

高效液相色谱-串联质谱分析微量格尔德霉素类似物

倪四阳¹, 张侃^{1,2}, 王玉成¹, 赫卫清¹, 王以光¹, 贺玖明³, 武临专¹

1 中国医学科学院/北京协和医学院医药生物技术研究所 卫生部抗生素生物工程重点实验室, 北京 100050

2 沈阳药科大学制药工程学院, 沈阳 110016

3 中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所, 北京 100050

摘要: 安莎类抗生素例如利福霉素和安丝菌素, 通常由一组化学结构相似的组分组成。格尔德霉素为苯安莎类抗生素, 已经发现 4 个组分。本研究采用高效液相色谱-串联质谱方法对格尔德霉素(GDM)制品中的微量组分进行了分析, 发现 5 个新的和 1 个已知的 GDM 类似物。依据质谱数据、结合 GDM 生物合成机制, 对 6 个 GDM 类似物的化学结构进行了推测: 分子式为 $C_{29}H_{42}N_2O_{10}$ 的新化合物 3 个, 分别为 GDM 安莎链上 C2-C3、C4-C5 和 C8-C9 之间的 C-C 双键变为单键并同时单羟基化的 GDM 衍生物; 分子式为 $C_{28}H_{38}N_2O_8$ 的新化合物 2 个, 其中 1 个为 17(或 12, 或 4)-去甲氧基格尔德霉素, 另 1 个为 4, 5-双氢-10, 11-脱水-17-去甲基-17-羟基格尔德霉素; 分子式为 $C_{29}H_{42}N_2O_9$ 的已知化合物 1 个, 为 4, 5-双氢格尔德霉素。这些 GDM 类似物的发现有助于加深对 GDM 生物合成的认识, 并对通过基因阻断、组合生物合成技术获得 GDM 衍生物的研究有启示作用。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱, 格尔德霉素, 格尔德霉素类似物, 生物合成

Analysis of geldanamycin analogues in trace amounts by LC-MS/MS

Siyang Ni¹, Kan Zhang^{1,2}, Yucheng Wang¹, Weiqing He¹, Yiguang Wang¹, Jiuming He³, and Linzhan Wu¹

1 Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, Ministry of Health, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

2 School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015, China

3 Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Ansamycins, such as rifamycin and ansamitocin, usually consist of a group of structural similar components. Geldanamycin, a benzenic ansamycin, has been found to consist of four structural similar components. We analyzed the geldanamycin (GDM) preparation from *Streptomyces hygroscopicus* 17997 by LC-ESI(+)-MS/MS, and discovered five novel and one known GDM analogues in trace amounts. Based on the ESI(+)-MS/MS spectra of these GDM analogues, and the present understanding of GDM biosynthesis, we proposed the possible chemical structures of these GDM analogues. Three novel GDM analogues, all having the same molecular formula of $C_{29}H_{42}N_2O_{10}$, were GDM biosynthetic derivatives with one of the three C-C double bonds between C2-C3, C4-C5 and C8-C9 in GDM changed to mono-hydroxylated C-C single bond. The other two novel GDM analogues, having the same molecular formula of $C_{28}H_{38}N_2O_8$, were 17(or 12, or 4)-desmethoxygeldanamycin and 4,5-dihydro-10,11-dehydrate-17-desmethyl-17-hydroxygeldanamycin, respectively. The known GDM analogue, having the molecular formula of $C_{29}H_{42}N_2O_9$, was 4, 5-dihydrogeldanamycin, an intermediate in GDM biosynthesis. The discovery of novel

Received: January 8, 2009; Accepted: April 27, 2009

Corresponding author: Linzhan Wu. Tel: +86-10-63165283; E-mail: wulinzhan@yahoo.com.cn

GDM analogues provided us new insights in understanding the biosynthetic details of GDM, and clues of obtaining GDM derivatives by gene-disruption and combinatorial biosynthesis.

Keywords: LC-MS/MS, geldanamycin, geldanamycin analogues, biosynthesis

格尔德霉素(Geldanamycin, GDM; 化合物 1, 分子式 $C_{29}H_{40}N_2O_9$, 分子量 560.2734 D; 其加钠准分子离子的 m/z 为 583.2631)是一种苯(醌型)安莎类抗生素(图 1, 化合物 1)发现于 1970 年, 具有抗真菌作用^[1]。近年来, 由于发现 GDM 具有抗肿瘤、抗病毒等活性而受到重视, 成为开发抗肿瘤药物的先导化合物^[2-4]。

