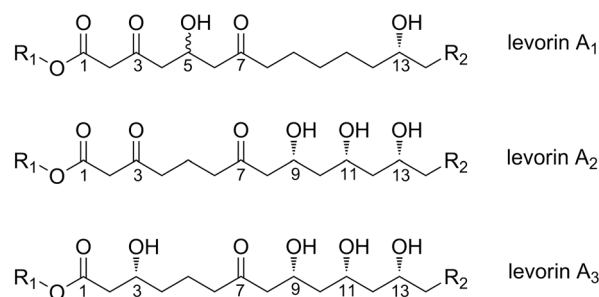


Figure 3. The comparison of the hydrophilic part of levorins A₁, A₂ and A₃.

lack of hydroxyl groups within the discussed fragment of levorin A₁, responsible for stabilization of the aliphatic chain by hydrogen bonds, causes its increased flexibility and therefore can affect the transmembrane ion channel formation and is a possible explanation of the lower activity of levorin A₁ in comparison with A₂ and A₃ compounds.^[30] Moreover, these parts differ on one hand in their lipophilicity, which can affect the rate of antibiotic diffusion across the cytoplasmic membrane, and on another one, the location and the type of hydrophilic substituents can influence the properties of the hydrophilic lining of the interior of induced channels, which in a consequence might affect the rates of lethal potassium ion efflux. The quantitation of the previously mentioned effects has not been studied as yet.

Experimental

Levorin A₁ (1)

The antibiotic levorin A₁, produced by *Streptomyces levoris*, was obtained from the crude levorin A complex by CCD according to the procedure described earlier.^[14] The levorin A₁ sample was of approximately 20% purity, with extinction coefficient UV (MeOH) $\lambda_{\max}$

(log ϵ) 379 (2.29) nm, containing nonpolyene impurities, which were removed via chromatographic purification of derivatized product.

Preparation of 3'-N-acetyllevorin A₁

The levorin A₁ was N-acetylated by the following procedure. To the suspension of 150 mg of levorin A₁ sample in 15 ml of solvent mixture tetrahydrofuran (THF)–H₂O, 5:1 (vol/vol), 60 μ l of acetic anhydride was added. The reaction was carried out at room temperature, and its progress was monitored by thin layer chromatography (TLC) on Si 60 and Merck using solvent system EtOAc–AcOH–H₂O, 4:1:1 (vol/vol/vol). After 30 min, the reaction mixture was centrifuged, 5 ml of *n*-butanol was added to the supernatant, and a volume of the resulting solution was reduced to about 1 ml by evaporation under reduced pressure. The product was precipitated from *n*-butanol solution with 30 ml of dry ethyl ether and centrifuged. The precipitate was washed three times with 30 ml of dry ethyl ether and dried under reduced pressure. Yield 115 mg of 3'-N-acetyllevorin A₁.

Preparation of 3'-N-acetyllevorin A₁ methyl ester (2)

The 110 of 3'-N-acetyllevorin A₁ was dissolved in 11 ml of solvent mixture THF–H₂O, 5:1 (vol/vol), and diazomethane in ethyl ether was added dropwise. The reaction progress was monitored by TLC on Si 60 and Merck using solvent system CHCl₃–MeOH–H₂O, 5:2:0.2 (vol/vol/vol). After further addition of 6 ml of *n*-butanol, THF and water were evaporated under reduced pressure. The derivatized antibiotic was then precipitated from *n*-butanol with 30 ml of dry ethyl ether and centrifuged. The precipitate was washed three times with 30 ml of dry ethyl ether and dried under reduced pressure. Yield 71 mg. Then the flash chromatography on Kieselgel Si 60, 0.063–0.200 mm, Merck using solvent system CHCl₃–MeOH–H₂O, 5:0.75:0.075 (vol/vol/vol), was performed to separate the product from nonesterified antibiotic. Yield 13.8 mg, UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 379 (2.99) nm.

α -D-O-methyl-N-acetylmycosaminide

Fifty milligrams of 3'-N-acetyllevorin A₁ was dissolved in 10 ml solution of 2% HCl in methanol and left overnight with stirring. Then the reaction mixture was neutralized with sodium carbonate and filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The product was isolated by flash chromatography on Kieselgel Si 60, 0.063–0.200 mm, Merck using solvent system CHCl₃–MeOH, 5:1 (vol/vol). Yield 7 mg of α -D-O-methyl-N-acetylmycosaminide. $\alpha_D^{20} + 46.0$ (c 1, MeOH).

