



УДК 547.96:541.6

**БИС-ПРОИЗВОДНЫЕ ВАЛИНОМИЦИНА И ЭННИАТИНА В  
КАК КОМПЛЕКСОНЫ И ИОНОФОРЫ**

*Сулская Л. В., Балашова Т. А., Чумбуридзе Т. С.,  
Мельник Е. И., Михалева И. И., Иванов В. Т.,  
Обвинников Ю. А.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Осуществлен синтез бис-производных валиномицина и энниатина В, содержащих по два ковалентно связанных депептидных цикла. Методом КД, ЯМР-спектроскопии, солевой экстракции и исследованием на бислойных липидных мембранах показано, что у бис-валиномицина каждый цикл ведет себя как независимый не связывающий центр, уступающий по активности немодифицированному антибиотику.

Бис-энниатины образуют исключительно устойчивые комплексы типа «сэндвич», в которых ион располагается между двумя циклами. С помощью этих аналогов подтвержден «сэндвичевый» механизм действия антибиотиков энниатиновой группы.

Принципы функционирования макроциклических антибиотиков-ионофоров в мембранных системах были установлены вскоре после их открытия и сформулированы в монографии [1] и ряде обзоров [2—4].

Стимулирование ионной проницаемости мембран ионофорами основано на их способности избирательно связывать транспортируемый ион с образованием липофильных комплексов, легко внедряющихся в липидные зоны мембран. Однако детали молекулярного механизма действия ионофоров остаются неясными и требуют дальнейшего исследования.

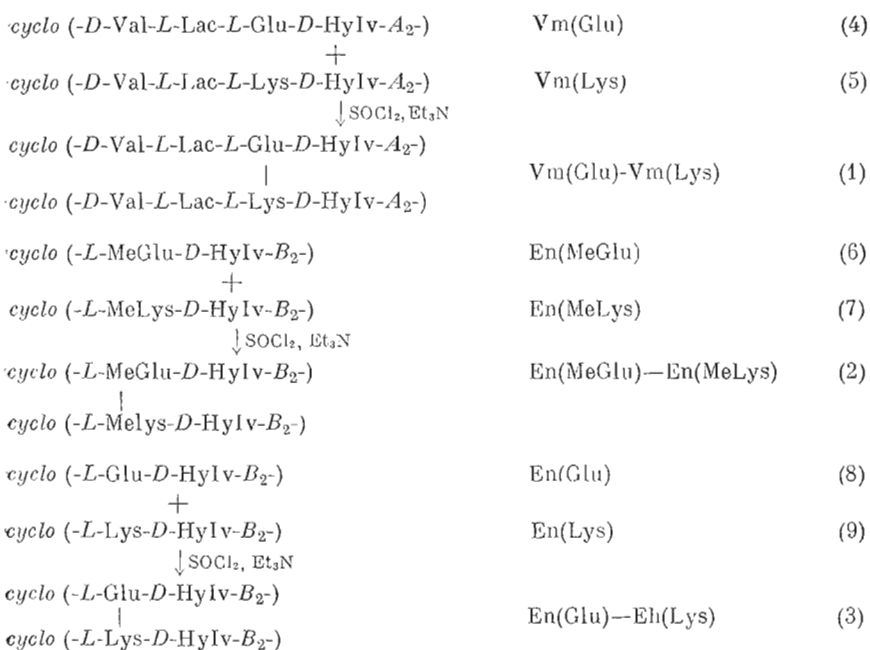
Прямое отношение к названной проблеме имеет недавно открытая возможность образования валиномицином и энниатинами не только эквимолярных комплексов с соотношением макроцикл : катион, равным 1 : 1, но и «сэндвичевых» комплексов с соотношением 2 : 1 и в некоторых случаях еще более сложных комплексов с соотношением 3 : 2 [5—7]. Возможное участие таких комплексов в трансмембранном переносе ионов рассматривается в работах [5, 7—9]. Настоящая работа посвящена синтезу и исследованию свойств бис-производных валиномицина (1) и энниатина В (2), (3), в которых два депептидных кольца соединены достаточно длинной цепью, т. е. созданы условия для образования «сэндвича» одной молекулой ионофора.

Соединения (1) — (3) были получены с выходом 25% хлорангидридной конденсацией ранее описанных [10] функциональных производных валиномицина и энниатина В, содержащих в боковой цепи карбоксильную

---

Кроме стандартных сокращений, рекомендуемых Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC — IUB, в работе приняты следующие сокращения: Vm — валиномицин, En — энниатин В, NuIV, Lac — соответственно  $\alpha$ -оксизовалериановая и молочная кислоты, Pth — фталоил-, Vz1NO<sub>2</sub> — *n*-нитробензил-

## С х е м а \*



\* A=D-Val-L-Lac-L-Val-D-HyIv.  
B=L-MeVal-D-HyIv.

(соединения (4), (6) и (8)) или аминную (соединения (5), (7) и (9)) группы (схема). Продукты реакции отделялись от исходных соединений гелефильтрацией через сефадекс LH-20; их однородность контролировалась тонкослойной хроматографией на силикагеле. Строение соединений (1) и (3) подтверждалось данными аминокислотного анализа (табл. 1), а соединения (3) — еще и данными спектров ЯМР.

Т а б л и ц а 1

Выходы и физико-химические характеристики бис-производных валиномицина и эниниатина В

Соединение	Выход, %	Аминокислотный состав			[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> , с 0,1 EtOH	R <sub>f</sub>
		Val	Glu	Lys		
(1)	23	10,0	1,1	1,0	+7,5	0,30
(2)	26	—	—	—	-23,5	0,65
(3)	30	—	1,0	1,0	-78,5	0,50

Полученные соединения исследовались в растворах и на модельных мембранных системах. Рассмотрим вначале свойства Vm(Glu) — Vm(Lys) (1). Ход титрования Vm(Glu)—Vm(Lys) хлористым калием в 96% водном эталоне контролировался методом КД (рис. 1, а). Устойчивость К<sup>+</sup>-комплексов Vm(Glu) — Vm(Lys) сравнительно невелика, поскольку в условиях титрования не наблюдается признаков «насыщения» комплексона катионом, т. е. выхода кривой титрования на плато (рис. 1, б). Однако количественное исследование процесса комплексообразования наталкивается здесь на значительные трудности, связанные со сложностью системы. Действительно, для бис-производных (I) необходимо учитывать возможность образования как эквимолярных комплексов (II), (III), (IV),

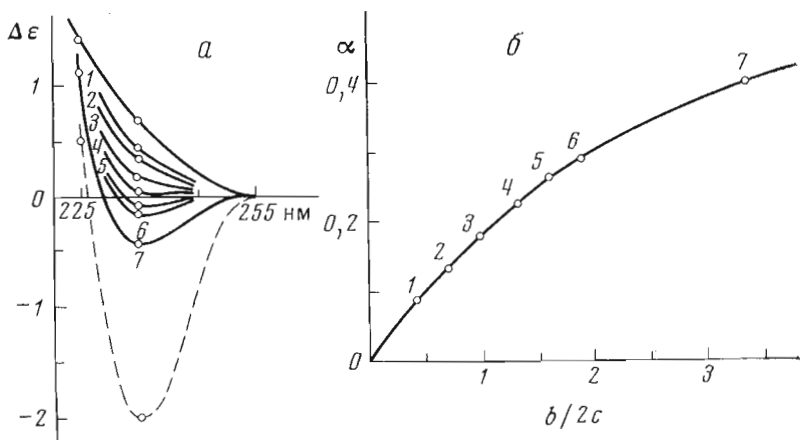


Рис. 1. Титрование Vm(Glu) — Vm(Lys) KCl в 96% водном этаноле (начальная концентрация депсипептида в растворе 0,8, конечная — 0,58 мМ): а — кривые КД (1—7) получены при последовательном добавлении  $7,2 \cdot 10^{-3}$  М раствора соли. Штриховой линией показана расчетная кривая КД для 100% комплексообразования (комплекс типа (V) на рис. 2); б — зависимость степени комплексообразования  $\alpha_{235}$  от отношения концентрации соли (b) и депсипептида (c) в растворе

