



УДК 615.33+547.963.32.07

**ЛИГАНДЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ СРОДСТВОМ  
К ОПРЕДЕЛЕННЫМ ОСНОВАНИЯМ ИЛИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ  
ОСНОВАНИЙ ДНК****V. АНАЛОГИ АКТИНОМИЦИНА D С ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ В ПОЛОЖЕНИИ 7  
ФЕНОКСАЗОНОВОГО ХРОМОФОРА \****Никитин С. М., Гроховский С. Л., Жузе А. Л.,  
Михайлов М. В., Заседателев А. С., Гурский Г. В.,  
Готтих Б. П.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

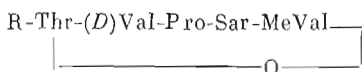
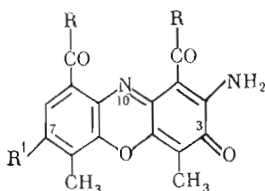
Для изучения механизма взаимодействия антибиотика актиномицина D с ДНК синтезирован ряд 7-замещенных аналогов антибиотика. С целью создания лигандов, обладающих сродством к определенным последовательностям ДНК, синтезированы соединения, в которых либо два остатка молекул 7-аминоактиномицина D связаны между собой депептидными цепочками разной длины, либо остаток молекулы 7-аминоактиномицина D связан с остатками молекул различных аналогов антибиотика дистамицина А.

Актиномицин D (АМ) при связывании с двухспиральной ДНК проявляет специфичность к G-C-паре [2]. Структура комплекса АМ-ДНК до сих пор окончательно не установлена. В литературе описаны две различные модели этого комплекса. Согласно одной из них, феноксазоновый хромофор антибиотика интеркалирует между парами оснований ДНК, а депептидные кольца располагаются вдоль узкой бороздки ДНК. Последний вариант этой модели предложен Джейн и Собелом [3]. Согласно другой модели, и депептидные кольца, и феноксазоновый хромофор располагаются в узкой бороздке ДНК. Наиболее аргументированным вариантом второй модели нам кажется модель Гурского [4]. Известно, что ряд производных АМ с небольшими заместителями в положении 7 гетероциклического хромофора сохраняет способность связываться с ДНК [5]. Построение на молекулярных моделях показало, что заместители в положении 7 хромофора располагаются в узкой бороздке ДНК вне зависимости от того, соответствует ли структура комплекса АМ-ДНК модели Джейн и Собела или модели Гурского. На этом основании мы решили выбрать положение 7 гетероциклического хромофора АМ в качестве места введения в молекулу антибиотика различных заместителей с целью изучения механизма взаимодействия АМ с двухспиральной ДНК.

\* Сообщение IV см. [1]. Сокращения: АМ — актиномицин D; ДМ — дистамицин А; Sar, Glo, Abu, Nrc и Arc — остатки соответственно саркозина, гликолевой,  $\gamma$ -аминомасляной, 1-метил-4-пиперидин-2-карбоновой и 1-метил-4-аминопиперидин-2-карбоновой кислот в пептидах и депептидах; ДЦК — N,N'-дициклогексилкарбодимид; КДИ — N,N'-карбонилдимиазид; Dns — дансил; Pht — фталил; Im — имидазол.

Синтез 7-нитро-АМ (I) был осуществлен нитрованием АМ, подобно тому как ранее были получены 7-нитроактиноцины — аналоги АМ, не содержащие пептидных колец [1]. Найденные нами условия нитрования схожи с условиями, предложенными Сенгуптой и др. [5]. Каталитическое гидрирование соединения (I) приводило к 7-амино-3,10-дигидро-АМ, который без выделения окисляли кислородом воздуха до 7-амино-АМ (II). Ацилирование соединения (II) проводили хлорангидридным методом, оказавшимся единственным приемлемым при синтезе N-ацильных аналогов 7-аминоактиноцина [1]. При конденсации хлорангидрида N-карбобензоксид-*L*-валилгликолевой кислоты с соединением (II) был получен 7-(N-карбобензоксид-*L*-валилгликолиламино)-АМ (III). Удаление N-карбобензоксид-группы проводили насыщенным раствором  $\text{NH}_4\text{OH}$  в  $\text{AcOH}$ . Образующийся при этом бромгидрат 7-(*L*-валилгликолиламино)-АМ переводили в соответствующий ацетат. При повторном ацилировании основания (IV) действием *Z*-Val-Glo-Cl получили соединение (V), в котором депептидный фрагмент Val-Glo повторен дважды. Удаление N-защитной группы ацидолизом привело к соединению (VI). Таким же образом из соединения (VI) синтезировали соединения (VII) и (VIII), боковая цепь которых содержит фрагмент Val-Glo, повторенный уже трижды; для физико-химических измерений и хранения соединения (VI) и (VIII) переводили в соответствующие ацетаты.

Исследование взаимодействия с ДНК соединений (I) и (II) показало, что наличие в положении 7 АМ нитро- или аминогруппы не влияет существенно на связывание этих аналогов с ДНК. Введение объемных заместителей (соединения (III)–(VI)) заметно уменьшает константу связывания [6].