Optical rotation

Optical rotation of α -D-O-methyl-N-acetylmycosaminide was measured with Autopol II Automatic polarimeter (Rudolph Research, Flanders, New Jersey).

UV–Vis spectrum

UV–Vis spectrum of 3'-N-acetyllevorin A₁ methyl ester was recorded with UV/VIS Spectrometer Lambda Bio Perkin Elmer.

IR spectra

IR (amorphous solid) ν_{max} was recorded with 3358, 2934, 1710, 1634 and 1529 cm^{−1}. IR spectra of 3'-N-acetylcandidin D methyl ester were measured using FT-IR with the attenuated total reflection

sampling mode (Nicolet 8700 FT-IR, Thermo Nicolet, Madison, USA) (Thermo Electron Corporation). Spectra were acquired at 2 cm^{−1} resolution in the spectral range of 4500–500 cm^{−1}, 128 scans.

NMR spectra

NMR spectra were recorded with a Varian Unity 500 Plus spectrometer in solvent system pyridine-*d*₅–methanol-*d*₄, 9:1 (vol/vol) with a sample concentration of 18 mg ml^{−1}. The 1D ¹H spectrum was collected with digital resolution of 0.5 Hz. Two-dimensional ¹H spectra were measured in phase-sensitive mode with a spectral width of 4443 Hz. The DQF COSY spectrum was acquired in 4096 × 700 matrix with 16 accumulations per increment and was processed in 4 K × 2 K matrix. The ROESY spectrum was acquired with mix time at 300 ms in 2048 × 280 matrix with 16 accumulations per increment in 2 K × 1 K matrix. HSQC and HMBC experiments were performed with pulse field gradients. The HSQC spectrum was acquired in phase sensitive mode. The spectral windows for ¹H and ¹³C axes were 4482 Hz and 20110 Hz, respectively. Data were collected in 1792 × 200 matrix and processed in 2 K × 1 K matrix. The HMBC spectrum was acquired in absolute value mode. The spectral windows for ¹H and ¹³C axes were 4482 Hz and 22624 Hz, respectively. Data were collected in 1984 × 230 matrix and processed in 2 K × 1 K matrix.

ESI-Q-TOF MS spectra of 2 showed the ion at *m/z* 1147.5988 of the [M-H][−] (calculated for C₆₂H₈₈O₁₉N₂ *m/z* 1163.5959 of (M-H)[−] type, error of mass measurement accuracy $\Delta = 2.5$ ppm). MS spectra were recorded with 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF spectrometer using negative electrospray ionization mode.

Acknowledgement

These studies were supported by the general fund of Chemical Faculty, Gdansk University of Technology, Gdansk, Poland.

References

- [1] S. Omura, *Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology, Practice*, 1st edn, Academic Press, INC., London, **1984**.
- [2] S. Omura, H. Tanaka, in *Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology, Practice*, 1st edn (Ed: S. Omura), Academic Press, INC, London, **1984**, pp. 3–36.
- [3] S. Omura, H. Tanaka, in *Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology, Practice*, 1st ed.; (Ed.: S. Omura), Academic Press, INC, London, **1984**, pp 351–396.
- [4] J. Bolard. *Biophys. Acta* **1986**, 864, 257–304.
- [5] M. Bagiński, H. Resat, E. Borowski. *Biochim. Biophys. Acta*. **2002**, 1567, 223–228.
- [6] C. P. Schaffner, in *Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology, Practice*, (1st ed.); S. Omura, (Ed.; Academic Press, INC), London, **1984**, pp 457–493.
- [7] B. Cybulska, E. Borowski, Y. Prigent, C. M. Gary-Bobo. *J. Antibiot.* **1981**, 34, 884–891.
- [8] V. A. Tsyganov, P. N. Golyakov, A. M. Bezborodov, U. P. Namestnikova, G. V. Khopko, S. N. Soloviev, M. A. Malyshkina, L. O. Bolshakova. *Antibiotiki (Moscow)* **1959**, 4, 21–23.
- [9] M. A. Malyshkina, B. G. Belenky, S. N. Soloviev. *Antibiotiki (Moscow)* **1963**, 7, 584–588.
- [10] M. A. Malyshkina, B. G. Belenky, S. N. Soloviev. *Antibiotiki (Moscow)* **1963**, 11, 999–1002.
- [11] E. Borowski, M. Malyshkina, S. Soloviev, T. Zimiński. *Chemotherapia* **1965/1966**, 10, 176–194.
- [12] R. Bosshardt, H. Bickel. *Experientia* **1968**, 24, 422–424.
- [13] A. N. Filippova, Y. D. Shenin. *Antibiotiki (Moscow)* **1974**, 19, 32–34.
- [14] J. Zieliński, H. Borowy-Borowski, J. Golik, J. Gumieniak, T. Zimiński, P. Kołodziejczyk, J. Pawlak, E. Borowski, Y. D. Shenin, A. Filippova. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 1791–1794.