так и двузарядного комплекса (V) (рис. 2); соответствующие константы устойчивости определяются следующими соотношениями:

$$K_1^{\text{II}} = \frac{[\text{II}]}{[\text{I}][\text{K}^+]} \quad (1); \quad K_1^{\text{III}} = \frac{[\text{III}]}{[\text{I}][\text{K}^+]} \quad (2); \quad K_1^{\text{IV}} = \frac{[\text{IV}]}{[\text{I}][\text{K}^+]} \quad (3);$$

$$K_1^{\text{эфф}} = K_1^{\text{II}} + K_1^{\text{III}} + K_1^{\text{IV}}; \quad (4)^*$$

$$K_2 = \frac{[\text{V}]}{([\text{II}] + [\text{III}] + [\text{IV}])[\text{K}^+]}. \quad (5)$$

При дальнейшем анализе данных титрования был сделан ряд допущений. Учитывая близость констант устойчивости комплексов «половин»

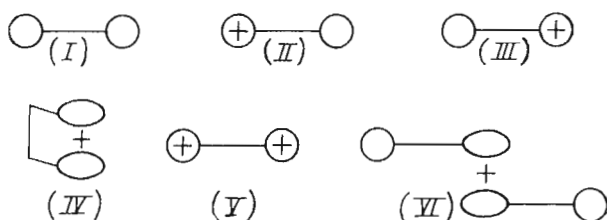


Рис. 2. Схематическое изображение бис-производных металлсвязывающих макроциклов (I) и их комплексов (II) — (VI)

Vm(Glu) — Vm(Lys) [11], мы приняли, что

$$K_1^{\text{II}} = K_1^{\text{III}}. \quad (6)$$

Далее, принимая во внимание длину и гибкость межциклической цепи, предположили, что связывание иона по типу (II) или (III) не сказывается на эффективности последующего связывания второго иона. В этом случае

$$K_2 = \frac{K_1^{\text{II}} K_1^{\text{III}}}{K_1^{\text{эфф}}}. \quad (7)$$

\* Учитывая большие разбавления, характерные для метода КД, образованием комплексов типа (VI) здесь можно пренебречь [6, 7].

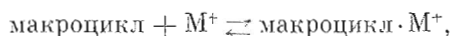
По той же причине естественно предположить аддитивность изменений кривых КД при переходе от комплексов (II) или (III) к комплексу (V):

$$\Delta\epsilon^V - \Delta\epsilon^I = (\Delta\epsilon^{II} - \Delta\epsilon^I) + (\Delta\epsilon^{III} - \Delta\epsilon^I). \quad (8)$$

В рассматриваемых ниже экстракционных опытах будет показано, что  $V_m(\text{Glu}) - V_m(\text{Lys})$  достаточно легко образует комплексы типа (V); «сандвичевых» же комплексов (IV) обнаружено не было. Отсюда последовало допущение

$$K_1^{IV} \ll K_1^{II, III}. \quad (9)$$

Перечисленные соображения позволяют свести рассмотрение данных титрования к простейшему случаю



где суммарная концентрация макроцикла равна удвоенной суммарной концентрации  $V_m(\text{Glu}) - V_m(\text{Lys})$ . Соответствующие формулы для расчета констант устойчивости  $K$ , в нашем случае равных  $K_1^{II}$ ,  $K_1^{III}$  и  $K_2$ , приведены в работах [12, 13].

Как уже отмечалось, при титровании не было достигнуто полного комплексообразования. В частности, это следует из систематического смещения («дрейфа») значений  $K$  (от 900 до 3400), рассчитанных для точек I—6 на рис. 1 при допущении о 100% комплексообразовании в последней (седьмой) точке титрования с  $\Delta\epsilon_{235} = 0,41$ . Судя по данным КД для  $V_m(\text{Lys})$  и  $V_m(\text{Glu})$ , приведенным в предыдущей работе [11], дихроичное поглощение двузарядного комплекса  $V_m(\text{Glu}) - V_m(\text{Lys})$  типа (V) должно находиться в пределах от  $-1,0$  до  $-2,0$ . При последнем значении практически не наблюдается «дрейфа» расчетных констант, что и послужило основанием для его выбора в качестве  $\Delta\epsilon_{235}^V$ . Найденная таким образом константа  $K_1^{II} = K_1^{III} = K_2$  составила  $370 \pm 50 \text{ M}^{-1}$ . Причины столь сильного падения устойчивости комплекса по сравнению с валиномицином, у которого в 96% водном этаноле  $K = 5,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  [12, 14], не совсем ясны. Определенную роль, по-видимому, играет резкое увеличение объема и массы боковой цепи. Подобное явление, хотя и не столь ярко выраженное (снижение констант устойчивости на один порядок), наблюдалось при замене остатков валина в молекуле валиномицина на остатки  $\text{Glu}(\text{BzINO}_2)$  или  $\text{Lys}(\text{Pth})$  [11].

Результаты исследования  $V_m(\text{Glu}) - V_m(\text{Lys})$  (1) и взятого для сравнения  $\text{cyclo}[D\text{-Val-L-Lac-L-Lys}(\text{Pth})\text{-D-HyIv-A}_2\text{-}]$  (сокращенно  $V_m(\text{LysPth})$  (10)) в двухфазной системе — простейшей модели мембраны — показывают (табл. 2), что для обоих веществ в весьма широком диапазоне концентрации соли в воде наблюдается качественная (при расчете на число ионсвязывающих центров) экстракция пикрата калия в хлористый метилен, т. е. оба ионсвязывающих центра  $V_m(\text{Glu}) - V_m(\text{Lys})$  способны солюбилизовать в неполярной фазе ион калия с эффективностью, не

Таблица 2

Экстракция пикрата калия из воды в хлористый метилен, содержащий  $10^{-4}$  моль ионофора

Соединение	Концентрация пикрат-аниона в хлористом метилеене, $\text{M} \cdot 10^{-4}$	
	1 M KCl	$5 \cdot 10^{-4}$ M KCl
(10) $V_m(\text{LysPth})$	1,04	1,05
(1) $V_m(\text{Glu}) - V_m(\text{Lys})$	2,01	2,08
(2) $\text{En}(\text{MeGlu}) - \text{En}(\text{MeLys})$	0,99	—
(3) $\text{En}(\text{Glu}) - \text{En}(\text{Lys})$	0,10	—

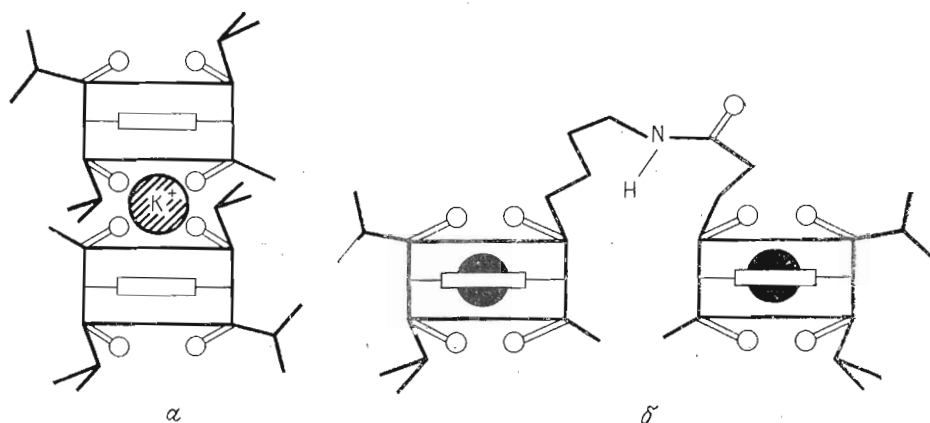


Рис. 3. Схематическое изображение комплексов валиномицина с соотношением макроцикл — ион, равным 2 : 1 (а), и дивалентного комплекса Vm(Glu)—Vm(Lys) (б)

отличимой в условиях опыта от эффективности действия ближайшего аналога с одним ионсвязывающим центром. При этом даже при малых концентрациях соли не наблюдается снижения соотношения [пикрат] / [Vm(Glu)—Vm(Lys)], что могло бы свидетельствовать о смещении равновесия в сторону комплексов типа (V). На первый взгляд этот факт представляется неожиданным в свете способности валиномицина образовывать при недостатке соли «сэндвичевый» комплекс, изображенный на рис. 3, а [7, 9]. Однако анализ молекулярных моделей Vm(Glu)—Vm(Lys) показывает, что аналогичная укладка двух валиномициновых колец в «браслетной» (или «цилиндрической») конформации (см. [9]) для него стерически затруднена. Например, оказывается невозможным достичь такого расположения колец, чтобы связанный ион взаимодействовал с карбоксильными группами, расположенными на стерически наименее затрудненных «лактильных» торцах «цилиндров», где находятся метильные группы остатков молочной кислоты (нижние торцы на рис. 3, б).