对 GDM 的生物合成研究表明, 它在 I 型聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)催化下, 以 3-氨基-5-羟基-苯甲酸(AHBA)作为合成起始前体, 将 7 个二碳单位(丙二酰 CoA、甲基丙二酰 CoA 和甲氧基丙二酰 CoA)连接形成脂肪链(安莎链); 然后, 在酰胺合酶催化下闭环形成前格尔德霉素(Pro-geldanamycin); 最后, 通过若干后修饰酶(Tailoring enzymes)作用生成 GDM^[5-8]。但是, GDM 生物合成的一些细节并不完全清楚; 通过对 GDM 生物合成相关类似物进行分析, 对于深入理解 GDM 的生物合成机制、发现与开发具有抗肿瘤作用的 GDM 衍生物具有启示作用。

液相色谱与质谱联用(LC-MS/MS)技术在药物以及天然代谢产物的分析、鉴别与鉴定方面具有广泛用途和重要作用。LC-MS/MS 技术的高灵敏性和对复杂混合物的高选择性, 使得它在化合物结构早期分析与鉴别方面具有独特的优势。本研究采用 LC-MS/MS 技术, 对来自吸水链霉菌 17997 的 GDM 制品进行了分析, 发现多个 GDM 类似物, 并对其化

学结构进行了推测(图 1)。

1 材料与方法

1.1 材料

GDM 制品, 本实验室从吸水链霉菌 17997 的发酵液中通过大孔树脂吸附、有机溶剂萃取、硅胶柱层析等步骤提取获得。甲醇为 Fisher Scientific 产品(HPLC grade)。

1.2 方法

LC-MS/MS 仪器为 ABI 公司 Q-TOF 型产品(Qstar Elite)。RRLC 系统(Agilent, Waldbronn, Germany)由二元溶剂传递系统、在线脱气、自动取样器、柱控温室和二极阵列检测器组成。采用迪马公司 Diamonsil™ C_{18} 反相色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)分析格尔德霉素制品, 流动相为 40%~100% 甲醇, 30 min 梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 40°C, UV 检测波长 190~400 nm。LC 洗脱峰约 300 μL/min 导入到 ESI 源(喷雾电压 5.5 kV, 温度 450°C, 解簇电压 90 V, 雾化气 80 相对单位, 干燥气 70 相对单位, 均为氮气), 全扫描监测, 正离子方式, 质荷比(m/z)范围为 100~1000。采用信息依赖扫描模式获得二级质谱, 碰撞压力设为高, 碰撞能量为 40 eV。

对 GDM 制品 HPLC 中的杂质小峰进行一级质谱分析, 获得准分子离子信息; 以特定质量数(靠近

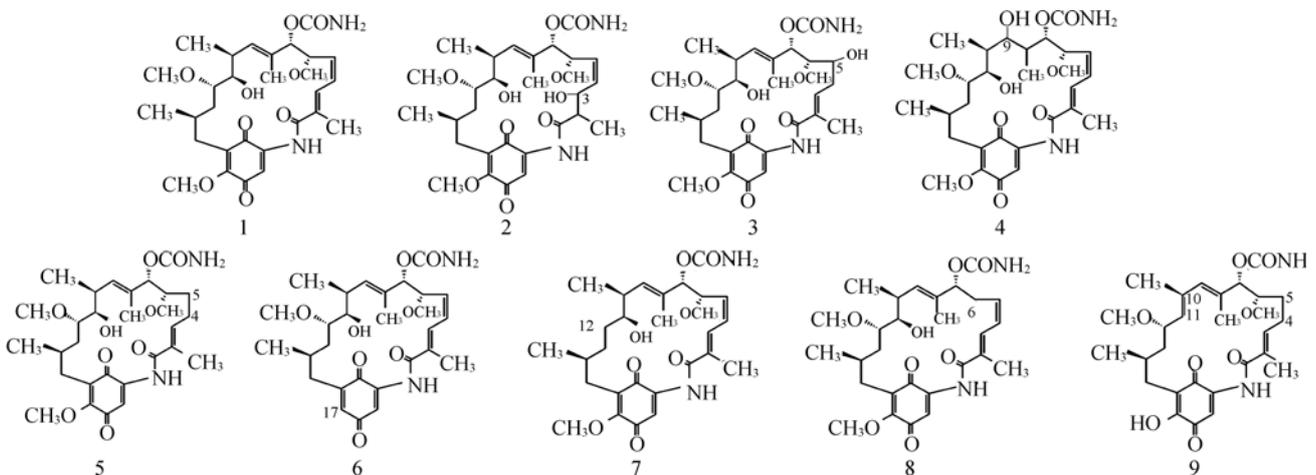


图 1 GDM 的化学结构及其制品中存在的 GDM 类似物可能的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of GDM and the possible chemical structures of its analogues within GDM preparation.