- [15] J. Pawlak, P. Sowiński, T. Bieszczad, E. Borowski. *Pol. J. Chem.* **2005**, 79, 1667–1672.
- [16] J. Zieliński, J. Gumieniak, J. Golik, E. Borowski. in *Book of Abstracts of International Symposium on Antibiotics*, Weimar, Germany, May 14–18, **1979**, B–16.
- [17] S. A. Waksman, H. A. Lechevalier, C. P. Schaffner. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **1965**, 33, 219–226.
- [18] J. F. Martin, in *Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology, Practice*, 1st edn (Ed: S. Omura), Academic Press, INC, London, **1984**, pp. 405–424.
- [19] L. Barlow, G. Pattenden. *J. Chem. Soc. Perkin Trans* **1976**, 1, 1029–1034.
- [20] J. Pawlak, P. Sowiński, E. Borowski. *J. Antibiot.* **1993**, 46, 1598–1604.
- [21] M. Płosiński, T. Laskowski, P. Sowiński. *J. Pawlak. Magn. Reson. Chem.* **2012**, 50, 818–822.
- [22] M. S. Barber, A. Hardisson, L. M. Jackman, B. C. L. Weedon. *J. Chem. Soc.* **1961**, 1625–1630.
- [23] J. D. Dutcher, D. R. Walters, O. Wintersteiner. *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 995–999.
- [24] M. Saltza, J. D. Dutcher, J. Reid, O. Wintersteiner. *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 999–1004.
- [25] M. Saltza, J. Reid, J. D. Dutcher, O. Wintersteiner. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 2785–2785.
- [26] J. M. Lancelin, J. M. Beau. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4521–4524.
- [27] P. Sowiński, P. Gariboldi, J. K. Pawlak, E. Borowski. *J. Antibiot.* **1989**, 42, 1639–1642.
- [28] P. Sowiński, J. Pawlak, E. Borowski, P. Gariboldi. *Magn. Reson. Chem.* **1992**, 30, 275–279.
- [29] J. Pawlak, P. Sowiński, E. Borowski. *J. Antibiot.* **1995**, 48, 1034–1038.
- [30] V. A. Tsyganov, E. P. Yakovleva. *Antibiotiki (Moscow)* **1969**, 14, 635–639.

Przeprowadzone badania pozwoliły zweryfikować strukturę leworyny A₁ oraz określić jej stereochemię. Za pomocą spektrometrii mas ustalono masę molekularną badanej cząsteczki oraz wzór sumaryczny antybiotyku: C₅₉H₈₄O₁₇N₂. Dzięki analizie uzyskanych danych spektralnych dokonano jednoznacznego przyporządkowania sygnałów rezonansowych w widmie protonowym i węglowym, z wyjątkiem olefinowych atomów węgla. Na podstawie analizy dwuwymiarowych widm NMR (DQF-COSY, ROESY, HSQC, HMBC) zidentyfikowano rozmieszczenie atomów tlenu przy węglach C3, C5, C7 i C13 w tzw. części hydrofilowej makrolidu. Niespodziewanym odkryciem okazało się występowanie grupy hydroksylowej przy C5, ponieważ w innych znanych składnikach kompleksu w tym miejscu występuje jedynie grupa metylenowa. W oparciu o wartości stałych sprzężenia i efekty ROE określono geometrię chromoforu heptaenowego leworyny A₁, jako: 22E, 24E, 26Z, 28Z, 30E, 32E, 34E. W dalszej kolejności przeprowadzono analizę stereostrukturalną aglikonu, określając konfigurację względną centrów asymetrii, jako: 13S*, 15R*, 17S*, 18R*, 19S*, 21R*, 36S*, 37R*, 38S*, 40S* i 41S*. Ze względu na brak odpowiednich efektów ROE niemożliwe było przypisanie konfiguracji atomu węgla C5. Dzięki wykorzystaniu glikozydowo związanej reszty cukrowej jako wewnętrznej sondy chiralnej określono konfigurację absolutną następujących atomów węgla: 13S, 15R, 17S, 18R, 19S, 21R.

