



УДК 615.33+547.963.32.07

© 1992 г. С. Л. Гроховский, Б. П. Готтих, А. Л. Жузе

ЛИГАНДЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ СРОДСТВОМ К ОПРЕДЕЛЕННЫМ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ ПАР ОСНОВАНИЙ ДНК
IX*. СИНТЕЗ АНАЛОГОВ НЕТРОПСИНА И ДИСТАМИЦИНА А,
СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТОК САРКОЛИЗИНА ИЛИ АТОМ
ПЛАТИНЫ (II)

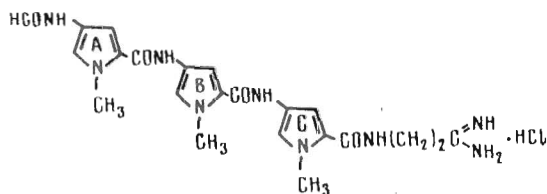
Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

С целью поиска соединений, способных образовывать ковалентные связи в участках ДНК с несколькими расположенными подряд А·Т-парами оснований, синтезированы аналоги нетропсина и дистамицина А, содержащие в N-концевой части молекул остаток сарколизина или атом платины(II). Осуществлен синтез бис-нетропсина и бис-дистамицина, состоящих из модифицированных молекул антибиотиков, связанных через остаток *цис*-диамминплатины(II). Показано, что соединения, содержащие атом платины, могут быть использованы для специфического расщепления ДНК.

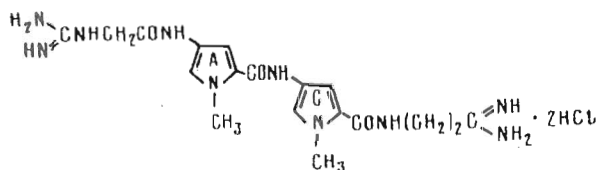
Низкомолекулярные сиквенс-специфичные лиганды могут быть использованы в качестве полезных инструментов для модификации нуклеиновых кислот. На их основе возможно создание синтетических реагентов, способных сайт-специфично расщеплять сахаро-фосфатный остов ДНК. В отличие от природных белков, специфичных к определенным последовательностям ДНК, низкомолекулярные лиганды можно в настоящее время синтезировать химическим путем под заданный, хотя и довольно ограниченный, круг последовательностей пар оснований ДНК [2–7]. Созданное в 1976 г. молекулярной модели, объясняющей сродство антибиотиков дистамицина А и нетропсина (рисунок) к коротким последовательностям А·Т-пар оснований ДНК [8, 9], позволило нам выявить участки молекул этих антибиотиков, изменение структуры которых не влияет на их специфическое сродство к А·Т-парам оснований ДНК. Одна из таких модификаций состоит в изменении концевых участков молекул дистамицина А или нетропсина. Нами были синтезированы аналоги дистамицина, содержащие в N-концевой части молекулы ацетильную, бензоильную или дансил-глицильную группу [10] или остаток олигопептида [11, 12], и было показано, что введение таких заместителей не влияет на специфическое сродство к А·Т-парам оснований ДНК пирролкарбоксамидного остова у этих аналогов.

Ранее в работах Аркамоне и др. [13–15] было показано, что существенного изменения биологической активности у аналогов дистамицина А с модифицированными концевыми участками не происходит. Впоследствии это было подтверждено исследованием активности подобных аналогов дистамицина А, в том числе с различным количеством пирролкарбоксамидных фрагментов [16–18]. Сохранение АТ-специфичности было также отмечено у аналогов дистамицина А, содержащих в N-концевой

* Сообщение VIII см. [1]. Принятые сокращения: Nps — 1-пропил-4-нитропиррол-2-карбоновая кислота; Ars — 1-пропил-4-аминопиррол-2-карбоновая кислота; Ram — 4-[N,N-бис(2-хлорэтил)амино]-DL-фенилаланин (DL-сарколизин); Im — имидазол; CDI — N,N'-карбонилдимидазол.



Дистамицин А



Нетропсин

Химические формулы нетропсина и дистамицина А

части молекулы бромацетильную группу или остаток этилендиаминтетрауксусной кислоты [19, 20].

Для поиска соединений, обладающих сродством к определенным последовательностям ДНК и способным образовывать с ДНК ковалентные связи, нами были синтезированы аналоги нетропсина и дистамицина А, в состав которых входят остаток сарколизина или атом платины(II). Из литературных данных было известно, что соединения, содержащие производные противоопухолевых агентов — сарколизина [21, 22] и *цис*-диаминплатины(II) [23, 24], способны образовывать ковалентные связи с основаниями молекулы ДНК. В качестве алкилирующих агентов для модификации ДНК кроме бромацетильного производного дистамицина А [20] были описаны *N,N*-бис-(2-хлорэтильные) производные дистамицина А [25], циклопропильные и моно-, ди- и трихлорацетильные производные нетропсина [26].

Работа с аналогами дистамицина А или нетропсина осложняется из-за их сравнительной неустойчивости в водных растворах. Особенно быстрая деградация наблюдается при высоких значениях pH [27], причем с увеличением числа пиррольных циклов в молекуле устойчивость соединения падает. При хранении водного раствора нетропсина при 4° С через 8 дней отмечено уменьшение оптической плотности при 300 нм на 10%, а для дистамицина А — на 18% через 6 дней [28]. Упоминается, что аналог с пятью пирролкарбоксамидными фрагментами может подвергаться значительной деградации в водном растворе при 37° С в течение 90 мин [29].

Методом ВЭЖХ установлено, что при инкубации раствора дистамицина А в фосфатном буфере при pH 10,7 (*I* 0,1) при 20° С уже через 2 ч появляется новый пик, время выхода которого совпадает с таковым для образца нейтрального производного дистамицина А с карбоксамидной группой на С-конце молекулы. Через 11 ч в растворе остается примерно только половина от исходного количества антибиотика [30].