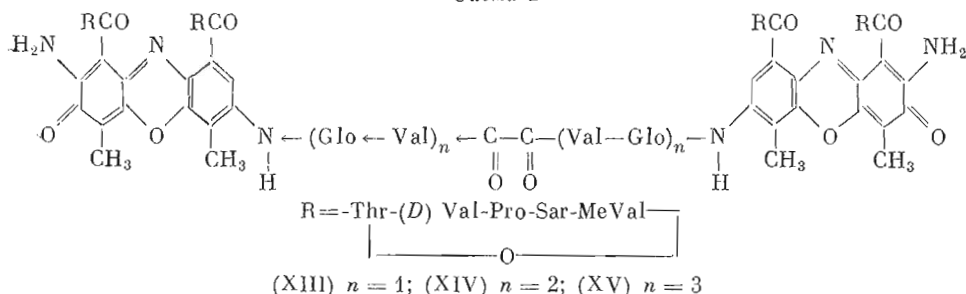


АМ	$R' = \text{H}$	(V)	$R' = \text{Z}-(\text{Val-Glo})_2\text{-NH}$
(I)	$R' = \text{NO}_2$	(VI)	$R' = \text{H}-(\text{Val-Glo})_2\text{-NH}$
(II)	$R' = \text{NH}_2$	(VII)	$R' = \text{Z}-(\text{Val-Glo})_3\text{-NH}$
(III)	$R' = \text{Z-Val-Glo-NH}$	(VIII)	$R' = \text{H}-(\text{Val-Glo})_3\text{-NH}$
(IV)	$R' = \text{H-Val-Glo-NH}$	(IX)	$R' = \text{Pht-Gly-NH}$
		(X)	$R' = \text{H-Gly-NH}$
		(XI)	$R' = \text{Z-Abu-Gly-NH}$
		(XII)	$R' = \text{H-Abu-Gly-NH}$

С целью поиска веществ, способных к связыванию с двумя G-C-парамми, находящимися на определенном расстоянии друг от друга, были предприняты синтезы соединений (XIII), (XIV) и (XV), представляющих собой две молекулы 7-амино-АМ, ковалентно связанные депептидными цепочками различной длины. Синтез этих соединений был осуществлен ацилированием соединений (IV), (VI) и (VIII) оксалилхлоридом. Предварительные результаты исследования взаимодействия соединений (XIII), (XIV) и (XV) с ДНК свидетельствуют о том, что в этом процессе участвуют оба актиномициновых фрагмента соединений (XIII) и (XIV) (схема 1).

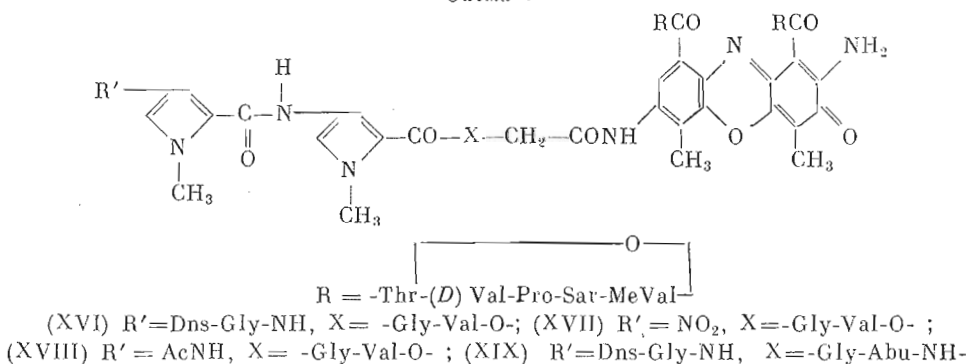
Для создания лигандов, специфичных к определенным последовательностям оснований ДНК, необходимо было синтезировать соединения, состоящие из двух фрагментов, каждый из которых специфически связывался бы с определенной парой оснований или последовательностью пар оснований ДНК. В качестве соответствующих фрагментов были выбраны антибиотики АМ и ДМ, поскольку при взаимодействии с ДНК последний

Схема 1



избирательно связывается с четырьмя А·Т-парами ДНК [7], тогда как АМ — с одной G·C-парой [2]. Возможность образования тройного комплекса ДМ — АМ — ДНК была показана ранее [8]. Структура комплекса ДМ (и родственного ему антибиотика нетропина) с ДНК изучена достаточно подробно [7]. Известно, что при этом взаимодействии молекула ДМ укладывается внутри узкого желоба ДНК, причем специфичность взаимодействия ДМ и ДНК обеспечивается водородными связями между

Схема 2

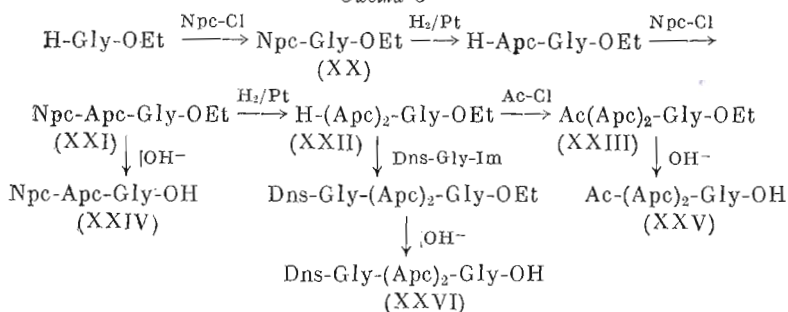


атомами водорода амидных групп антибиотика и атомами кислорода ти-минов или N3 аденинов, а положительно заряженная группа участвует в неспецифическом взаимодействии с фосфатной группой ДНК.