GDM 的分子量 560 D)对总离子流图进行质量提取, 获得选择离子色谱图; 对特定质量数进行二级质谱分析, 判断是否为 GDM 类似物, 结合 GDM 的生物合成机制, 对 GDM 类似物可能的分子结构进行推测。

2 结果与讨论

从吸水链霉菌 17997 发酵液中提取的 GDM 制品经 HPLC 检测纯度约 90%(以峰面积计)。在 GDM(主峰)的前后有多峰(图 2), 推测其中含有 GDM 类似物。

本实验室对不同来源的 GDM 样品进行多次 ESI(+)-MS/MS 分析, 首次总结发现: 1)安莎链 C7 位上的氨基酰胺基连同羟基通过麦氏重排容易脱去, 也可只断裂脱去氨基酰胺基, 分别产生 m/z 522 $[M + Na - HOCONH_2]^+$ (基峰)和 m/z 539 $[M + Na - CONH_2]^+$ 2 个子离子峰, 与 GDM 准分子离子峰的差异分别为 61 和 44。2)在 m/z 522 基础上, 脱去一个甲氧基(可能是苯醌环 C17 位上连接的甲氧基), 产生 m/z 490 $[M + Na - HOCONH_2 - HOCH_3]^+$ 离子; 二者的差异为 32。3)出现了含有 C4-C5 的安莎链碎片峰(m/z 187, 159)。这些二级质谱特征, 尤其是第一个特征, 对于判断 GDM 类似物非常有价值(图 3)。

在对 GDM 制品进行 LC-MS/MS 分析中, 以特定质量数(583、601、585 和 553)对总离子流图进行

了质量提取(图 4); 对其中的多数离子色谱峰进行了二级质谱分析(图 5), 发现了 6 个 GDM 类似物(5 个新的和 1 个已知的)。表 1 对 GDM 及 6 个 GDM 类似物的 ESI(+)-MS/MS 数据进行了总结。

GDM 类似物——化合物 2、3 和 4(实测加钠分子量分别为 601.2758 D、601.2804 D 和 601.2774 D; 分子式 $C_{29}H_{42}N_2O_{10}Na$, 计算分子量 601.2737 D)。这 3 个化合物的二级质谱(图 5B、C 和 D)与 GDM 的(图 5A)非常相似。在 GDM 的生物合成过程中, C2-C3、C4-C5 和 C8-C9 之间的双键, 是通过 C3、C5 和 C9 上连接的羰基加氢还原为羟基, 羟基再分别与相邻碳原子上连接的氢原子脱水形成。这 3 个化合物可能是 GDM 生物合成中 PKS(聚酮合酶)上催化脱水作用的脱水酶(Dehydratase, DH; 分别为 DH7、DH6 和 DH4)活性不足造成, 从而形成比 GDM 多一个水分子质量(18 D)的类似物(化合物 2、3 和 4)。

GDM 类似物——化合物 5(实测加钠分子量 585.2811 D; 分子式 $C_{29}H_{42}N_2O_9Na$, 计算分子量 585.2788 D)。该化合物(图 5E)的二级质谱与 GDM 的(图 5A)特别相似, 说明它与 GDM 的结构差异很小; 其准分子离子的质荷比比 GDM 的大 2, 系多 2 个氢原子所致。该化合物有 2 个小碎片峰的质荷比(m/z 189, 161), 分别比 GDM 相应碎片峰的质荷比(m/z 187, 159)大 2; 从 GDM 生物合成的角度分析, 是 C4-C5