Нами была исследована устойчивость в растворе D₂O (pH 7) аналога дистамицина с двумя пиррольными циклами методом ¹H-ЯМР. Через 7 суток (образец хранился при 20° С на свету) изменение в спектре состояло только в резком уменьшении сигнала протона в α-положении пиррольных циклов, вызванном обменом с растворителем. Тем не менее электрофорез в 1 н. уксусной кислоте показал присутствие в этом образце око-

ло 30% незаряженного продукта, образовавшегося, очевидно, вследствие гидролиза амидиновой группы до соответствующего карбоксамида. Для повышения устойчивости изучаемых соединений и упрощения синтеза мы заменили лабильную амидиновую группу, присутствующую в С-концевых частях молекул дистамицина А и нетропина, на третичный амин, как было предложено ранее Глибиным и др. [31].

Кроме того, в отличие от природных антибиотиков у синтезированных веществ к атомам азота пиррольных циклов присоединены *n*-пропильные, а не метильные группы. На основе предложенной в 1976 г. Заседателевым и др. [8, 9] модели для комплекса антибиотиков дистамицинового типа с ДНК и из подтверждающих эту модель экспериментальных данных [32], а также более поздних рентгеноструктурных исследований [33, 34] можно предполагать, что такая замена практически не отразится на сродстве и специфичности связывания с ДНК. Выбор *N*-пропильных аналогов был обусловлен тем, что замена метильных радикалов на *n*-пропильные увеличивала устойчивость соединений. Например, хлоргидрат 1-пропил-4-аминопиррол-2-карбоновой кислоты в отличие от соответствующего метильного аналога может храниться при 20° С в темноте и отсутствии влаги несколько месяцев без заметных признаков разложения. Выходы на стадиях синтеза, включающих в себя гидрирование 4-нитрогруппы пиррольного цикла, для пропильных аналогов заметно выше и лучше воспроизводимы, чем выходы соответствующих метильных аналогов [35]. Такие различия, вероятно, обусловлены тем, что пропильный остаток у атома азота частично экранирует атом водорода в положении 5 пиррольного цикла, уменьшая его реакционную способность.

Синтез аналогов дистамицина А, модифицированных по *N*-концу молекулы антибиотика, включал в себя первоначальное получение соединения (VII), содержащего два пиррольных цикла. Это соединение образовалось при конденсации хлорангидрида 1-пропил-4-нитропиррол-2-карбоновой кислоты (IV) с этиловым эфиром 1-пропил-4-аминопиррол-2-карбоновой кислоты (II) и последующем омылении эфира (V) (схема 1). Ранее нами было обнаружено [10], что при кислотном гидролизе *трет*-бутиловых эфиров 1-метил-4-нитро- или 1-метил-4-ацетиламидопиррол-2-карбоновых кислот основным продуктом реакции была не соответствующая кислота, а продукт реакции декарбоксилирования. Реакция декарбоксилирования с образованием соединения (VI) протекала и при щелочном гидролизе этилового эфира соединения (V), но в результате подбора условий гидролиза эту реакцию удалось в данном случае свести к минимуму и кислота (VII) была получена с выходом 96%.

Соединение (VII) превращали в соответствующий имидазолид, а последний конденсировали с *N,N*-диметил-1,3-диаминопропаном. Полученное соединение (VIII) восстанавливали гидрированием над катализатором Адамса до соответствующего аминопроизводного (IX), которое конденсировали с *Z*- или *Вос*-глицином с помощью *N,N'*-карбонилдиимидазола. Аминопроизводное (X) было получено после удаления защитных групп соответственно либо гидрированием, либо обработкой трифторуксусной кислотой. Соединение (X) было синтезировано также конденсацией кислоты (XVII), полученной из хлоргидрата 1-пропил-4-аминопиррол-2-карбоновой кислоты (XVI) и имидазолида *Вос*-глицина, с аминопроизводным (XIX), полученным гидрированием соединения (XVIII), которое в свою очередь получали конденсацией хлорангидрида (IV) с *N,N*-диметил-1,3-диаминопропаном. *Вос*-группу удаляли раствором хлористого водорода в этаноле (схема 2). Суммарный выход соединения (X), по приведенным вариантам синтеза, составил 39 и 54% соответственно.

Соединение (IX) использовали также для синтеза соединения (XI), содержащего три пиррольных цикла, из которого после каталитического

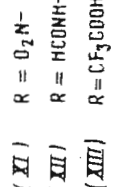
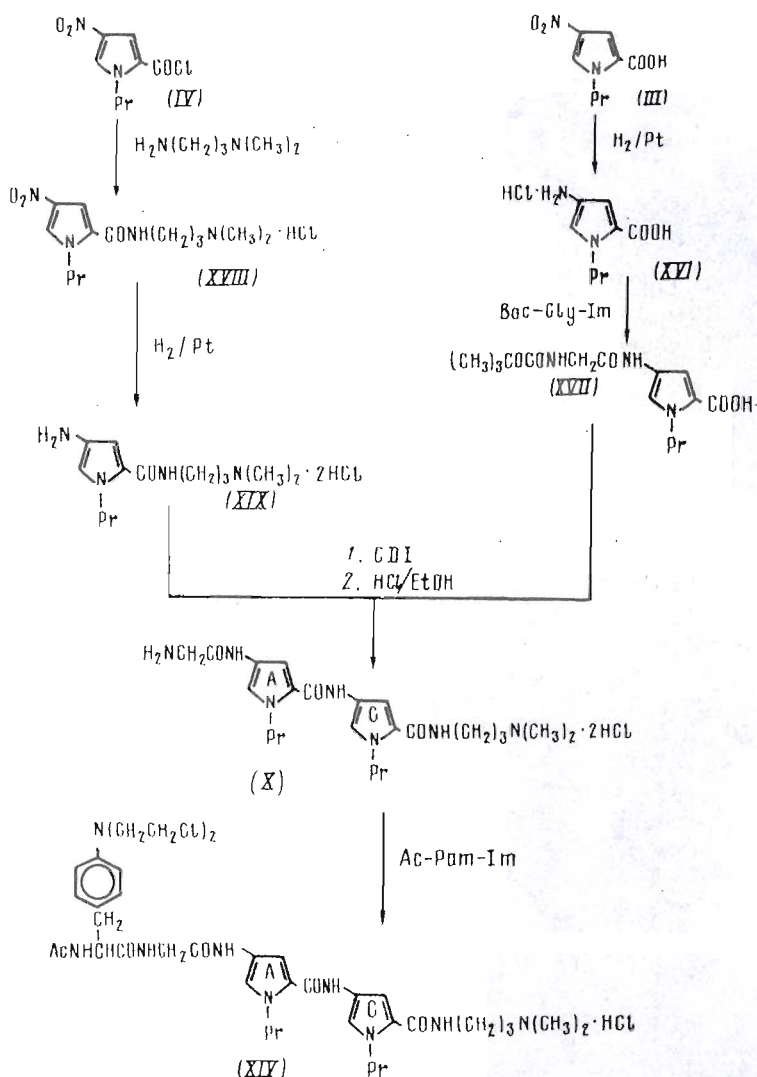
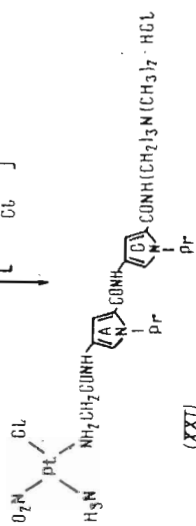
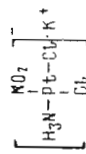
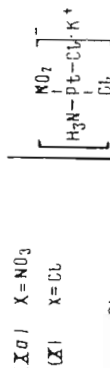
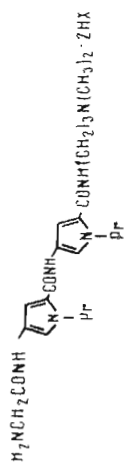
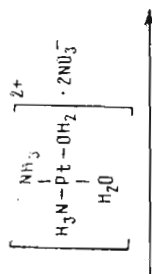