6. PODSUMOWANIE

Rozprawa doktorska obejmuje wybrane zagadnienia z chemii wielopierścieniowych makrolidów polienowych, związane z trzema antybiotykami tej grupy: kandycydyną D, leworyną A₁ oraz nystatyną A₁. Poznanie struktury antybiotyków jest ważne ze względu na wyjaśnienie natury mechanizmów ich działania, specyficznego oddziaływania ze sterolami w błonach patogenów grzybowych, co wpływa na ich aktywność przeciwgrzybową, czy możliwość projektowania nowych pochodnych polienów o polepszonej rozpuszczalności czy selektywnej toksyczności względem komórek grzybowych. Jako technikę badań strukturalnych wybrano spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), umożliwiającą poznanie przestrzennej struktury tej klasy związków.

Badania prowadzone podczas niniejszej pracy skupiły się na określeniu stereostruktury dwóch przedstawicieli wielopierścieniowych aromatycznych makrolidów polienowych, kandycydyny D i leworyny A₁ oraz wyjaśnieniu natury niestabilności strukturalnej nystatyny A₁.

Prace laboratoryjne obejmowały przeprowadzenie antybiotyków w odpowiednie pochodne, celem oczyszczenia i izolacji poszczególnych związków z kompleksów antybiotycznych, niezbędnych by uzyskały należyte rozpuszczalności do przeprowadzenia badań spektroskopowych. Podstawową narzędziem stosowanym w badaniu struktur była analiza widm magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Za pomocą przeprowadzonych eksperymentów NMR: DQF-COSY, HSQC, HMBC oraz ROESY (NOESY) dokonano przyporządkowania sygnałów rezonansowych w widmie ¹H NMR oraz określono wartości przesunięć chemicznych większości atomów węgla szkieletów pierścieni węglowych omawianych antybiotyków. Widma HMBC i ROESY (NOESY) pozwoliły połączyć poszczególne bloki strukturalne tworzone przez izolowane systemy spinowe, natomiast zagadnienia stereochemiczne zostały rozwiązane w oparciu o analizę efektów Overhausera oraz wartości stałych sprzężeń (³J).

W wyniku podjętych badań ustalona została konfiguracja względna wszystkich centrów asymetrii, geometria chromoforu oraz konformacja pierścienia makrolidowego w roztworze kandycydyny D. Zweryfikowano strukturę leworyny A₁. Określono geometrię jej chromoforu. Przeprowadzono analizę stereostrukturalną aglikonu, określając konfigurację względną prawie wszystkich centrów chiralnych (oprócz C5). Dzięki wykorzystaniu glikozydowo związanej reszty cukrowej jako wewnętrznej sondy chiralnej ustalono konfigurację absolutną w obrębie fragmentu C13-C21 leworyny A₁. Połączenie techniki NMR wspomaganą modelowaniem molekularnym, pozwoliło wyjaśnić zmiany strukturalne nystatyny A₁, wynikające z zachodzenia wewnątrzcząsteczkowej reakcji translaktonizacji antybiotyku, oraz określić strukturę powstającego izomeru nystatyny A₁, *izo*-nystatyny A₁. Makrocycliczny pierścień *izo*-nystatyny A₁ w stosunku do cząsteczki natywnej jest pomniejszony o dwa atomy węgla.