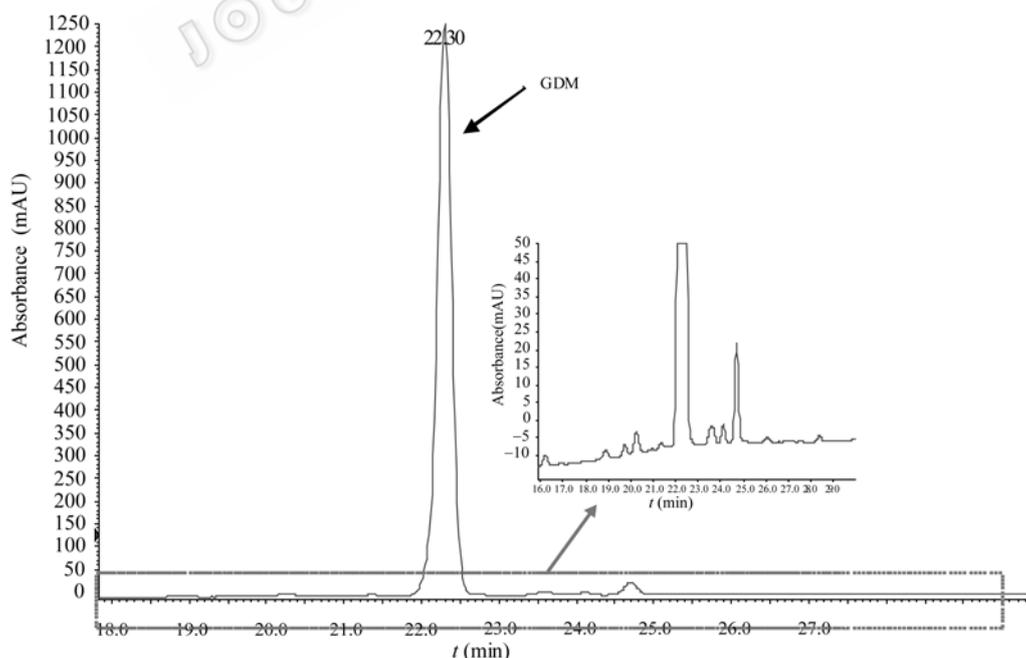


图 2 GDM 制品的 HPLC 分析

Fig. 2 HPLC analysis of GDM preparation.

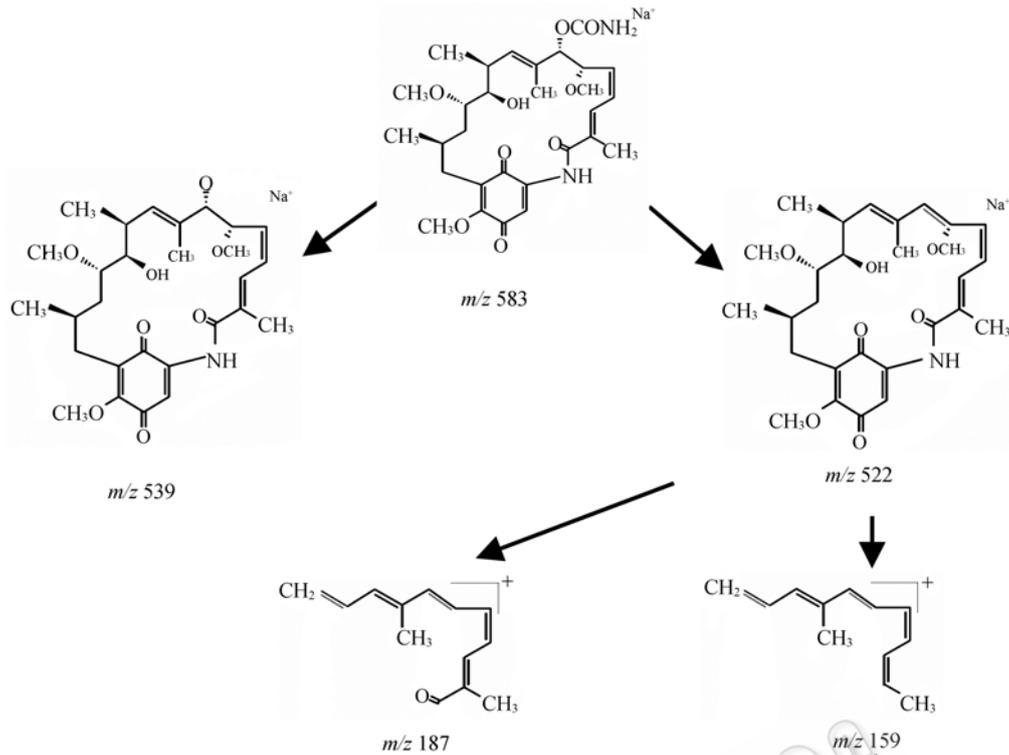


图 3 GDM 的 ESI(+)-MS/MS 碎裂方式

Fig. 3 Fragmentation pattern of GDM in ESI(+)-MS/MS.