Бис-валиномицин (1) исследовался также на бислойных липидных мембранах. Зависимость удельной проводимости бислойных мембран от его концентрации в омывающих водных растворах носит линейный характер (рис. 4), что говорит о возможном участии в переносе ионов  $K^+$  комплексов типа (II) — (V). Однако, как указывалось выше, комплексы типа (IV) для Vm(Glu)—Vm(Lys) не образуются и в транспорте ионов  $K^+$ , по-видимому, участвуют комплексы типа (II), (III) и (или) (V). Более детально Vm(Glu)—Vm(Lys) на бислоях не исследовался из-за сравнительно низкой эффективности его действия (как видно из рис. 4, индуцируемые им проводимости на  $\sim 4$  порядка ниже, чем у валиномицина).

Последующее обсуждение посвящено бис-производным энциатина В: En(MeGlu)—En(MeLys) (2) и его ди-N-дезметильному аналогу En(Glu)—En(Lys) (3). Судя по данным [1, 6, 12], N-дезметильные аналоги энциатина В близки природному антибиотику по конформационным и металлсвязывающим свойствам, но менее липофильны и поэтому уступают энциатину В по способности внедряться в мембраны и переносить через них ионы щелочных металлов. Учитывая это, мы ограничились исследованием En(MeGlu)—En(MeLys) в мембранных системах; в растворах же изучался En(Glu)—En(Lys).

В ходе исследования спектров ЯМР En(Glu)—En(Lys) (см. ниже) выяснилось присутствие значительных количеств конформеров с *цис*-конфигурацией N-метиламидных связей — явление, отмеченное ранее в ряду диастереомеров энциатина В [13], но до этого не известное для аналогов энциатина В с природным *LDLDD*-набором конфигураций амино- и оксикислотных остатков. Поэтому для облегчения интерпретации

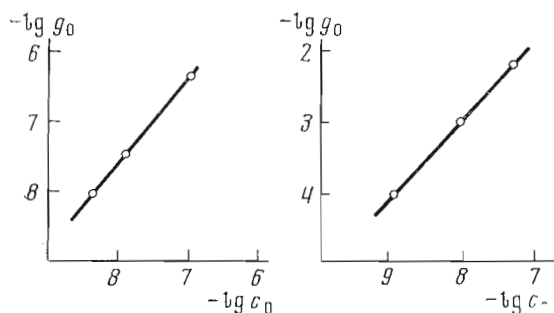


Рис. 4. Зависимость проводимости ( $\text{Oм}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ ) бислойных мембран от концентрации  $V_m(\text{Glu})-V_m(\text{Lys})$  (а) и  $V_m$  (б)

спектров  $\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})$  нами были изучены также спектры ЯМР синтезированных ранее [11] соединений (7), (9), (11) — (14), моделирующих «половины» бис-производных энниатина В (табл. 3 и 4):

<i>cyclo</i> [-L-Glu(BzlNO <sub>2</sub> )-D-HyIv-B <sub>2</sub> -]	$\text{En}(\text{GluBzlNO}_2)$	(11)
<i>cyclo</i> [-L-MeGlu(BzlNO <sub>2</sub> )-D-HyIv-B <sub>2</sub> -]	$\text{En}(\text{MeGluBzlNO}_2)$	(12)
<i>cyclo</i> [-L-Lys(Pth)-D-HyIv-B <sub>2</sub> -]	$\text{En}(\text{LysPth})$	(13)
<i>cyclo</i> [-L-MeLys(Pth)-D-HyIv-B <sub>2</sub> -]	$\text{En}(\text{MeLysPth})$	(14)

Все спектры имеют сложный вид и состоят из большого числа перекрывающихся сигналов (например, рис. 5). Химические сдвиги и константы спин-спинового взаимодействия (в тех случаях, когда их удалось измерить) имеют обычные значения, характерные для соответствующих модельных соединений, и не позволяют сделать каких-либо выводов о строении конформеров, участвующих в равновесии. Важным свойством всех соединений (кроме (14)) является большее, чем можно было бы ожидать исходя из структурной формулы, число сигналов в спектре. Наиболее четко эта особенность прослеживается в области N-метильных сигналов, анализ которой приводит к заключению об участии в равновесии двух основных форм с соотношением от 5 : 5 до 7 : 3, разделенных достаточно высоким энергетическим барьером. При нагревании растворов до 60—80° область N—CH<sub>3</sub> упрощается, давая, как и следовало ожидать, по два сигнала равной интенсивности в случае  $\text{En}(\text{GluBzlNO}_2)$ ,  $\text{En}(\text{LysPth})$  и  $\text{En}(\text{Lys})$  (см. вставку на рис. 5) и по три сигнала в случае  $\text{En}(\text{MeGluBzlNO}_2)$  и  $\text{En}(\text{MeLys})$ . Температуры коалесценции (40—60°) типичны для *цис-транс*-равновесия N-метилированных пептидов (см., например, [13]), которое, как мы считаем, имеет место и в исследованном ряду соединений. Таким образом, даже такое незначительное изменение структуры энниатина В, как модификация одной боковой цепи, приводит к существенной конформационной перестройке 18-членного циклического остова и появлению значительных количеств форм с *цис*-конфигурацией одной или более N-метиламидных связей; удаление одной N-метильной группы не сказывается на проявлении эффекта. Этот результат, достаточно неожиданный для энниатинового ряда,шний раз подчеркивает неоднократно отмечавшуюся [7—9, 15, 16] легкость реализации *цис*-конфигурации третичных амидных связей в циклопептидах.

В свете изложенного понятны причины чрезвычайной сложности спектров  $\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})$  при 30° во всех исследованных растворителях (табл. 5, рис. 6) и их упрощение при нагревании растворов (см. вставку на рис. 6). Здесь также не вызывает сомнения присутствие конформеров по связям CO—NMe. В хлороформе, смеси  $\text{CDCl}_3-\text{CD}_3\text{CN}$  (1 : 1) и ацетонитриле удается проследить три медленно (в шкале частот ЯМР) конвертирующие формы с соотношением 45 : 40 : 15, в метаноле — две формы с соотношением  $\approx 50 : 50$ .

Химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) протонов En(GluBzIINO<sub>2</sub>) и En(MeGluBzIINO<sub>2</sub>)

Соединение	Растворитель (30°)	Концентрация, М. 10 <sup>-2</sup>	C-CH <sub>3</sub> MeVal, HuIV	C <sup><math>\beta</math></sup> H MeVal, HuIV	C-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -C Glu, MeGlu	N-CH <sub>3</sub> MeVal, MeGlu	C $\alpha$ H MeVal, HuIV, Glu, MeGlu	CH-O	CH <sub>2</sub> -C(CH <sub>2</sub> ) BzI(NO <sub>2</sub> )	CH-C(NO <sub>2</sub> ) BzI(NO <sub>2</sub> )	NH Glu
(11)	CCl <sub>4</sub>	7,3	0,8-1,2	2,0-2,5	2,91 } 3,16 } 1:1* (55%)**	3,9-5,3	5,20	6,99	7,35 (55%)**	8,8	
(12)	CDCl <sub>3</sub>	9,2	0,8-1,2	2,0-2,6	2,72 } 3,05 } 1:1* (45%)**	3,8-5,5	5,25	7,50	7,46 (45%)**	---	
					2,82 } 2,95 } 1:1:1* (55%)**						
					3,17 } 2,95 } 1:1:1* (45%)**						
					3,30 }						

\* Указано соотношение интенсивностей площадей.