Схема 2

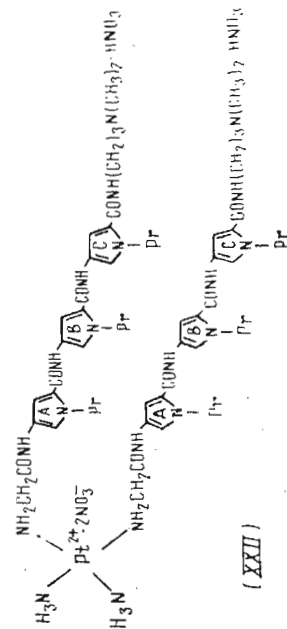
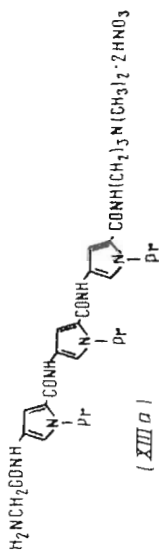
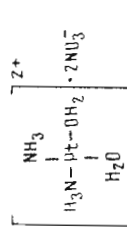
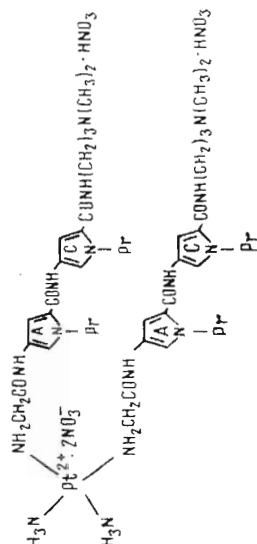


восстановления нитрогруппы, последующей конденсации продукта реакции с имидазolidом Вос-глицина и удаления защитной группы получили соединение (XIII) (схема 1). При конденсации этого соединения с имидазolidом ацетил-*DL*-сарколизина образовался аналог дистамицина А (XV). Сходный по структуре аналог нетропсина (XIV) с двумя пиррол-карбоксамидными фрагментами был синтезирован из соединения X (схема 2). Кроме того, из соединения XI после восстановления нитрогруппы до аминогруппы и последующего формилирования формилуксусным ангидридом получили аналог дистамицина (XII) с тремя пиррольными циклами (схема 1).

Для синтеза соединения, несущего реакционноспособную группировку координационного соединения платины(II), первоначально мы попытались получить аналог нетропсина, содержащий остаток моноакваплатины(II). Соединение (Xa), содержащее незащищенную аминогруппу остатка глицина, было обработано 4-кратным избытком нитрата *цис*-диам-



(XX)



(XXII)

миндиакваплатины(II), тем не менее основным продуктом реакции явился бис-нетропсин (XX) — соединение, содержащее на один атом платины два дипирролкарбоксамидных фрагмента (схема 3). Для синтеза платина(II)содержащего аналога нетропсина (XXI) мы использовали соль Косса. Соединение (XXI) содержит потенциально реакционноспособный атом хлора, что дает возможность атому платины(II) образовывать ковалентную связь с соответствующей нуклеофильной группой. Синтез бис-дистамицина (XXII), полученного из соединения (XII), представлен на схеме 3.

Следует отметить, что обычно электрофильной атаке производными сарколизина [22, 36] и *цис*-диамминплатины(II) [23] подвергаются атом азота в положении 7 пуриновых оснований и прежде всего N7 гуанина, выходящий в широкий желоб ДНК. Поскольку в нашей работе мы планировали использовать в качестве сиквенс-специфичных соединений производные А·Т-специфичных антибиотиков дистамицина А и нетропсина, взаимодействующих с ДНК по узкому желобу [8, 33, 34], местом вероятной ковалентной модификации мог быть нуклеофильный атом азота в положении 3 аденина. О возможности такой электрофильной атаки по атому N3 аденина свидетельствуют работы по механизму действия антибиотика CC-1065 [7], бромацильного производного дистамицина [20] и результаты, полученные при изучении механизма действия электрофильного карциногена 9-антрилоксирана [37].

Подробные результаты исследований по взаимодействию синтезированных соединений с ДНК будут опубликованы отдельно. По предварительным данным, соединение (XIV) не образует с ДНК прочного комплекса, а соединения (XV), (XX)–(XXII) образуют с ДНК прочный комплекс, проявляя специфичность к А·Т-парам оснований ДНК. Синтезированные соединения могут быть использованы для модификации белков в местах их контакта с ДНК со стороны узкой бороздки ДНК; кроме того, соединения, содержащие атом платины, можно использовать для разделения ДНК по А·Т-составу при центрифугировании в градиенте плотности, а также в электронной микроскопии для визуализации ДНК.