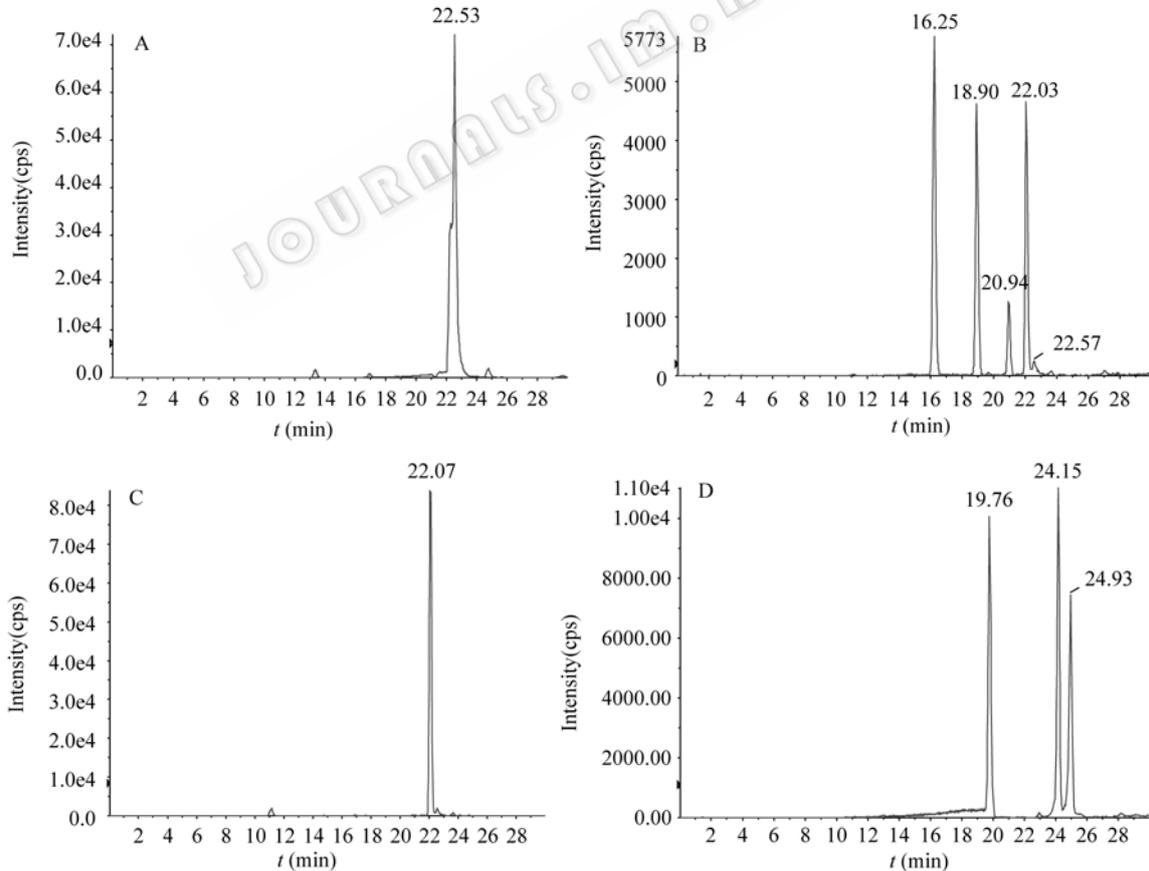


图 4 质量数为 583(A)、601(B)、585(C)和 553(D)的提取离子流图

Fig. 4 XIC chromatograms of mass number 583(A), 601(B), 585(C) and 553(D).