\*\* Численность форм.

Химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) и константы спин-спинового взаимодействия ( $J$ , Гц; в скобках) протонов En(Lys), En(MeLys), En(LysPth), En(MeLys) и En(MeLysPth)

Соединение	Растворитель ( $30^\circ$ )	Концептрация, М·10 <sup>-2</sup>	C-CH <sub>3</sub> MeVal, HuIV	C <sup><math>\beta</math></sup> H MeVal, HuIV	C-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -C Lys, MeLys	N-CH <sub>2</sub> Lys, MeLys	N-CH <sub>2</sub> MeVal, MeLys	C <sup><math>\alpha</math></sup> H MeVal, HuIV, Lys, MeLys	NH <sub>2</sub> Lys, MeLys	NH Lys	CH-CH Pht
(9)	CDCl <sub>3</sub>	3,0	0,8-1,3	4,4-2,5	2,70	2,83 2,95 3,06 3,18	1:1:1:1*	3,86; 4,0-5,4	1,64	7,0-7,4	—
(13)	CDCl <sub>3</sub>	7,7	0,7-1,2	4,2-2,5	3,68 (6,7)	2,82 2,94 3,05 3,18	1:1:1:1*	3,94(9,3); 4,17(11,5) 4,44(Lys); 4,7-5,2 5,28(9,8)	—	6,97(8,5) 7,41(10,7)	7,6-7,9
(7)	CCl <sub>4</sub>	7,5	0,7-1,2	4,2-2,3	3,56 (7,0)	2,77 3,10 2,67 3,00	1:1*(70%)** 1:1*(30%)**	4,10; 4,34(Lys) 4,6-5,3; 5,18(9,2)	—	6,69(~8) 7,20	7,7
(7)	CDCl <sub>3</sub>	8,2	0,7-1,2	4,3-2,5	3,03 2,84 2,92 3,04 3,04 3,14 3,25	Уширенные сигналы различной интенсивности	Уширенные сигналы различной интенсивности	3,86(6,0); 4,31(MeLys) 4,72(2,3)	***	—	—
(14)	CDCl <sub>3</sub>	7,6	0,8-1,4	4,2-2,4	3,69 (6,8)	3,11 3,11 3,17	1:1:1*	4,45(7,3; MeLys) 4,52(10,4) 4,94(9,1) 4,95(10,3) 5,10(8,6) 5,25(8,6)	***	—	7,7-7,9

\* См. табл. 3.

\*\* См. табл. 3.

\*\*\* Положение сигналов не определялось.



Химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) и константы спин-спинового взаимодействия ( $^3J$ , Гц) протонов En(Glu)—En(Lys)

Растворитель (30°)	Концентрация, м. 10 <sup>-2</sup>	C—CH <sub>3</sub>		C <sup>β</sup> H		C—(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> —C		C <sup>β</sup> H <sub>2</sub> , C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub>		N—CH <sub>2</sub>		C <sup>α</sup> H		α—NH		ε—NH	
		MeVal, HuIV	MeVal, HuIV	Lys	Lys	MeVal, HuIV	Glu	MeVal	Lys	MeVal, HuIV, Glu, Lys	Lys, Glu	σ*	<sup>3</sup> J (HN—CH)	σ*	<sup>3</sup> J (HN—CH)	σ*	<sup>3</sup> J (HN—CH)
CDCl <sub>3</sub>	5,0	0,8—4,3		4,4—2,6		2,78; 2,82 2,91; 2,94 3,09; 3,14 3,16		3,9—5,6		7,01 (2,5) 7,4—7,8	7,9	6,07 (4,5)	10,9	6,07 (4,5)			
CDCl <sub>3</sub> —CD <sub>3</sub> CN (1:1)	4,6	0,8—4,2		4,2—2,5		2,79; 2,98 3,06; 3,15		4,0—5,4		6,75 6,97 (2,3) 6,98 7,15 (2,5) 7,47 7,57 (0,0)	8,2 7,9 8,7 7,8 ≥8	6,36 (3,0) 6,48 (7,0)	11,0	6,36 (3,0) 6,48 (7,0)			
CDCl <sub>3</sub> —CD <sub>3</sub> CN (4:1) + 1 экв. KSCN	4,5	0,8—4,2		4,2—2,5		3,22		4,0—5,2		8,43 8,57	**	7,50	**	7,50			
CD <sub>3</sub> CN	4,0	0,7—4,2		4,2—2,4		2,75 3,02 3,04 3,14		4,0—5,4		6,95 (0,7) 6,99 (4,8) 7,14 (1,2) 7,48 (2,0) 7,51 (0,0) 7,54 (0,0)	7,8 8,8 8,1 7,7 9,9 11,2	6,3—6,7	**	6,3—6,7			
CDCl <sub>3</sub> —CD <sub>3</sub> O (15:1)	4,5	0,8—4,3		4,3—2,6		2,77; 2,89 2,93; 3,03 3,10; 3,13		3,9—5,3		7,06 7,4—7,7	~9	6,49 7,47	**	6,49 7,47			
CD <sub>3</sub> OH	3,5	0,8—4,3		4,3—2,5		2,83; 3,08 3,14; 3,22		—		7,5—8,0	**	7,5—8,0	**	7,5—8,0			
CD <sub>3</sub> OH + 1 экв. KSCN	3,4	—		—		3,27		—		8,34 8,65	7,5 7,1	7,95	**	7,95			

\* В скобках приведены температурные зависимости химических сдвигов ( $\Delta\delta/\Delta t$ ) 10°, м. д./град.

\*\* Сигналы уширены.

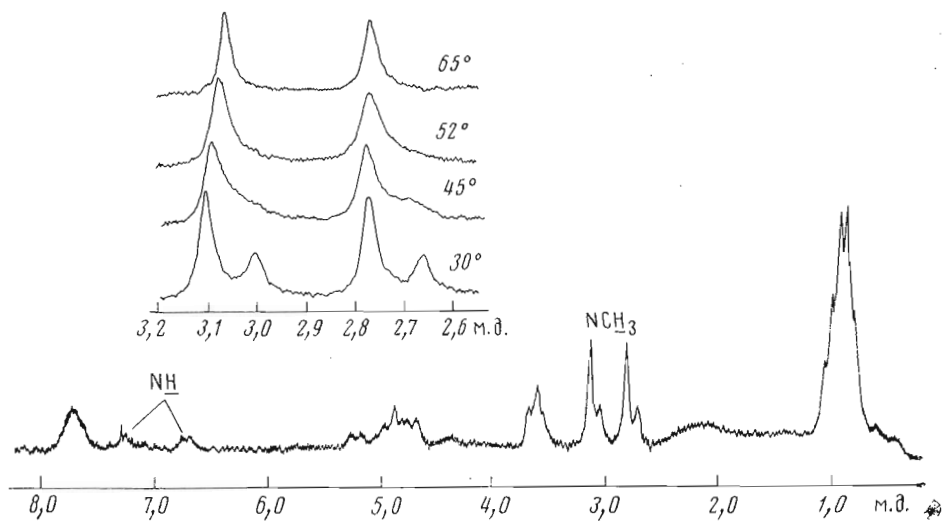


Рис. 5. Спектр ЯМР En(Lys) в  $\text{CDCl}_3$  при  $30^\circ$ . На вставке показана область сигналов  $\text{N}-\text{CH}_3$  при нагревании раствора до  $65^\circ$