Для бис-нетропсина (XX), содержащего атом платины(II), было показано, что при облучении рентгеновскими лучами комплексов этого соединения с рестриктивными фрагментами ДНК наблюдается специфическое расщепление ДНК в местах предполагаемой локализации атома платины [38]. При этом расщепление каждой из цепей ДНК происходит в основном только по одному нуклеотиду и почти не затрагивает соседние, что позволяет определить положение лиганда в узкой бороздке ДНК с точностью до одного нуклеотида.

Расщепляющая активность бис-нетропсина (XX), по-видимому, связана с эмиссией Оже-электронов из атома платины, вызванной поглощением рентгеновского фотона и образованием многозарядного положительного иона [39], что приводит к расщеплению остатков дезоксирибозы в обеих нитях ДНК в непосредственной близости к атому платины. На основе статистического анализа нуклеотидных последовательностей в местах расщепления рестриктивных фрагментов ДНК общей длиной более 3000 п.о. был сделан вывод, что бис-нетропсин (XX) преимущественно связывается с симметричной последовательностью 5'-ТХТТА*АУА-3', где Х и У — основания А или Т, хотя в этих положениях могут встречаться и основания С и G, а место расщепления указано звездочкой.

По предварительным данным, аналог нетропсина (XXI), несущий атом платины(II), и бис-дистамицин (XXII) при облучении рентгеновскими лучами их комплексов с рестриктивными фрагментами ДНК также могут вызывать специфичное расщепление сахарофосфатного остова ДНК.

Предложенный Гроховским и Зубаревым [40] механизм расщепления ДНК, основанный на использовании Оже-излучателей, может быть использован для конструирования и синтеза сиквенса-специфичных пуклеаз, которые могут найти применение при картировании генома.

Экспериментальная часть

Температуру плавления определяли на приборе Boethius (VEB, ГДР) и не исправляли. Гидрирование проводили над катализатором Адамса при атмосферном давлении и температуре 25°C до прекращения интенсивного поглощения водорода. Растворы веществ в органических растворителях высушивали над Na_2SO_4 . Растворители упаривали при 20°C в вакууме водоструйного или масляного насоса. Вещества высушивали в вакууме над P_2O_5 и NaOH при 20°C. Чистоту полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silufol UV-254 (ЧСФР) в следующих системах: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1 (А); изопропанол — конц. водный аммиак — вода, 7:1:3 (Б); 1 М ацетат аммония (рН 7,6) — этанол, 3:7 (В); хлороформ — абс. этанол, 95:5 (Г). Электрофорез проводили на бумаге FN-18 (ГДР) в 1 М уксусной кислоте (рН 2,4) в течение 1 ч при градиенте потенциала 20 В/см. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Beckman-25 (США), спектры ^1H -ЯМР — на спектрометре Varian XL-100 (США) с рабочей частотой 100 МГц при 33°C. В качестве растворителя использовали диметилсульфоксид- d_6 с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта (δ 0,00). Химические сдвиги протонов (δ) приведены в м. д. Сокращения: с — синглет, д — дублет, т — триплет, м — мультиплет; А, В, С — условные обозначения пиррольных циклов на рисунке и схемах. Контроль элюатов при колоночной хроматографии осуществляли с помощью УФ-регистрирующего проточного денситометра Uvicord II-8300 (Швеция). Для колоночной хроматографии, если в методике не указаны другие условия, использовали колонку (3×150 см) с сефадексом LH-20 в метаноле; элюцию проводили метанолом при 4°C со скоростью 10–15 мл/ч, отбирали фракции объемом по 15 мл. Масс-спектры получены на приборе MS-50TC (Kratos, Англия) при бомбардировке ускоренными атомами ксенона с энергией 6–8 кэВ (матрица — глицерин).

Npc-Apc-OEt (V). Раствор 15,0 г (66 ммоль) этилового эфира 1-пропил-4-нитропиррол-2-карбоновой кислоты (*Npc-OEt*) (I) [35] в смеси 200 мл этанола и 15 мл конц. HCl гидрировали над 3 г катализатора Адамса. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали и остаток несколько раз промывали эфиром до полного удаления из хлоргидрата этилового эфира 1-пропил-4-аминопиррол-2-карбоновой кислоты (II) исходного соединения (I). Хлорангидрид 1-пропил-4-нитропиррол-2-карбоновой кислоты (IV) получали кипячением в течение 1 ч 12,0 г (60,6 ммоль) *Npc-OH* (III) [35] с 50 мл SOCl_2 в присутствии 0,05 мл DMF с последующим упариванием SOCl_2 и многократным упариванием с абс. бензолом. Раствор хлорангидрида (IV) в 50 мл абс. бензола прибавляли к суспензии аминокон компонента (II) в смеси 150 мл абс. этилацетата и 20 мл (143 ммоль) триэтиламина. После перемешивания реакционной смеси при 20°C в течение 2 ч к ней прибавляли 200 мл воды, органический слой отделяли, промывали 1 М HCl (3×50 мл), высушивали и осаждали петролейным эфиром. Получили 20,2 г (88%) соединения (V), т.пл. 136–139°C, R_f 0,87 (А), 0,38 (Г). ЯМР: 10,27, с (NH); 8,26, д (H^{A}); 7,62, д (H^{B}); 7,51, д (H^{C}); 6,99, д (H^{D}); 4,42, т ($\text{N}^{\text{C}}\text{CH}_2$); 4,29, м ($\text{N}^{\text{A}}\text{CH}_2 + \text{OCH}_2$); 1,75, м (NCH_2CH_2); 1,31, т (OCH_2CH_2); 0,86, т ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Npc-Apc-OH (VII). Суспензию 38,0 г (101 ммоль) соединения (V) в смеси 400 мл этанола и 300 мл 2 н. NaOH нагревали 90 мин при 70°C,

упаривали этанол, к остатку прибавляли 700 мл воды и затем 6 н. HCl до pH 2. Осадок отфильтровывали, промывали водой и растворяли в 9% водном растворе NaHCO₃. Нерастворившийся желтый осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Получили 0,4 г (1,3%) *N*-(1-пропил-4-пирролил)-1-пропил-4-нитропиррол-2-карбоксамида (VI), т.пл. 155–158° С. *R*_f 0,92 (A), 0,56 (Г). ЯМР: 10,15, с (NH); 8,18, д (H5^A); 7,61, д (H3^A); 7,22, т (H5^C); 6,65, т, 6,14, т (H2^C+H3^C); 4,44, т (N^ACH₂); 3,82, т (N^CCH₂); 1,72, м (NCH₂CH₂); 0,84, т (CH₃).