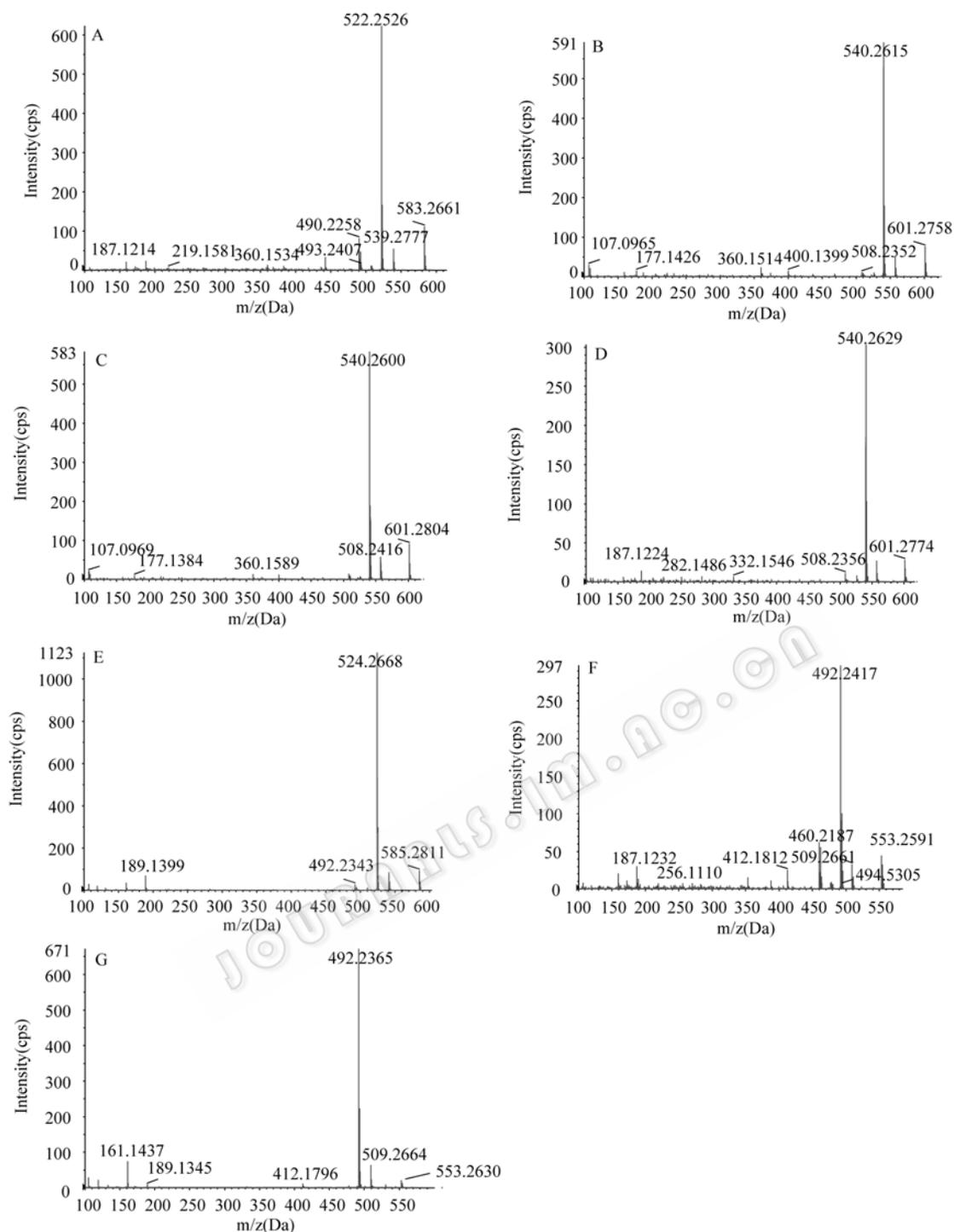


图 5 GDM(A)及其类似物(B至G)的ESI(+)-MS/MS

Fig. 5 ESI(+)-MS/MS spectra of GDM (A) and its analogues (B–G).

表 1 GDM 及其类似物 ESI(+)-MS/MS 谱的特征离子峰

Table 1 Characteristic fragments of GDM and its analogues by ESI(+)-MS/MS

Retention time (min)	Compound (s)	m/z ($M+Na^+$)	m/z (MS^2)
22.54	1	583	539, 522, 490, 187, 159
16.25; 18.90; 20.94	2; 3; 4	601	557, 540, 508, 187, 159
22.06	5	585	541, 524, 492, 189, 161
19.76	6, or 7, or 8	553	509, 492, 460, 187, 159
24.15	9	553	509, 492, 189, 161

之间的单键没有被氧化为双键所致。因此, 推测该化合物为 4,5-双氢格尔德霉素(化合物 5)。

GDM 类似物——化合物 6(或 7, 或 8)和 9(实测加钠分子量分别为 553.2591 D 和 553.2630 D; 分子式 $C_{28}H_{38}N_2O_8Na$, 计算分子量 553.2525 D)这 2 个化合物(图 5F 和 G)的二级质谱与 GDM 的非常相似。这 2 个化合物有 2 个小碎片峰的质荷比(m/z 187, 159; m/z 189, 161)不一样, 提示它们的 C4-C5 分别以双键和单键相连。出峰时间为 19.76 min 化合物与 GDM 分子量的差值为 30 D, 推测是缺少一个甲氧基所致, 从 GDM 生物合成的角度分析, 可能是 PKS 后修饰阶段中的 C17 羟基化没有发生(导致后续的 C17-O-甲基化修饰也无法完成)所致, 生成 17-去甲氧基格尔德霉素(化合物 6); 也可能是在 GDM 的安莎链生物合成过程中, PKS 中本应识别甲氧基丙二酰 CoA 的酰基转移酶活性位点(Acyltransferase, AT; AT2 或者 AT5)错误识别了丙二酰 CoA, 造成甲氧基缺失, 生成 12 或 6-去甲氧基格尔德霉素(化合物 7 或 8)。出峰时间为 24.15 min 化合物, 有可能来自: $560 D (GDM) - 18 D(H_2O) - 14 D(-CH_2) + 2 D(H_2) = 530 D$; 其分子结构推测为 4, 5-双氢-10,11-脱水-17-去甲基-17-羟基格尔德霉素(化合物 9)。