7. WYKAZ LITERATURY

- [1] S. Omura, S. H. Tanaka, Production, structure, and antifungal activity of polyene macrolides. Volume 1, pp. 351-404, Academic Press, Inc. Orlando (1984).
- [2] L. Volpon, J. M. Lancelin, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4533-4541, (2002).
- [3] J. Bolard, *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 257-304, (1986).
- [4] P. Sowiński, J. Pawlak, E. Borowski, P. Gariboldi, *Magn. Res. Chem.*, **30**, 275-279 (1992).
- [5] R. B. Woodward, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **69**, 50-58, (1957).
- [6] S. Donadio, M. J. Staver, J. B. Mc Alpine, S. J. Swanso, L. Katz, *Science*, **252**, 675-679 (1991).
- [7] A. J. Birch, C. W. Holzapfel, R. W. Rickards,, C. Djerassi, M. Suzuki, J. Westley, J. D. Dutcher, R. Thomas, *Tetrahedron Lett.*, **5** (23), 1485-1490 (1964).
- [8] D. G. Manwarin, R. W. Rickards, G. Gaudiano, V. Nicolella, *J. Antibiot.*, **22**, 545-550 (1969).
- [9] H. A. B. Linke, W. Mechlinski, C. P. Schaffner, *J. Antibiot.*, **27**, 155-160 (1974).
- [10] D. Perlman, J. B. Semar, *Biotechnol. Bioeng.*, **7**, 133-37 (1965).
- [11] C. M. Liu, L. E. McDaniel, C. P. Schaffner, *J. Antibiot.*, **25**, 116-121 (1972).
- [12] C. M. Liu, L. E. McDaniel, C. P. Schaffner, *J. Antibiot.*, **25**, 187-188 (1972).
- [13] L. Katz, *Chem. Rev.*, **97**, 2557-2576 (1997).
- [14] J. F. Aparicio, P. Caffrey, J. A. Gil, S. B. Zotchev, S. B., *Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 179-188, (2003).
- [15] J. F. Aparicio, M. V. Mendes, N. Anton, E. Recio, J. F. Martin, *Curr. Medicinal Chem.*, **11**, 1645-1656 (2004).
- [16] E. L. Hazen, R. Brown, *Science*, **112**, 423-423 (1950).
- [17] Y. Okami, R. Wahara, S. Nakamura, H. Umezawa, *J. Antibiot.*, **A-7**, 98-103 (1954).
- [18] E. L. Hazen, R. F. Brown, A. Mason, *Antibiot. and Chemother.*, **3**, 1125 (1953).
- [19] S. Omura, S. H. Tanaka, Production, structure, and antifungal activity of polyene macrolides. Volume 1, pp. 351, Academic Press, Inc. Orlando (1984).
- [20] L. Ettlinger, R. Corbaz, R. Hutter, *Arch. Mikrobiol.*, **31**, 326-358 (1958).
- [21] A. Espinel-Ingroff, Medical mycology in the United States: a historical analysis (1894-1996), pp. 62, Springer (2003).
- [22] R. Brown, E. L. Hazen, A. Mason, *Science*, **117**, 609-610 (1953).
- [23] J. Roszkowski, D. Kotiuszko, A. Rafalski, H. Morawska, K. Raczynska-Bojanowska, *Acta Microbiol. Pol. B*, **4** (1), 9-22 (1972).
- [24] B. Röder, G. Plonka, E. J. Bormann, U. Gräfe, *J. Basic Microbiol.*, **25** (3), 175-186 (1985).
- [25] M. Matsuoka, *J. Antibiot.*, **13**, 121-4 (1960).