К бикарбонатному раствору добавляли 6 н. HCl до pH 2, белый осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Получили 33,8 г (96%) кислоты (VII), т.пл. 169–172° С. *R*_f 0,90 (A), 0,29 (Г). ЯМР: 10,25, с (NH); 8,25, д (H5^A); 7,59, д (H3^A); 7,49, д (H5^C); 6,90, д (H3^C); 4,40, т (N^ACH₂); 4,27, т (N^CCH₂); 1,73, м (NCH₂CH₂); 0,84, т (CH₃).

Npc-Arc-NH(CH₂)₃N(CH₃)₂·HCl (VIII). К смеси 14,0 г (40 ммоль) соединения (VII) и 40 ммоль CDI (Ferak, ФРГ) прибавляли 20 мл абс. DMF при 20° С. Через 30 мин к раствору по каплям добавляли 14,0 г (137 ммоль) *N,N*-диметил-1,3-диаминопропана (Fluka, Швейцария) и реакционную смесь оставляли на 20 ч при 20° С. К раствору добавляли 0,5 л воды, осадок отделяли, растворяли в 150 мл этилацетата, раствор промывали водой, высушивали и добавляли 10 мл 4 н. раствора хлористого водорода в этаноле. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом и высушивали. Получили 11,5 г соединения (VIII). Раствор упаривали и остаток разделяли на колонке с сефадексом LH-20 и получали еще 3,1 г соединения (VIII), суммарный выход которого достиг 14,6 г (78%). Т.пл. 113–115° С. *R*_f 0,22 (A), 0,48 (Г). ЯМР: 10,40, с (N^{A,C}H); 8,25, м (H5^A+CONHCH₂); 7,70, д (H3^A); 7,31, д (H5^C); 6,98, д (H3^C); 4,43, т (N^ACH₂); 4,28, т (N^CCH₂); 2,98–3,30, м (CH₂CH₂CH₂); 2,77, с (N(CH₃)₂); 1,94, м (CH₂CH₂CH₂); 1,73, м (CH₂CH₃); 0,84, т, 0,86, т (N^{A,C}CH₂CH₂CH₃).

H-Arc-Arc-NH(CH₂)₃N(CH₃)₂·2HCl (IX). Раствор 8,5 г (18,1 ммоль) соединения (VIII) в смеси 70 мл этанола и 10 мл 6 н. HCl гидрировали над 2 г катализатора Адамса. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали и остаток хроматографировали на колонке с сефадексом LH-20. Получали 5,8 г (67%) соединения (VIII) в виде масла. *R*_f 0,37 (B). ЯМР: 10,40, м (H₃N); 10,16, м (CONH^C); 8,24, т (CONHCH₂); 7,28, д (H5^C); 7,19, д (H5^A); 7,13, д (H3^A); 6,98, д (H3^C); 4,29, м (N^{A,C}CH₂); 3,27, м (CH₂CH₂CH₂); 3,07, м (CH₂CH₂CH₂); 2,76, с (N(CH₃)₂); 1,92, м (CH₂CH₂CH₂); 1,68, м (CH₂CH₃); 0,82, т (CH₂CH₃).

H-Gly-Arc-Arc-NH(CH₂)₃N(CH₃)₂·2HCl (X). Смесь 1,0 г (5 ммоль) Z-Gly-OH и 5 ммоль CDI растворяли в 5 мл абс. DMF и через 5 мин прибавляли к раствору 2,4 г (5 ммоль) соединения (IX) в 10 мл абс. DMF. Смесь оставляли на 20 ч при 20° С, упаривали, остаток растворяли в метаноле и наносили на колонку с сефадексом LH-20. Фракции 35–39 упаривали, остаток растворяли в смеси 30 мл метанола и 2 мл 6 н. HCl и гидрировали в токе водорода над палладиевой чернью до прекращения выделения CO₂. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали, вещество очищали 2-кратным разделением на колонке с сефадексом LH-20 и лиофилизовали из воды. Получали 1,66 г (65%) соединения (X). *R*_f 0,04 (A), 0,24 (B). ЯМР: 9,86, с (CONH), 8,38, м (H₃N); 8,18, т (CONHCH₂); 7,25, м (H5); 6,96, м (H3); 4,23, м (NCH₂); 3,73, м (H₃NCH₂); 3,24, м (CH₂CH₂CH₂); 3,03, м (CH₂CH₂CH₂); 2,76, д (N(CH₃)₂); 1,87, м (CH₂CH₂CH₂); 1,61, м (CH₂CH₃); 0,79, т (CH₂CH₃).

Соединение (X) получали с выходом 88% по аналогичной методике из амина (IX) и Boc-Gly-OH, только снятие защитной группы проводили CF₃COOH (30 мин, 20° С).

Npc-Apc-Apc-NH(CH₂)₃N(CH₃)₂·HCl (XI). Раствор 5,0 г (10,7 ммоль) соединения (VIII) в 50 мл этанола и 5 мл 6 н. HCl гидрировали над 1 г катализатора Адамса. Катализатор отфильтровывали, к раствору прибавляли 5,6 мл триэтиламина и затем 20 ммоль раствора хлорангидрида (IV) в 20 мл бензола. Смесь оставляли при 20°С и 20 ч, упаривали, остаток растворяли в метаноле и наносили на колонку с сефадексом LH-20. Разделение проводили дважды. Фракции, содержащие соединение (XI), упаривали и лиофилизировали из воды. Получили 5,1 г (77%) соединения (XI), *R_f* 0,58 (В). ЯМР: 10,51, с (^АCONH^В); 10,08, с (^ВCONH^С); 8,30, д (H5^А); 8,27, м (CONHCH₂); 7,73, д (H3^А); 7,39, д (H5^В); 7,31, д (H5^С); 7,14, д (H3^В); 6,99, д (H3^С); 4,44, м (N^АCH₂); 4,29, м (N^{В+С}CH₂); 3,30, м (CH₂CH₂CH₂); 3,09, м (CH₂CH₂CH₂); 2,77, д (N(CH₃)₂); 1,92, м (CH₂CH₂CH₂); 1,77, м (N^АCH₂CH₂CH₃); 1,70, м (N^{В,С}CH₂CH₂CH₃); 0,84, м (CH₂CH₃).