在已知的 GDM 产生菌及其基因阻断变株中, 已经发现了若干 GDM 类似物。例如, 在 *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *duamyceticus* JCM4427^[9] 和 *Streptomyces hygroscopicus* NRRL3602^[10] 的发酵液中有 4, 5-双氢格尔德霉素存在; 本实验室也证实 4, 5-双氢格尔德霉素在吸水链霉菌 17997 的发酵中期有明显积累^[11]。JCM4427 菌株还产生 17-去甲基格尔德霉素(约为 GDM 产量的 10%)^[7]; 在该菌株的 GDM 生物合成后修饰基因之一——氨甲酰基转移酶基因(*gel8* 基因)的阻断变株发酵产物中还发现了 4, 5-双氢-11, 21-环氧-氢醌型格尔德霉素 (ACDL3172)^[9]。在 *Streptomyces hygroscopicus* NRRL3602 的一个基因替换变株中, 不仅发现了预计的 8-去甲基格尔德霉素, 而且还意外地发现了 4, 5-环氧-8-去甲基格尔德霉素^[12]。与 GDM 结构相似的安莎类抗生素如除莠霉素(Herbimycin)、安丝菌素(Ansamitocin)和马克霉素(Macbecin), 在生物合成过程中也出现多个结构类似物(组分)。

GDM 为具有聚酮结构的大环内酰胺类化合物,

分子中的聚酮结构(安莎链)由 I 型聚酮合酶(Type PKS)催化完成。I 型聚酮合酶(复合体)的分子巨大(分子量可高达数百万道尔顿), 由多个多肽链组成, 每个多肽链由 1 至多个模块(Module)构成, 每个模块催化一个二碳单位的连接; 每个模块由 3 至 6 个活性位点构成(包括 KS、AT 和 ACP 三个必需活性位点, 以及 KR、DH 和 ER 三个非必需活性位点); 模块的数量及活性位点构成, 与所合成的聚酮链在化学结构上具有对应关系。随着对 I 型聚酮合酶研究的深入, 发现个别模块上的酶活性位点并不总是能够 100% 完成催化反应。例如, 由阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)产生的阿维菌素(Avermectins), 其生物合成 I 型 PKS 中模块 2 上脱水酶的活性可能不足, 不能完全将 C22-C23 之间的单键转化为双键, 产生 C22-C23 之间分别为双键和单键连接的两类阿维菌素组分^[13,14]; 由结节链霉菌(*Streptomyces nodosus*)产生的两性霉素(Amphotericin), 其生物合成 I 型 PKS 中将 C28-C29 之间双键还原为单键的烯醇还原酶(Enoylreductase, ER)ER5 的活性与菌株的生理状态有一定关系, 形成 C28-C29 之间分别为单键和双键连接的 2 种组分^[15]。参与 GDM 生物合成的 I 型 PKS(由 7 个模块组成)含有 5 个 DH。化合物 2、3 和 4 在 GDM 制品中的含量非常低, 它们可能是相应的 DH 位点活性不足(或者被跳过)而合成的微量异常产物, 并导致生物合成后期催化 C4-C5 之间单键为双键的后修饰酶不能发挥作用。

已知埃坡霉素(Epothilone)生物合成 PKS 中的一个 AT 活性位点(AT3)具有识别甲基丙二酰 CoA 和丙二酰 CoA 的宽容性, 合成在 C12 上连接甲基或氢原子的埃坡霉素不同组分^[16]。到目前为止, 尚未见到 PKS 中识别甲氧基丙二酰 CoA 的 AT 具有丙二酰 CoA 识别特性的报道; 因此, 化合物 7 和 8, 源自 GDM 生物合成 PKS 中识别甲氧基丙二酰 CoA 的 AT 活性位点可能具有识别丙二酰 CoA 的底物宽容性假设, 值得今后进一步研究。

通过 LC-MS/MS 技术分析抗生素中的多组分以及生物合成相关物质, 指导抗生素的发酵生产、加强抗生素的品(杂)质分析与质量控制, 已是该技术的一个重要应用领域。例如, 国内有报道采用 LC-MS/MS 技术分析螺旋霉素发酵产物中的螺旋霉

素生物合成相关物质(包括代谢中间产物), 指导螺旋霉素的发酵生产, 提高螺旋霉素的发酵效价与产品品质^[17,18]。本研究采用 LC-MS/MS 技术与 GDM 生物合成相关的类似物, 不仅可以加深对 GDM 生物合成的认识, 以及为通过基因阻断、组合生物合成技术获得 GDM 生物合成衍生物提供研究线索, 也可以为分析、检测 GDM 制品中的(微量)杂质组分提供参考。