- [26] M. Veiga, J. Fabregas, *J. Antibiot.*, **36**, 770-775 (1983).
- [27] E. Fjærvik, S. B. Zotchev, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, 436-443 (2005).
- [28] Hao Cui, Xianpu Ni, Wei Shao, Jian Su, Jiaqi Su, Jun, Ren, Huanzhang Xia, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 1273-1282 (2015).
- [29] Y. D. Shenin, T. V. Kotienko, O. N. Ekzemplarow, *Antibiotiki (Moscow)*, **13**, 387-391 (1968).
- [30] E. Borowski, J. Zieliński, L. Falkowski, T. Zimiński, J. Golik, P. Kołodziejczyk, E. Jereczek, M. Gdulewicz, Y. Shenin, T. Kotienko, *Tetrahedron Lett.*, **12** (8), 685-690 (1971).
- [31] J. M. Lancelin, J. M. Beau, *Tetrahedron Lett.*, **30** (34), 4521-4524 (1989).
- [32] J. Pawlak, P. Tabin, P. Sowiński, E. Borowski, *Polish J. Chem.*, **79**, 1673-1679 (2005).
- [33] J. Zieliński, J. Golik, J. Pawlak, E. Borowski and L. Falkowski, *J. Antibiot.*, **41**, 1289-1291 (1987).
- [34] M. Płosiński, *Stereostuktura nystatyny A₃. Sprawozdanie z badań naukowych prowadzonych podczas II roku Studium Doktoranckiego w Katedrze Technologii Leków i Biochemii*. Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej, Gdańsk (2006).
- [35] J. Zieliński, E. Jereczek, P. Sowiński, L. Falkowski, A. Rudowski, E. Borowski, *J. Antibiot.*, **32**, 565-568 (1979).
- [36] D. Kotiuszko, H. Morawska, N. Porowska, *Acta Microbiol. Pol. A.*, **4** (4), 201-211 (1972).
- [37] M. Veiga, J. Fabregas, *J. Antibiot.*, **36**, 770-775 (1983).
- [38] D. R. Walters, J. D. Dutcher, O. Wintersteiner, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5876-5876 (1957).
- [39] M. H. Von Saltza, J. Reid, J. D. Dutcher, O. Wintersteiner, *J. Org. Chem.*, **83**, 2785-2785 (1961).
- [40] J. D. Dutcher, D. R. Walters, O. Wintersteiner, *J. Org. Chem.*, **28**, 995-999 (1963).
- [41] M. Saltza, J. D. Dutcher, J. Reid, O. Wintersteiner, *J. Org. Chem.*, **28**, 999-1004 (1963).
- [42] A. J. Birch, C. W. Holzapfel, R. W. Rickards, C. Djerassi, P. C. Seidel, M. Suzuki, J. W. Westley, J. D. Dutcher, *Tetrahedron Lett.*, **5** (23), 1491-1497 (1964).
- [43] M. Ikeda, M. Suzuki, C. Djerassi, *Tetrahedron Lett.*, **8** (38), 3745-3750 (1967).
- [44] D. G. Manwaring, R. W. Rickards, B. T. Golding, *Tetrahedron Lett.*, **10** (60), 5319-5322 (1969).
- [45] C. N. Chong, R. W. Rickards, *Tetrahedron Lett.*, **59**, 5145-5148 (1970).
- [46] C. N. Chong, R. W. Rickards, *Tetrahedron Lett.*, **13** (49), 5053-5056 (1972).
- [47] E. Jereczek, P. Sowiński, J. Zieliński, E. Borowski, *Materiały V Ogólnopolskiego Seminarium na Temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i Jego zastosowań*, Zeszyt 2, pp. 232-240, Kraków (1973).
- [48] W. Mechliński, C. P. Schaffner, P. Ganis, G. Avitabile, *Tetrahedron Lett.*, **11** (44) 3873-3876 (1970).
- [49] D. W. Brooks, R. P. Kellogg, *Tetrahedron Lett.*, **23** (48), 4991-4994 (1982).