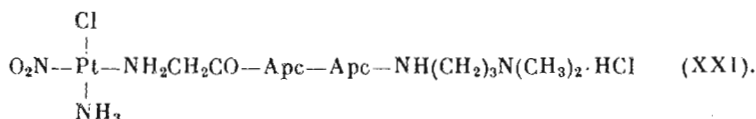
HCO-Apc-Apc-Apc-NH(CH₂)₃N(CH₃)₂·HCl (XII). Раствор 1,24 г (2 ммоль) соединения (XI) в 20 мл этанола и 1 мл 6 н. HCl гидрировали над 0,3 г катализатора Адамса. Катализатор отфильтровывали, к раствору прибавляли 0,9 мл триэтиламина, упаривали и к остатку прибавляли формилуксусный ангидрид, полученный из смеси 2,5 мл As₂O и 1,3 мл 99,5% HCOOH (2 ч, 55°С). Через 2 ч раствор упаривали, остаток растворяли в метаноле и наносили на колонку с сефадексом LH-20. Фракции, содержавшие соединение (XII), упаривали и лиофилизировали из воды. Получали 0,83 г (67%) соединения (XII), *R_f* 0,04 (А), 0,63 (В). ЯМР: 10,16, с (HCO); 9,98, с (^АCONH^В); 9,78, с (^ВCONH^С); 8,08, м (CONHCH₂); 7,18, м (H5); 6,98, д (H3^А); 6,88, м (H3^{В,С}); 4,24, м (NCH₂); 3,28, м (CH₂CH₂CH₂); 3,04, м (CH₂CH₂CH₂); 2,75, с (N(CH₃)₂); 1,95, м (CH₂CH₂CH₂); 1,67, м (CH₂CH₃); 0,82, м (CH₂CH₃).

H-Gly-Apc-Apc-Apc-NH(CH₂)₃N(CH₃)₂·HCl·CF₃COOH (XIII) получали из 3 ммоль соединения (XI) и 3 ммоль Boc-Gly-OH с выходом 51% по методике, аналогичной методике синтеза соединения (X) по схеме 1. *R_f* 0,03 (А), 0,48 (В). ЯМР: 9,85, м (CONH), 8,09, т (CONHCH₂); 7,23, м + 7,16, м (H5); 7,02, м + 6,88, м (H3); 4,24, м (NCH₂); 3,72, м (H₃NCH₂CO); 3,30, м (CH₂CH₂CH₂); 3,09, м (CH₂CH₂CH₂); 2,78, д (N(CH₃)₂); 1,90, м (CH₂CH₂CH₂); 1,68, м (CH₂CH₃); 0,82, м (CH₂CH₃).

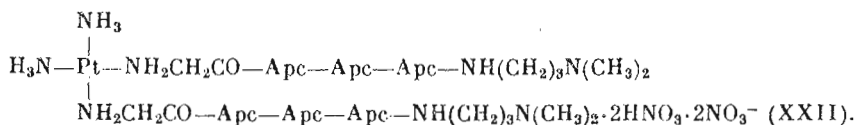
Ac-Pam-Gly-Apc-Apc-NH(CH₂)₃N(CH₃)₂·HCl (XIV) (схема 2). Смесь 0,8 г (2,3 ммоль) Ac-Pam-OH («Фармакон», Ленинград) и 2,3 ммоль CDI растворяли в 5 мл DMF и через 10 мин к раствору прибавляли 1,0 г (1,88 ммоль) дихлоргидрата соединения (X). Раствор оставляли на 48 ч при 20°С, упаривали и остаток очищали 2-кратным разделением на колонке с сефадексом LH-20 и лиофилизировали из воды. Получили 1,1 г (72%) соединения (XIV), *R_f* 0,06 (А), 0,53 (В). ЯМР: 10,06, с, 9,81, с, 9,68, с (CONH); 8,30, т (CONHCH₂CH₂); 8,14, м (CH₃CONH); 7,16, м (H5); 6,88, д (H3); 7,06, д, 6,60, д (Фенил); 4,21, м (NCH₂CH₂CH₃ + CHCH₂-Pam); 3,80, м (NHCH₂CO); 3,68, м (CH₂CH₂Cl); 3,26, м (CH₂CH₂CH₂); 2,85, м (CH₂CH₂CH₂ + CHCH₂-Pam); 2,70, м (N(CH₃)₂); 1,81, м (CH₂CH₂CH₂ + CH₃CO); 1,65, м (CH₂CH₃); 0,80, т (CH₂CH₃). Масс-спектр *m/z*: 789 (M-H)⁺. C₃₈H₅₆N₆O₅Cl₂.

Ac-Pam-Gly-Apc-Apc-NH(CH₂)₃N(CH₃)₂·HCl (XV) получили с выходом 0,14 г (70%) из 0,2 ммоль соединения (XIII) и 0,3 ммоль Ac-Pam-OH по методике, аналогичной методике синтеза соединения (XIV). *R_f* 0,68 (В). ЯМР: 10,05, с, 9,83, с, 9,80, с, 9,66, с (CONH); 8,31, т (CONHCH₂CH₂); 8,11, м (CH₃CONH); 7,18, м (H5); 6,90, м (H3); 7,06, д, 6,60, д (Фенил); 4,23, м (NCH₂CH₂CH₃ + CHCH₂-Pam); 3,80, м (NHCH₂CO); 3,66, м (CH₂CH₂Cl); 3,23, м (CH₂CH₂CH₂); 2,82, м (CH₂CH₂CH₂ + CHCH₂-Pam); 2,58, м (N(CH₃)₂); 1,82, м (CH₂CH₂CH₂ + CH₃CO); 1,68, м (CH₂CH₃); 0,80, т (CH₂CH₃).