REFERENCES

- [1] DeBoer C, Meulman PA, Wnuk RJ, *et al.* Geldanamycin, a new antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)*, 1970, **23**(9): 442–447.
- [2] Hu Z, Liu Y, Tian ZQ, *et al.* Isolation and characterization of novel geldanamycin analogues. *J Antibiot (Tokyo)*, 2004, **57**(7): 421–428.
- [3] Patel K, Piagentini M, Rascher A, *et al.* Engineered biosynthesis of geldanamycin analogs for Hsp90 inhibition. *Chem Biol*, 2004, **11**(12): 1625–1633.
- [4] Schnur RC, Corman ML, Gallaschun RJ, *et al.* erbB-2 oncogene inhibition by geldanamycin derivatives: Synthesis, mechanism of action, and structure-activity relationships. *J Med Chem*, 1995, **38**(19): 3813–3820.
- [5] Rascher A, Hu Z, Viswanathan N, *et al.* Cloning and characterization of a gene cluster for geldanamycin production in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3602. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **218**(2): 223–230.
- [6] Rascher A, Hu Z, Buchanan GO, *et al.* Insights into the biosynthesis of the benzoquinone ansamycins geldanamycin and herbimycin, obtained by gene sequencing and disruption. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(8): 4862–4871.
- [7] Hong YS, Lee D, Kim W, *et al.* Inactivation of the carbamoyltransferase gene refines post-polyketide synthase modification steps in the biosynthesis of the antitumor agent geldanamycin. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(36): 11142–11143.
- [8] Shin JC, Na Z, Lee DH, *et al.* Characterization of tailoring genes involved in the modification of geldanamycin polyketide in *Streptomyces hygroscopicus* JCM4427. *J Microbiol Biotech*, 2008, **18**(6): 1101–1108.
- [9] Lee D, Lee K, Cai XF, *et al.* Biosynthesis of the heat-shock protein 90 inhibitor geldanamycin: New insight into the formation of the benzoquinone moiety. *Chembiochem*, 2006, **7**(2): 246–248.
- [10] Cullen WP, Jefferson MT, Moyer MP. Process and uses for 4, 5-dihydrogeldanamycin and its hydroquinone: US patent, WO 1993014215. 1993-07-22.
- [11] Zhang K, Wu LZ, Lin L, *et al.* Discrimination and detection of 4, 5-dihydrogeldanamycin produced by *Streptomyces hygroscopicus* 17997. *Chin J Antibiotics*, 2009, **34**(5): 268–272.
张侃, 武临专, 林灵, 等. 吸水链霉菌 17997 产生的 4, 5-双氢格尔德霉素的鉴别与检测. *中国抗生素杂志*, 2009, **34**(5): 268–272.
- [12] Buchanan GO, Regentin R, Piagentini M, *et al.* Production of 8-demethylgeldanamycin and 4, 5-epoxy-8-demethylgeldanamycin from a recombinant strain of *Streptomyces hygroscopicus*. *J Nat Prod*, 2005, **68**(4): 607–610.
- [13] Ikeda H, Nonomiya T, Omura S. Organization of biosynthetic gene cluster for avermectin in *Streptomyces avermitilis*: Analysis of enzymatic domains in four polyketide synthases. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2001, **27**(3): 170–176.
- [14] Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, *et al.* Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(17): 9509–9514.
- [15] Borgos SE, Sletta H, Fjaervik E, *et al.* Effect of glucose limitation and specific mutations in the module 5 enoyl reductase domains in the nystatin and amphotericin polyketide synthases on polyene macrolide biosynthesis. *Arch Microbiol*, 2006, **185**(3): 165–171.
- [16] Petković H, Sandmann A, Challis IR, *et al.* Substrate specificity of the acyl transferase domains of EpoC from the epothilone polyketide synthase. *Org Biomol Chem*, 2008, **6**(3): 500–506.
- [17] LI YY, Chen CH, Gu YF, *et al.* LC-ESI/MS identification and reduction of impurities in spiramycin fermentation. *Chin J Biotech*, 2005, **21**(2): 275–278.
李友元, 陈长华, 顾熠峰, 等. 基于液质联用技术解析和降低螺旋霉素发酵杂质. *生物工程学报*, 2005, **21**(2): 275–278.
- [18] Li YY, Chen CH, Tao P, *et al.* Qualitative analysis of mesostates in biosynthesis of spiramycin by LC-ESI-MS. *J Instrumental Anal*, 2002, **21**(3): 40–43.
李友元, 陈长华, 陶萍, 等. 螺旋霉素生物合成中间代谢物的 LC-ESI-MS 定性分析. *分析测试学报*, 2002, **21**(3): 40–43.