- [50] J. M. Lancelin, F. Paquet, J. M. Beau, *Tetrahedron Lett.*, **29** (33), 2827-2830 (1988).
- [51] J. Prandi, J. M. Beau, *Tetrahedron Lett.*, **30** (34), 4517-4520 (1989).
- [52] K. C. Nicolaou, K. H. Ann, *Tetrahedron Lett.*, **30** (10), 1217-1220 (1989).
- [53] C. Bonini, G. Righi, L. Rossi, *Tetrahedron*, **48** (12), 9801-9808 (1992).
- [54] C. Bonini, R. Racioppi, L. Viggiani, L. Righi, L. Rossi, *Tetrahedron: Asymmetry*, **4** (5), 793-805 (1993).
- [55] C. Bonini, A. Giugliano, R. Racioppi, G. Righi, *Tetrahedron Lett.*, **37** (14), 2487-2490 (1996).
- [56] C. Schneider, M. Rehfeuter, *Tetrahedron Lett.*, **39** (1), 9-12, (1998).
- [57] G. Solladie, N. Wilb, C. Bauder, *J. Org. Chem.*, **64**, 5447-5452 (1999).
- [58] I. Kadota, Y. Hu, G. K. Packard, S. D. Rychnowsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **33**, 11992-11995 (2004).
- [59] T. Brautaset, O. N. Sekurova, H. Sletta, T. E. Ellingsen, A. R. Strøm, S. Valla, S. B. Zotchev, *Chem. Biol.*, **7** (6), 395-403 (2000).
- [60] E. Fjærvik, S. B. Zotchev, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, 436-443 (2005).
- [61] H. Sletta, S. E. F. Borgos, P. Bruheim, O. N. Sekurova, H. Grasdalen, R. Aune, T. E. Ellingsen, S. B. Zotchev, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **49** (11), 4576-4583 (2005).
- [62] 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**, 1198-1206 (2008).
- [63] 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**, 1198-1206 (2008).
- [64] T. Brautaset, P. Bruheim, H. Sletta, L. Hagen, T. E. Ellingsen, A. R. Strøm, S. Valla, S. B. Zotchev, *Chem. Biol.*, **9**, 367-373, (2002).
- [65] 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**, 189-196 (2009).
- [66] 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**, 55-64 (2010).
- [67] A. N. Tevyashova, E. N. Olsufyeva, S. E. Solovieva, S. S. Printsevskaya, M. I. Reznikova, A. S. Trenin, O. A. Galatenko, Ivan D. Treshalin, E. R. Pereverzeva, E. P. Mirchink, E. B. Isakova, S. B. Zotchev, M. N. Preobrazhenskaya, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **57** (8), 3815-3822 (2013).
- [68] P. Bruheim, S. E. F. Borgos, P. Tsan, H. Sletta, T. E. Ellingsen, J. M. Lancelin, S. B. Zotchev, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **48** (11), 4120-4129 (2004).
- [69] S. E. F. Borgos, P. Tsan, H. Sletta, T. E. Ellingsen, J. M. Lancelin, S. B. Zotchev, *J. Med. Chem.*, **49**, 2431-2439 (2006).

- [70] T. Brautaset, H. Sletta, A. Nedal, S. E. F. Borgos, K. F. Degnes, I. Bakke, O. Volokhan, O. N. Sekurowa, I. D. Treshalin, E. P. Mirchink, A. Dikiy, T. E. Ellingsen, S. B. Zotchev, *Chem. Biol.*, **15**, 1198-1206 (2008).
- [71] T. Brautaset, H. Sletta, K. F. Degnes, O. N. Sekurowa, I. Bakke, O. Volokhan, T. Andreassen, T. E. Ellingsen, S. B. Zotchev, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77** (18), 6636-6643 (2011).
- [72] L. Volpon, J. M. Lancelin, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4533-4541 (2002).
- [73] L. Ostrosky-Zeichner, S. Bazemore, V. L. Paetznick, J. R. Rodriguez, E. Chen, T. Wallace, P. Cossum, J. H. Rex, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **45**, 2781-2786 (2001).
- [74] S. H. Hansen, M. Thomsen, *J. Chromatogr.*, **123**, 205-211 (1976).
- [75] W. Mechliński, C.P. Schaffner, *J. Antibiot.*, **XXXIII** No. 6, 591-599 (1980).
- [76] R. Bosshardt, H. Bickel, *Experientia*, **24**, 522-524 (1968).
- [77] J. W. Lightbown, P. Newland, I. A. Sutherland, J. W. A. Dymond, *Proc. Analyt. Div. Chem. Soc.*, **14** (2), 34-37 (1977).
- [78] H. A. Lechevalier, R. Archer, C. Coke, C. Haenseler, S. Waksman, *Mycologia*, **45**, 155 (1953).
- [79] S. Waksman, H. A. Lechavalier, C. P. Schaffner, *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **33**, 219-226 (1965).
- [80] L. C. Vining, W. A. Taber, F. J. Gregory, *Antibiot. Ann.*, **1954-1955**, 106-110 (1955).
- [81] W. Oroshnik, L. C. Vining, A. D. Mebane, W. A. Taber, *Science*, **121**, 147-149 (1955).
- [82] C. P. Schaffner, E. Borowski, *Antibiot. and Chemother.*, **11**, 724-732 (1961).
- [83] T. Zimiński, Politechnika Gdańska, *Rozprawa doktorska*, Gdańsk (1967).
- [84] T. Zimiński, J. Zieliński, L. Falkowski, W. Mechliński, E. Borowski, *Wiadomości Chemiczne*, **XXII**, 393 (1968).
- [85] W. Mechliński, C. P. Schaffner, *J. Chromatogr.*, **99**, 619-633 (1974).
- [86] J. Zieliński, H. Borowy-Borowski, J. Golik, J. Gumieniak, T. Zimiński, P. Kołodziejczyk, J. Pawlak, E. Borowski, *Tetrahedron Lett.*, **20**, 1791-1794 (1979).
- [87] S. Chen, X. Huang, X. Zhou, L. Bai, J. He, K. J. Jeong, Z. Deng, *Chem. Biol.*, **10**, 1065-1076 (2003).
- [88] M. Xiang-Zhao, T. Xin-Yi, Y. Liang, S. Ya-Ling, W. Dong-Zhi, D. Zi-Xin, *J. Chin. Pharm. Sci.*, **14** (2), 115-118, (2005).
- [89] Y. Zhou, J. Li, J. Zhu, S. Chen, L. Bai, X. Zhou, H. Wu, Z. Deng, *Chem. Biol.*, **15**, 629-638 (2008).
- [90] K. Szwarc, P. Szczeblewski, Ł. Nowicki, J. Pawlak, E. Borowski. Characterization of the candididin complex. XXVIII Międzynarodowe Seminarium Naukowo Techniczne Chemisty for Agriculture, Karpacz, 1-4 December (2013).
- [91] E. J. Oswald, D. Pocurull, *Antibiot. and Chemother.*, **10**, 285-286 (1960).
- [92] H. Lechevalier, *Antibiot. Ann.*, **1959-1960**, 614-618 (1960).