0,49 г (0,84 ммоль) H-Gly-Apc-Apc-NH(CH₂)₃N(CN₃)₂·2HNO₃ (Xa), полученного из соединения (X) обработкой 2 экв. AgNO₃ и последующей очисткой продукта реакции на колонке с сефадексом LH-20, прибавляли к раствору, содержащему 3,6 ммоль нитрата *цис*-диамминдиакваплатины(II) в 30 мл воды. Полученный раствор нейтрализовали 1 н. NaOH до pH 6,0 и выдерживали 3 ч при 60° С, поддерживая pH 6,0 периодическим прибавлением 1 н. NaOH. Раствор упаривали, остаток обрабатывали 50 мл горячего метанола, осадок отфильтровывали, раствор упаривали до небольшого объема и наносили на колонку с сефадексом LH-20. Разделение проводили дважды. Фракции, содержавшие соединение (XX), упаривали и вещество лиофилизировали из воды. Получили 0,31 г (26%) соединения (XX). *R*_f 0,87 (A), 0,38 (B). ЯМР: 10,09, с, 9,81, с (CONH); 8,07, т (CONHCH₂); 7,21, д (H^{5A}); 7,14, д (H^{5C}); 6,88, д (H^{3A}); 6,83, д (H^{3C}); 4,24, м (NCH₂); 3,54, м (H₂NCH₂); 3,23, м (CH₂CH₂CH₂); 3,03, м (CH₂CH₂CH₂); 2,56, д (N(CH₃)₂); 1,86, м (CH₂CH₂CH₂); 1,66, м (CH₂CH₃); 0,82, м (CH₂CH₃). Найдено, %: С 38,66; Н 5,91; Pt 13,12. C₄₆H₈₂N₂₀O₁₈Pt. Вычислено, %: С 39,51; Н 5,91; Pt 13,9. Масс-спектр, *m/z*: 1210 (*M* - 2HNO₃ - NO₃)⁺.



Раствор 0,26 г (0,70 ммоль) калиевой соли Косса [41] и 0,06 г (0,70 ммоль) KNO₃ в 5 мл воды нагревали 30 мин при 100° С, а затем к охлажденному до 0° С раствору прибавляли 0,34 г (0,64 ммоль) соединения (X). После растворения выпавшего осадка (pH раствора 5) добавляли 1 н. NaOH до pH 8 и смесь выдерживали 2 ч при 0° С. Образовавшийся осадок отфильтровывали, растворяли в 5 мл DMF и осаждали 200 мл абс. этанола. Осадок растворяли в небольшом объеме DMF и наносили на колонку (2×115 см) с сефадексом LH-20 в DMF. Элюцию проводили DMF. Объем фракции 7 мл. Фракции 22–23 упаривали до небольшого объема и вещество осаждали абс. этанолом. Осадок отфильтровывали, промывали этанолом и эфиром. Получили 0,18 г (36%) соединения (XXI). *R*_f 0,04 (A), 0,51 (B). ЯМР: 10,09, с, 9,79, с (CONH); 8,02, т (CONHCH₂CH₂); 7,16, м (H^{5A,C}); 6,84, м (H^{3A,C}); 4,22, м (NCH₂); 3,52, м (H₂NCH₂); 3,20, м (CH₂CH₂CH₂); 2,27, с (N(CH₃)₂); 1,65, м (CH₂CH₃ + CH₂CH₂CH₂); 0,82, т (CH₂CH₃). Масс-спектр, *m/z*: 753 (*M* - HCl)⁺. C₂₃H₄₀N₆O₅ClPt.



К раствору 0,5 г (0,78 ммоль) соединения (XIII) в 5 мл воды при 40° С прибавляли раствор 50 мг AgNO₃ в 5 мл воды. Осадок AgCl отфильтровывали, к раствору H-Gly-Apc-Apc-Apc-NH(CH₂)₃N(CN₃)₂·2HNO₃ (XIIIa) прибавляли сначала 0,3 ммоль нитрата *цис*-диамминдиакваплатины(II) в 5 мл воды и 3 мл метанола, а затем 1 н. NaOH до pH 7,5. Реакционную смесь выдерживали 17 ч при 50° С, упаривали, остаток обрабатывали 20 мл горячего метанола, осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали до небольшого объема и наносили на колонку с сефадексом LH-20. Разделение проводили дважды. Фракции, содержавшие соединение (XXII), упаривали и вещество лиофилизировали из воды. Получили 0,12 г (24%) соединения (XXII). *R*_f 0,29 (B). ЯМР: 10,09, с, 9,87, с, 9,81,

c (CONH); 8,03, т (CONHCH₂); 7,23, м (H5^{A, B}); 7,17, д (H5^C); 7,02, д (H3^B); 6,85, м (H3^{A, C}); 4,26, м (NCH₂); 3,57, м (H₂NCH₂); 3,18, м (CH₂CH₂CH₂); 2,34, с (N(CH₃)₂); 1,86–1,50, м (CH₂CH₂CH₂+CH₂CH₃), 0,82, м (CH₂CH₃). Масс-спектр, *m/z*: 1446 (*M* – 4HNO₃)⁺. C₆₂H₁₀₀N₂₀O₈Pt.

Авторы глубоко признательны П. А. Чельцову и Л. В. Попову за полезные консультации и помощь в работе, а также Ю. А. Баранову за синтез нитрата *цис*-диамминдиакваплатины(II).