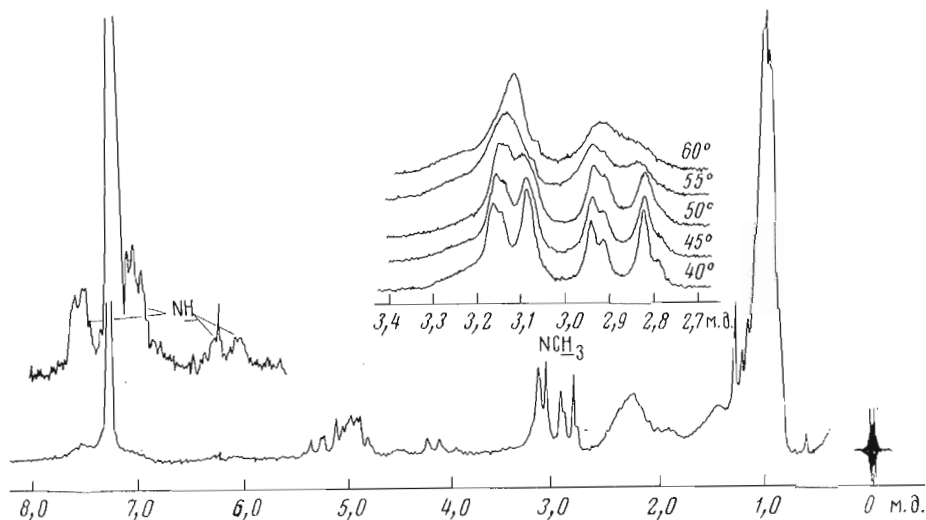


Рис. 6. Спектр ЯМР En(Glu)-En(Lys) в  $\text{CDCl}_3$  при  $30^\circ$ . На вставке показана область сигналов  $\text{N}-\text{CH}_3$  при различных температурах

Протоны пептидных групп  $\alpha\text{-NH}$  (Glu, Lys) значительно медленнее, чем протоны амидных групп  $\varepsilon\text{-NH}$ (Lys), обмениваются на дейтерий в смеси  $\text{CDCl}_3-\text{CD}_3\text{OD}$ , 10 : 1 (табл. 6), а их химические сдвиги слабее зависят от температуры в  $\text{CDCl}_3-\text{CD}_3\text{CN}$ , 1 : 1 (табл. 5); низкие значения  $\Delta\delta/\Delta T$  протонов  $\alpha\text{-NH}$  (Glu, Lys) сохраняются и в  $\text{CD}_3\text{CN}$ . Как обычно, мы объясняем указанные свойства групп  $\alpha\text{-NH}$  (Glu, Lys) их участием во внутримолекулярных водородных связях  $\text{NH}\dots\text{OC}$ . Из них наиболее вероятны внутрициклические связи типа  $4 \rightarrow 1$ , замыкающие 10-членные циклы (рис. 7, а), и межциклические связи, расположенные на «цилиндрической поверхности» конформации, показанной на рис. 7, б и аналогичной предложенной Хассалом для бис-серратамолида [17]. Оба типа структур возможны как с полностью *транс*-набором конфигураций амидных связей, так и с частью из них в *цис*-конфигурации. Выбор между ними на основании спектров ЯМР сделать не удается.

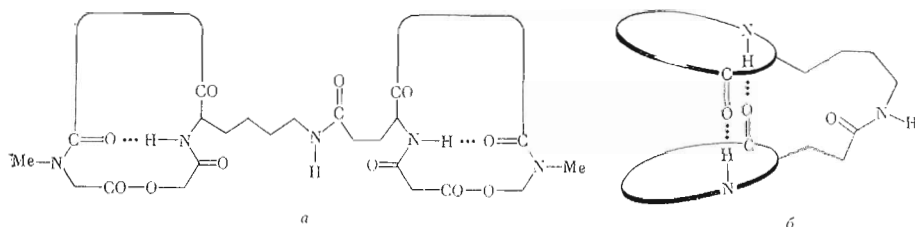


Рис. 7. Возможные положения внутримолекулярных водородных связей  $\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})$

При титровании  $\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})$  роданистым калием в  $\text{CDCl}_3-\text{CD}_3\text{CN}$  (1 : 1) (рис. 8) или  $\text{CD}_3\text{OH}$  (рис. 9) у части сигналов, по-видимому относящейся к конформерам с *цис*-N-метиламидными связями, не меняется положение, но убывает интенсивность. Другие же сигналы смещаются с одновременным ростом интенсивности; мы относим их к полностью *транс*-конформерам, находящимся в быстром равновесии с вновь образующимися комплексами. Характер кривых титрования, измеренных до соотношения комплексон : катион, равного 1 : 1 (рис. 10), свидетельствует о том, что в  $\text{CD}_3\text{OH}$  комплекс имеет форму  $[\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})]\cdot\text{K}^+$ , т. е. его следует отнести к типу (II), (III) или (IV) (рис. 2). В  $\text{CDCl}_3-\text{CD}_3\text{CN}$  (1 : 1), кроме того, присутствует еще комплекс состава  $[\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})]_2\cdot\text{K}^+$  (тип (IV)). При дальнейшем добавлении соли наблюдается выпадение осадка — по-видимому, в результате образования плохо растворимого комплекса  $[\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})]\cdot(\text{K}^+)_2$  (тип (V)).

Число сигналов в спектре комплекса  $[\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})]\cdot\text{K}^+$  отвечает присутствию только одного конформера из трех в  $\text{CDCl}_3-\text{CD}_3\text{CN}$  (1 : 1) или двух в  $\text{CD}_3\text{OH}$ , различающихся конфигурацией N-метиламидных связей. Химические сдвиги всех четырех, строго говоря неэквивалентных, N-метильных групп в этой форме практически совпадают, что говорит о присутствии только *транс*- или только *цис*-амидных связей в циклах. Второй вариант крайне маловероятен, в то время как первый хорошо согласуется с реализацией энергетически выгодной  $C_3$ -симметричной конформации — так называемая конформация P [6] — обоих 18-членных циклов  $\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})$ , характерной для энциатиновых комплексов. Существенно также, что химические сдвиги комплекса  $[\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})]\cdot\text{K}^+$  в  $\text{CDCl}_3-\text{CH}_3\text{CN}$ , 1 : 1 (3,22 м. д.) и в  $\text{CD}_3\text{OH}$  (3,27 м. д.) весьма близки соответствующим значениям для  $\text{K}^+$ -комплексов энциатина В — 3,24 и 3,29 м. д. [6]. Что касается выбора между структурами типа (II), (III) и (IV) (рис. 2), то мы отдаем предпочтение последнему типу на том основании, что в структурах типа (II) и (III) цикл, не участвующий в связывании иона, должен был бы сохранять существенную долю *цис*-конформеров с их характерными спектральными проявлениями. Ион в комплексе типа (IV) может взаимодействовать с шестью амидными, шестью сложноэфирными или тремя амидными и тремя сложноэфирными карбонильными группами. По стерическим соображениям наиболее выгоден первый вариант; в случае

Таблица 6

Время дейтерообмена ( $\tau$ ) NH-протонов  $\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})$  (соединения (3))

Растворитель (30° С)	Концентрация, $\text{M}\cdot 10^{-2}$	$\delta$ , м. д.	$\tau_{1/2}$
$\text{CDCl}_3 : \text{CD}_3\text{OH}$ (15 : 1)	4,5	6,49	<10 мин
		7,17	<10 мин
		7,06	2 ч
		7,4—7,7	>2 ч

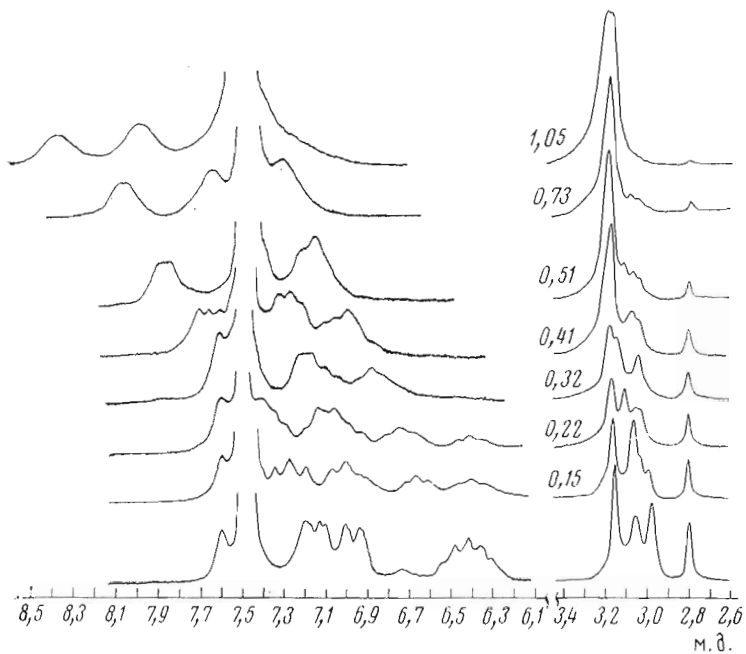


Рис. 8. Область сигналов  $N-CH_3$  и  $NH$   $En(Glu)-En(Lys)$  в смеси  $CDCl_3-CDCN$  (1 : 1) при различных молярных соотношениях депептид —  $KNCS$