- [93] V. Tsyganov, P. Golyakov, A. Besbordov, U. Namiestnikova, G. Konopko, S. Soloviev, M. Malyshkina, C. Bolshakova, *Antibiotiki (Moscow)*, **4**, 21-23 (1959).
- [94] E. Borowski, M. Malyshkina, S. Soloviev, T. Zimiński, *Chemotherapia*, **10**, 176-194 (1965/66).
- [95] L. Golubeva, A. Kashkin, Y. Shenin, A. Larkin, E. Yakovleva, L. Lvova. *Antibiotiki*, **23** (6), 503-506 (1978).
- [96] M. A. Malishkina, N. M. Zavalnaia, V. Y. Raigorodskaya, A. Y. Rozanova, S. N. Solovov, Physical-chemical properties of levorin. Levorin and its clinical application, 33-37 (1970).
- [97] Y. Shenin, *Antibiot. and Chemother.*, **33** (8), 622-629 (1988).
- [99] V. Tsyganov, E. Yakovleva, *Antibiotiki (Moscow)*, **14** (6), 505-508 (1969a).
- [99] V. Tsyganov, E. Yakovleva, *Antibiotiki (Moscow)*, **14** (7), 635-639 (1969b).
- [100] L. A. Vetlugina, E. T. Nikitina, *Nauka, Alma-Ati*, 76 (1980).
- [101] J. Zieliński, J. Gumieniak, J. Golik, E. Borowski, *Book of Abstracts of International Symposium on Antibiotics*, B-16, Weimar, Germany, May 14-18 (1979).
- [102] P. Sowiński, J. Pawlak, E. Borowski and P. Gariboldi, *Polish J. Chem.*, **69**, 213-217 (1995).
- [103] M. B. Smith, J. March, *March's Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanism, and Structure*, Sixth Edition, pp. 1419-1421, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken (2007).
- [104] E. Dresler, E. Nowakowska-Bogdan, R. Kulesza, R. Jasiński, *Przem. Chem.*, **92** (10), 1876-1878 (2013).
- [105] K. Sieroslawski, K. Ślepokura, T. Lis, M. Bogucka, J. Lutomska, A. Kraszewski. *Acta Cryst. C*. **62** (7), 405-409 (2006).
- [106] S. Omura, S. H. Tanaka, *Production, structure, and antifungal activity of polyene macrolides*. Volume 1, pp. 394-395, Academic Press, Inc. Orlando (1984).