Выполнение этой работы частично финансировалось Научным советом по программе «Геном человека» и Научным советом по программе «Ген-направленные биологически активные вещества».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хорлин А. А., Гроховский С. Л., Жузе А. Л., Готтих Б. П. // Биорган. химия. 1982. Т. 8. № 10. С. 1358–1364.
2. Gursky G. V., Zasedatelev A. S., Zhuze A. L., Khorlin A. A., Grokhovsky S. L., Streltsov S. A., Surovaya A. N., Nikitin S. M., Krylov A. S., Petchinsky V. O., Mikhailov M. V., Beabedashvili R. S., Gottikh B. P. // Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1983. V. 47. P. 367–378.
3. Гроховский С. Л., Никитин С. М., Хорлин А. А., Жузе А. Л., Крылов А. С., Михайлов М. В., Заседаев А. С., Гурский Г. В., Готтих Б. П. // Механизмы биосинтеза антибиотиков. М.: Наука, 1986. С. 202–217.
4. Zimmer Ch., Wahnert U. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1986. V. 47. P. 31–112.
5. Dervan P. B. // Science. 1986. V. 232. P. 464–471.
6. Lown J. W. // Anti-Cancer Drug Design. 1988. V. 3. P. 25–40.
7. Warpehoski M. A., Hurley L. H. // Chem. Res. Toxicol. 1988. V. 1. P. 315–333.
8. Заседаев А. С., Жузе А. Л., Циммер К., Гроховский С. Л., Туманян В. Г., Гурский Г. В., Готтих Б. П. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 231. № 4. С. 1006–1009.
9. Gursky G. V., Tumanyan V. G., Zasedatelev A. S., Zhuze A. L., Grokhovsky S. L., Gottikh B. P. // Nucleic Acid – Protein Recognition/Ed. Vogel H. J. New York – San Francisco – London: Acad. Press, 1977. P. 189–217.
10. Гроховский С. Л., Жузе А. Л., Готтих Б. П. // Биорган. химия. 1978. Т. 4. № 8. С. 1078–1086.
11. Хорлин А. А., Гроховский С. Л., Жузе А. Л., Готтих Б. П. // Биорган. химия. 1982. Т. 8. № 8. С. 1063–1069.
12. Лейнсоо Т. А., Николаев В. А., Гроховский С. Л., Суровая А. Н., Сидорова Н. Ю., Стрельцов С. А., Заседаев А. С., Жузе А. Л., Гурский Г. В. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. С. 1616–1637.
13. Arcamone F., Penco S., Delle Monache F. // Gazz. chim. ital. 1969. V. 99. P. 620–631.
14. Arcamone F., Nicoletta V., Penco S., Redaelli S. // Gazz. chim. ital. 1969. V. 99. P. 632–640.
15. Chandra P., Götz A., Wacker A., Verini M. A., Casazza A. M., Fioretti A., Arcamone F., Ghione M. // FEBS Lett. 1972. V. 19. № 4. P. 327–330.
16. Bialer M., Yagen B., Mechoulam R., Becker Y. // J. Med. Chem. 1979. V. 22. № 11. P. 1296–1301.
17. Grehn L., Ragnarsson U., Eriksson B., Oberg B. // J. Med. Chem. 1983. V. 26. № 7. P. 1042–1049.
18. Debart F., Perigand C., Gosselin G., Mrani D., Rayner B., Le Ber P., Auclair C., Balzarini J., De Clercq E., Paoletti C., Imbach J.-L. // J. Med. Chem. 1989. V. 32. № 5. P. 1074–1083.
19. Schultz P. G., Dervan P. B. // J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. № 26. P. 7748–7750.
20. Baker B. F., Dervan P. B. // J. Amer. Chem. Soc. 1985. V. 107. P. 8266–8268.
21. Singer B. // Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 1975. V. 15. P. 219–284.
22. Lown J. W. // Molecular Aspects of Anticancer Drug Action/Eds Neidle S., Waring M. J. London: MacMillan, 1983. P. 283–314.
23. Sherman S. E., Lippard S. J. // Chem. Rev. 1987. V. 87. P. 1153–1181.
24. Власов В. В., Казаков С. А. // Биорган. химия. 1982. Т. 8. № 4. С. 499–506.
25. Arcamone F., Animati F., Barbieri B., Configliacchi E., D'Alessio R., Geroni C., Giuliani F. C., Lazzari E., Menozzi M., Penco S., Verini M. A. // J. Med. Chem. 1989. V. 32. P. 774–778.
26. Krowicki K., Balzarini J., De Clercq E., Newman R. A., Lown J. W. // J. Med. Chem. 1988. V. 31. P. 341–345.
27. Arcamone F., Drezzi P. G., Barbieri W., Nicoletta V., Penco S. // Gazz. chim. ital. 1967. V. 97. P. 1097–1109.
28. Zimmer Ch. // Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 1975. V. 15. P. 285–318.

29. Chandra P., Zunino F., Gotz A., Wacker A., Gericke D., Di-Marco A., Casazza A. M., Giuliani F. // *FEBS Lett.* 1972. V. 21. P. 154-158.
30. Fransson B., Grehn L., Ragnarsson U. // *J. Chromatogr.* 1983. V. 268. P. 347-351.
31. Глибин Е. Н., Цукерман Б. В., Гинабург О. Ф. // *Журн. орган. химии.* 1977. Т. 13. № 10. С. 2231-2232.
32. Krylov A. S., Zasedatelev A. V., Grokhovsky S. L., Zhuze A. L., Gursky G. V., Gottikh B. P. // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 6. P. 289-304.
33. Yoon C., Goodsell D., Pjura P., Kopka M. L., Dickerson R. E. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. P. 1376-1380.
34. Coll M., Frederick C. A., Wang A. H.-J. H., Rich A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1987. V. 84. № 23. P. 8385-8389.
35. Гроховский С. Л., Жузе А. Л., Готтих Б. П. // *Биоорган. химия.* 1975. Т. 1. № 11. С. 1616-1623.
36. Hartley J. A., Forrow S. M., Souhami R. L. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. № 12. P. 2985-2991.
37. Yang N.-C., Chang C.-W. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. P. 5250-5254.
38. Гроховский С. Л., Зубарев В. Е. // *Докл. АН СССР.* 1990. Т. 313. № 6. С. 1500-1504.
39. Halpern A. // *Uses of Synchrotron Radiation in Biology*/Ed. Stuhmann H. B. London: Acad. Press, 1982. P. 255-283.
40. Grokhovsky S. L., Zubarev V. E. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. № 2. P. 257-264.
41. Гринберг А. А., Кукушкин Ю. Н. // *Журн. неорган. химии.* 1958. Т. 3. № 6. С. 1312-1314.

Поступила в редакцию
18.VI.1991

S. L. GROKHOVSKY, B. P. GOTTIKH, A. L. ZHUZE

DNA BASE PAIR SEQUENCE SPECIFIC LIGANDS. IX. SYNTHESIS OF DISTAMYCIN A AND NETROPSIN ANALOGUES CONTAINING A SARCOLYSIN RESIDUE OR A PLATINUM(II) ATOM

*V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
Moscow*

In search for compounds capable of forming covalent bonds with DNA AT-pair clusters, distamycin A and netropsin analogues containing DL-sarcocollin or platinum(II) atom at the N-terminus of the molecule were synthesized, as well as bis-netropsin and bis-distamycin in which two netropsin- or distamycin-like fragments are bound via a *cis*-diammineplatinum(II) residue. It is shown that these substances can be used for the DNA selective cleavage.