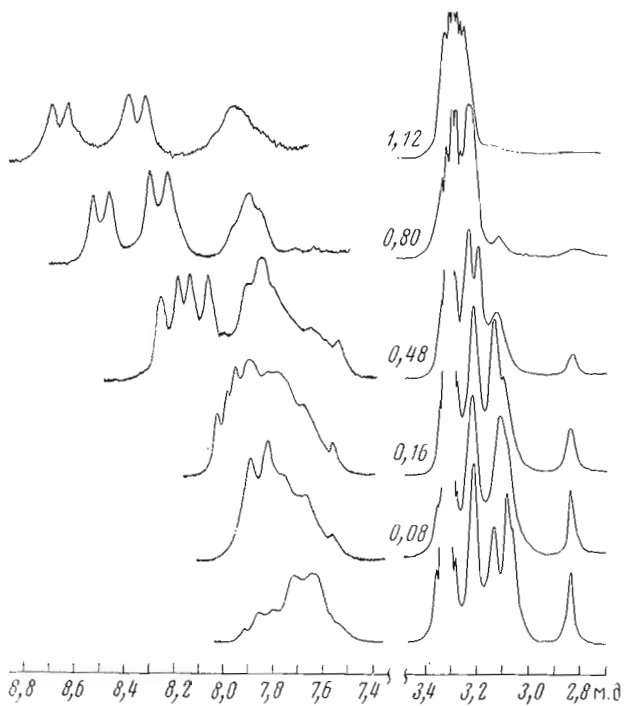


Рис. 9. Область сигналов  $N-CH_3$  и  $NH$   $En(Glu)-En(Lys)$  в  $CD_3OH$  при различных молярных соотношениях депептид —  $KNCS$

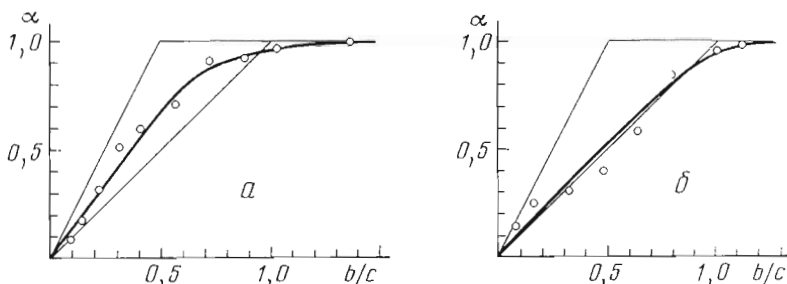
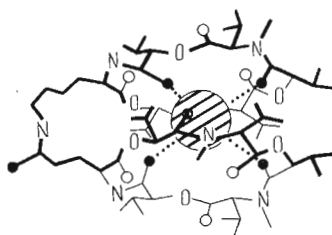


Рис. 10. Кривые титрования  $\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})$  роданистым калием в  $\text{CDCl}_3-\text{CD}_3\text{CN}$  (1 : 1) (а) и в  $\text{CD}_3\text{OH}$  (б). Определение  $\alpha$  см. «Экспер. часть»

эниатина В предпочтительность координации амидов в «сэндвиче» была подтверждена экспериментально [6]. На рис. 11 показана конформация комплекса  $[\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})]\cdot\text{K}^+$ , удовлетворяющая всем приведенным данным.

Комплексообразование  $\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})$  исследовалось также методом КД. Результаты титрования хлористым калием (рис. 12) показывают, что при постепенном добавлении соли вначале падает интенсивность отрицательного эффекта Коттона при  $\sim 230$  нм, а при больших избытках соли в этой же спектральной области возникает более слабый положительный

Рис. 11. Предполагаемая структура «сэндвичевого» комплекса  $\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})\cdot\text{K}^+$



эффект. Коротковолновая область характеризуется интенсивным отрицательным дихроичным поглощением комплекса. Подобная картина, неоднократно наблюдавшаяся в ряду эниатинов и их аналогов, отражает конформационную перестройку (так называемый  $N \rightarrow P$ -переход), сопровождающую образование комплекса [1, 6, 11, 13]. При анализе полученных данных мы можем воспользоваться допущениями (6) — (8), сформулированными при обсуждении результатов титрования  $\text{Vm}(\text{Glu})-\text{Vm}(\text{Lys})$ . Однако допущение (9) — о низкой устойчивости «сэндвичевых» комплексов типа (IV) — для  $\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})$  неприменимо, как следует из рассмотренных выше спектров ЯМР. Напротив, в равновесной смеси  $(\text{II}) \rightleftharpoons (\text{III}) \rightleftharpoons (\text{IV})$  доминируют комплексы типа (IV), в которых оба депептидных цикла имеют конформацию  $P$ . При исследовании эниатина В было показано, что вклад каждого цикла в таких «сэндвичах» в наблюдаемую кривую КД близок кривой КД эквимольного комплекса [6]. На основании изложенного мы принимаем в качестве первого приближения

$$\Delta\epsilon^{\text{II, III, IV}} = \Delta\epsilon^{\text{IV}} = \Delta\epsilon^{\text{V}}, \quad (10)$$

где  $\Delta\epsilon^{\text{II, III, IV}}$ ,  $\Delta\epsilon^{\text{IV}}$  и  $\Delta\epsilon^{\text{V}}$  — кривые КД равновесной смеси однозарядных комплексов  $\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})$ , его «сэндвичевого» комплекса (IV) и двузарядного комплекса (V). Условие (10) позволяет определять степень комплексообразования ( $\alpha$ ) при небольших избытках соли ( $b/c$ ), когда концентрация двузарядного комплекса невелика, по обычному уравнению

$$\alpha = \frac{\Delta\Delta\epsilon}{\Delta\Delta\epsilon_{\text{макс}}}, \quad (11)$$

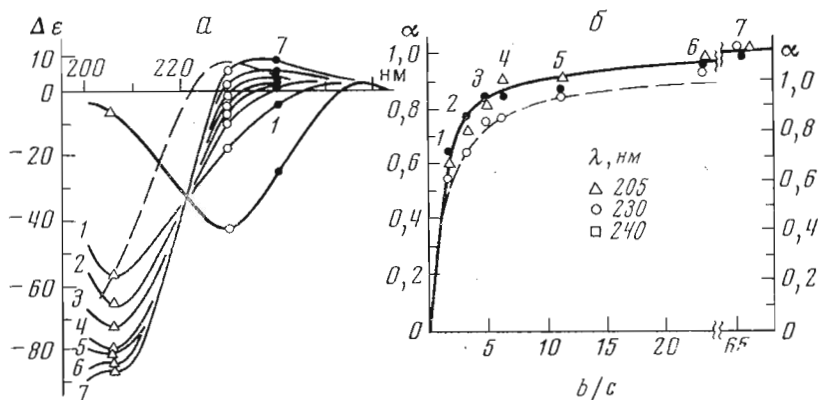


Рис. 12. Титрование En(Glu)—En(Lys) KCl в 96% водном этаноле (начальная концентрация депсипептида 0,12, конечная—0,06 мМ): а — кривые КД (1—7) получены при последовательном добавлении  $7,2 \cdot 10^{-3}$  М раствора соли; пунктиром показана кривая КД в 96% водном этаноле, содержащем  $5 \cdot 10^{-2}$  М NaClO<sub>4</sub>; б — зависимость от  $b/c$  (обозначения см. подпись к рис. 1). Пунктиром показана уточненная кривая титрования, рассчитанная из  $\Delta\epsilon_{230}$  (правая шкала  $\alpha$ )

где  $\Delta\Delta\epsilon = \Delta\epsilon_{\text{набл}} - \Delta\epsilon^I$  — изменение дихроичного поглощения при переходе от свободного депсипептида ( $\Delta\epsilon^I$ ) к его раствору, содержащему данное количество соли ( $\Delta\epsilon_{\text{набл}}$ );  $\Delta\Delta\epsilon_{\text{макс}} = \Delta\epsilon_{\text{макс}} - \Delta\epsilon^I = \Delta\epsilon^V - \Delta\epsilon^I$  — изменение дихроичного поглощения при переходе к раствору, содержащему максимальное количество соли ( $\Delta\epsilon_{\text{макс}}$ ), т. е. при образовании двузарядного комплекса (V) ( $\Delta\epsilon^V$ ). Кривая титрования, рассчитанная таким образом, показана сплошной линией на рис. 12, б. При определении константы  $K_1^{\text{эфф}}$  по известным формулам [12, 13] мы пользовались значениями  $\alpha$ , полученными из первых трех точек титрования, поскольку при больших концентрациях соли в растворе присутствует значительная доля двузарядного комплекса. Характер кривых КД позволил провести расчет для трех существенно различных длин волн — 205, 230 и 240 нм (см. рис. 12). Оказалось, что при таком расчете для всех длин волн наблюдается значительный «дрейф»  $K_1^{\text{эфф}}$  (от  $\sim 14\,000$  до  $\sim 9000$  М<sup>-1</sup>), который мы объясняем приближенностью соотношения (10) и вытекающим отсюда неточным определением  $\alpha$ . Действительно, структурные особенности комплексов (II) и (III) соединения (3), а именно участие только одного из двух циклов в образовании комплекса, таковы, что

$$\Delta\Delta\epsilon^{\text{II}} \approx \Delta\Delta\epsilon^{\text{III}} \approx 0,5 \Delta\Delta\epsilon_{\text{макс}}, \quad (12)$$

т. е. в их присутствии

$$\Delta\Delta\epsilon_{\text{макс}} > \Delta\Delta\epsilon^{\text{II, III}}, \quad (13)$$

а найденные по уравнению (11) значения  $\alpha$  занижены ( $\Delta\Delta\epsilon^{\text{II}}$ ,  $\Delta\Delta\epsilon^{\text{III}}$ ,  $\Delta\Delta\epsilon^{\text{IV}}$  и  $\Delta\Delta\epsilon^{\text{II, III, IV}}$  обозначают изменения кривых КД при переходе от свободного депсипептида к соответствующим комплексам или их равновесной смеси). Подбор значений  $\Delta\Delta\epsilon^{\text{II, III, IV}}$  показал, что при  $\Delta\Delta\epsilon^{\text{II, III, IV}} = 0,9\Delta\Delta\epsilon_{\text{макс}}$  «дрейфа» констант  $K_1^{\text{эфф}}$  не наблюдается (кривая титрования, соответствующая 230 нм, показана штриховой линией на рис. 12, б). Рассчитанные таким образом значения  $K_1$  составили 12 200 (205 нм), 15 300 (230 нм) и 17 400 М<sup>-1</sup> (240 нм). Таким образом,  $K_1^{\text{эфф}} = (1,5 \pm 0,3) \cdot 10^4$  М<sup>-1</sup>. Приняв по аналогии с En(GluBzINO<sub>2</sub>), En(Glu), En(LusPth) и En(Lys) значения  $K_1^{\text{I}} = K_1^{\text{II}} \approx 0,5 \cdot 10^3$  [11], по уравнению (4) находим  $K_1^{\text{IV}} \approx 1,4 \cdot 10^4$ . Сопоставление этого значения с данными по устойчивости комплексов 2 : 1 энниатина В ( $K_2 \leq 10^2$ ) [6] свидетельствует о разной стабилизации «сандвичевых» структур в энниатиновом ряду при соединении

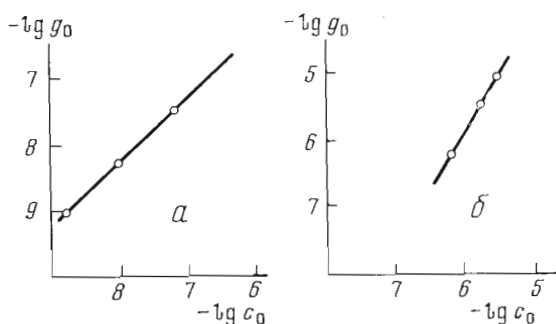


Рис. 13. Зависимость проводимости ( $\text{Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ ) бислойных мембран от концентрации  $\text{En}(\text{MeGlu})-\text{En}(\text{MeLys})$  (а) и  $\text{En}$  (б)

лигандных циклов ковалентным мостиком. Высокая устойчивость «сэндвича» приводит к низкой устойчивости двузарядных комплексов: по уравнению (7) находим, что  $K_2 \approx 20 \text{ M}^{-1}$ .

При титровании  $\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})$  перхлоратом натрия в 96% водном этаноле не наблюдалось признаков образования устойчивого «сэндвичевого» комплекса, поскольку «насыщение» циклопептида солью происходило при значительно больших (500-кратных) избытках соли, чем при титровании хлористым калием. Константа устойчивости  $K_1$ , рассчитанная по методу, использованному для  $\text{Vm}(\text{Glu})-\text{Vm}(\text{Lys})$ , равна  $200 \pm 20 \text{ M}^{-1}$ . Характерные особенности кривой КД комплекса  $[\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})] \cdot \text{Na}^+$  (слабый положительный эффект Коттона при  $\lambda \approx 230 \text{ нм}$  и интенсивное отрицательное дихроичное поглощение в коротковолновой области) согласуются с реализацией конформации *P* у обоих пептидных циклов.

В экстракционных опытах даже при весьма высоких концентрациях соли  $\text{En}(\text{MeGlu})-\text{En}(\text{MeLys})$  связывает только эквимоллярное количество ионов калия (табл. 2). Этот результат подтверждает сделанный ранее вывод [7] о том, что перенос ионов калия в гидрофобную фазу эффективнее всего осуществляется с помощью «сэндвичевых» комплексов. Низкую степень экстракции пикрата калия  $\text{En}(\text{Glu})-\text{En}(\text{Lys})$  мы объясняем уже упомянувшейся пониженной гидрофобностью *N*-дезметилированных энниатинов.

Интересный результат был получен при исследовании  $\text{En}(\text{MeLys})-\text{En}(\text{MeGlu})$  на бимолекулярных мембранах, приготовленных из липидов мозга быка. Ранее в нашей лаборатории было показано, что энниатин В дает квадратичную зависимость проводимости от концентрации ионов калия (рис. 13, б) [5].

Одним из возможных объяснений этого было предположение о том, что перенос ионов калия осуществляется «сэндвичевыми» комплексами. В этом случае для  $\text{En}(\text{MeLys})-\text{En}(\text{MeGlu})$ , образующего в растворах комплексы со сходной структурой, но с молярным соотношением депсипептид — катион, равным 1 : 1, и переносящего в такой форме ионы калия из водной фазы в органическую, следовало ожидать линейной зависимости проводимости мембран от концентрации ионофора. Именно такой результат был получен в опытах на бислоях (рис. 13, а). Таким образом, с помощью бисэнниатиона В был получен ряд новых данных, подтверждающих «сэндвичевый» механизм действия ионофоров энниатиновой группы.

### Экспериментальная часть

*Синтез соединений (1), (2) и (3).* 10 мкмоль глутаминовых аналогов (4), (6) или (8) растворяли в 1 мл хлористого тионила и выдерживали 1 ч при  $20^\circ$ . Хлористый тионил отгоняли в вакууме при температуре бани не выше

30°, к остатку добавляли абс. бензол и отгоняли его в вакууме. Полученный хлорангидрид растворяли в 1 мл абс. эфира и добавляли по каплям (—30°, 15 мин) к раствору 10 мкмоль лизиновых аналогов (5), (7) или (9) и 1 мл (15 мкмоль) триэтиламина в 3 мл абс. эфира; смесь перемешивали 1 ч при —30° и 2 ч при 20°. Реакционную массу промывали 1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub>, высушивали MgSO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток хроматографировали в метаноле на колонке с сефадексом LH-20 (200 × 0,8), высокомолекулярную фракцию упаривали, получая соединения (1), (2) или (3) в виде аморфных порошков.

Хроматографию осуществляли в тонком слое силикагеля (Eastman, США) в системе этилацетат — ацетон (3 : 2).

Удельное вращение измеряли на приборе Perkin-Elmer, модель 141 (США). Аминокислотный анализ проводили на приборе Bio Cal BC 200 (Швеция), 0,02 мкмоль вещества (1), (2) или (3) гидролизovali 20 ч 6 н. HCl в запаянных ампулах при 110°.

Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР снимали на приборах JNM-4H-100 и XL-100 с рабочей частотой 100 МГц и стабилизацией резонансных условий по одному образцу. В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан. Химические сдвиги определяли с точностью ±0,005 м. д., константы спин-спинового взаимодействия — с точностью до ±0,1 Гц. Температуру измеряли медь-константановой термопарой с точностью ±2° при помощи термоприставки к прибору JNM-4H-100.

Степень комплексообразования (α) определяли по интегральной интенсивности неперекрывающегося сигнала в высоком поле (2,79 м. д. в CDCl<sub>3</sub>—CD<sub>3</sub>CN (1 : 1) и 2,83 м. д. в CD<sub>3</sub>OH) по уравнению

$$\alpha = \frac{S_{\text{своб}}/S_{\text{общ}}}{S_{\text{набл}}/S_{\text{общ}}}$$

(S<sub>общ</sub> — общая площадь сигналов N—CH<sub>3</sub>; S<sub>своб</sub> — площадь высокопольного сигнала N—CH<sub>3</sub> в отсутствие роданистого калия; S<sub>набл</sub> — площадь этого же сигнала при данной концентрации соли).

Кривые КД снимали на спектрополяриметре Сагу-60 с приставкой CD-6001, УФ-спектры — на приборе Сагу-15 при 25° и концентрации вещества (2—6) · 10<sup>-4</sup> М, толщина кювет 0,01—2,0 см.

Солевые растворы для экстракционных экспериментов готовили из KCl (ос.ч.) и дважды дистиллированной воды; pH водных растворов (~7,5) устанавливали добавлением 0,1 н. LiOH и 2 н. HCl. Уравновешивание водного (2,5 мл раствора KCl разной концентрации +1 · 10<sup>-3</sup> М пикриновой кислоты) и органического (2,5 мл 10<sup>-4</sup> М соединений (1), (2), (3) или (12) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) растворов проводили встряхиванием их в течение 3—5 мин в делительной воронке. Для расчета использовали данные по оптической плотности при длинах волн ~370 нм для соединения (2) и 376 нм для соединения (1), отвечающих максимуму поглощения пикрат-аниона в хлористом метиле. Коэффициент молярной экстинкции ε = 1,9 · 10<sup>4</sup> [3] для соединения (1) и ε = 1,6 · 10<sup>4</sup> [18] для соединения (2). Для постановки мембран брали 2% раствор суммарной фракции липидов белого вещества головного мозга быка, выделенной по методу Мюллера и др. [18], в смеси *n*-декан — *n*-гептан (1 : 1). Мембраны получали в стеклянной ячейке с внутренней тефлоновой камерой; диаметр отверстия 1,70 ± 0,02 мм. Рабочий объем ячейки 25 мл. Электрические характеристики бислой исследовали с помощью установки, описанной в работе [19], с применением Ag/AgCl-электродов. Значения проводимости мембран *g*<sub>0</sub> были получены вычислением тангенса угла наклона касательной к вольт-амперной кривой при нулевом токе. Данные по проводимости бислойных мембран основаны на измерениях, выполненных после установления стационарных значений проводимости. Все измерения проводили при температуре 26 ± 1°.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Исапов В. Т., Шкроб А. М. (1974) Мембрано-активные комплексы, «Наука», М.
2. Structure and bonding (Dunitz J. D. and al., eds.) (1973) vol. 16, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — N. Y.
3. Eisenmann G., Krasne S. J. (1974) in MTP International Review of Science, Biochemistry Series (Fox C. F., ed.), vol. 2, Butterworths, London.
4. Grell E., Funck Th., Eggers F. (1975) in Membranes (Eisenman G., ed.), vol. 3, pp. 2—112, Marcel Dekker Inc., N. Y.— Basel.
5. Ivanov V. T., Evstratov A. V., Sumskaya L. V., Melnik E. I., Chumburidze T. S., Portnova S. L., Balashova T. A., Ovchinnikov Yu. A. (1973) FEBS Lett., 36, 65—71.
6. Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Evstratov A. V., Mikhaleva I. I., Bystrov V. F., Portnova S. L., Balashova T. A., Meshcheryakova E. N., Tulchinsky V. M. (1974) Int. J. Peptide Prot. Res., 6, 465—498.
7. Ivanov V. T. (1975) Ann. N. Y. Acad. Sci., 264, 221—243.
8. Ovchinnikov Yu. A. (1974) FEBS Lett., 44, 1—21.
9. Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T. (1974) Tetrahedron, 30, 1871—1890.
10. Иванов В. Т., Сумская Л. В., Михалева И. И., Лайнс И. А., Рябова И. Д., Овчинников Ю. А. (1974) Химия природн. соедин., 346—358.
11. Сумская Л. В., Чехляева Н. М., Барсуков Л. И., Терехов О. П., Демин В. В., Шкроб А. М., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. (1976) Биоорг. химия, 2, 351—363.
12. Shemyakin M. M., Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Antonov V. K., Vinogradova E. I., Shkrob A. M., Malenkov G. G., Evstratov A. V., Laine I. A., Melnik E. I., Ryabova I. D. (1969) J. Membr. Biol., 1, 402—430.
13. Иванов В. Т., Евстратов А. В., Балашова Т. А., Мещерякова Е. Н., Портнова С. Л., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. (1976) Биоорг. химия, 2, 1464—1496.
14. Андреев И. М., Малевков Г. Г., Шкроб А. М., Шемякин М. М. (1974) Молекулярн. биология, 5, 614—623.
15. Иванов В. Т., Лавринович И. А., Портнова С. Л., Лапшин В. В., Костецкий П. В., Овчинников Ю. А. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 10, 2320—2328.
16. Titlestad K. (1975) Acta chem. scand., B29, 153—167.
17. Hassall C. H., Moschidis M. C., Thomas W. A. (1974) J. Chem. Soc. (B), 1757—1761.
18. Mueller P., Rudin D. O. (1963) J. Phys., 67, 534—540.
19. Либерман Е. А., Мохова Б. Н., Скулачев В. П., Топалы В. П. (1968) Биофизика, 13, 188—193.

Поступила в редакцию  
20.VII.1976

### BIS-DERIVATIVES OF VALINOMYCIN AND ENNIATIN B AS COMPLEXONES AND IONOPHORES

SUMSKAYA L. V., BALASHOVA T. A., CHUMBURIDZE T. S.,  
MELNIK E. I., MIKHALEVA I. I., IVANOV V. T.,  
OVCHINNIKOV Yu. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Bis-valinomycin and bis-enniatin B comprising two depsipeptide rings and designated here as Vm(Glu)—Vm(Lys), En(MeGlu)—En(MeLys), En(Glu)—En(Lys) have been synthesized. Using such methods as circular dichroism, NMR spectroscopy, salt extraction and the measurements of the induced conductance of bilayer membrane it has been demonstrated that each depsipeptide ring of bis-valinomycin behaves as an independent ion-binding site. Bis-enniatin forms extremely stable complexes of a sandwich type containing an ion between the two rings. The sandwich mode of action of enniatin antibiotics in membrane systems has been confirmed by studies on these analogs.