С целью получения лигандов, обладающих сродством к G·C-паре и одновременно к находящимся на фиксированном от нее расстоянии нескольким А·Т-парам, были синтезированы соединения (XVI) — (XIX), состоящие из фрагмента молекулы ДМ и молекулы АМ (схема 2).

Синтез соединения (XVI) был осуществлен конденсацией амина (IV) с 1-метил-4-[1-метил-4-(дансилглициламино)пиррол-2-карбоксамид]пиррол-2-карбонилглицином (XXVI) с помощью ДЦК в присутствии N-оксисукцинимиды. Полученный таким образом 7-[[1-метил-4-(дансилглициламино)пиррол-2-карбоксамид]пиррол-2-карбонилглицил-L-валилгликолиламино]-АМ (XVI) был гомогенен, по данным ТСХ и колоночной хрома-

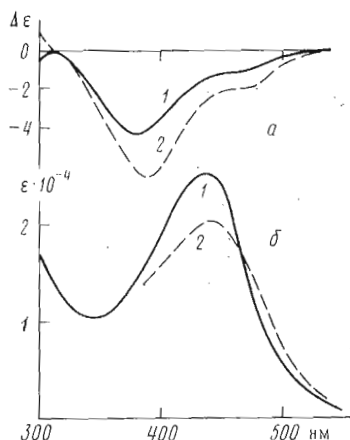
Схема 3



тографии, и обладал характерной для феноксазонового хромофора полосой поглощения при 445 нм и флуоресценцией с максимумом испускания при 490 нм (возбуждение при 340 нм), присущей дансильному хромофору в неполярном окружении. Соединения (XVII) и (XVIII) были получены аналогично соединению (XVI) ацилированием амина (IV) аналогами ДМ (XXIV) и (XXV) соответственно (схема 3). Выход соединений (XVI)–(XVIII) составлял ~10%, но он был все же выше, чем при использовании в качестве конденсирующего агента КДИ или только ДЦК без N-оксисукцинимидов. Хлорангидридный метод оказался в этом случае непригодным из-за низкой устойчивости пиррольных циклов при приготовлении соответствующих хлорангидридов.

Для получения соединения с большей конформационной подвижностью соединительной цепочки мы использовали вместо гликолевой кислоты глицина, а вместо L-валина —  $\gamma$ -аминомасляную кислоту. С этой целью 7-амино-АМ ацилировали хлорангидридом фталилглицина [9]. Удаление фталильной группы проводили нагреванием 7-(фталилглициламино)-АМ (IX) в метанольном растворе ацетата гидразина. Использование ацетата гидразина [10] вместо обычно применяемого в таких случаях гидразингидрата обусловлено наличием двух способных к гидразинолизу сложноэфирных связей в молекуле АМ. Предварительно с помощью ТСХ было установлено, что нагревание АМ в метанольном растворе ацетата гидразина в течение 2 ч при 50°С не приводит к разрушению антибиотика. После удаления фталильной группы у соединения (IX) 7-(глициламино)-АМ (X) ацилировали N-оксисукцинимидным эфиром N-карбобензоксиг-аминомасляной кислоты для получения 7-(N-карбобензоксиг-аминобутирилглициламино)-АМ (XI). Декарбобензоксигирование соединения (XI) проводили насыщенным раствором НВг в АсОН и образовавшийся при этом 7-( $\gamma$ -аминобутирилглициламино)-АМ (XII) использовали для синтеза соединения (XIX), состоящего из 7-амино-АМ и дипирролкарбоксамидного фрагмента ДМ, связанных цепочкой из трех аминокислотных остатков. Как и при синтезе соединения (XVI), ацилирование проводили аналогом ДМ (XXVI), несущим на N-конце флуоресцентную метку. Полученное соединение (XIX) обладало ожидаемыми оптическими свойствами, т. е. характерной для АМ полосой поглощения при 445 нм и флуоресценцией при 490 нм, характерной для дансильного хромофора в неполярном окружении.

При взаимодействии соединений (XVI)–(XIX) с ДНК из тимуса теленка происходил сдвиг максимума при 445 нм в длинноволновую область спектра на 5 нм с одновременным уменьшением молярной экстинкции (рисунок, б). Такие изменения в спектре поглощения характерны для связывания АМ и его аналогов с ДНК [6]. Уменьшение величины молярной экстинкции при 430 нм при связывании соединений (XVI)–(XIX) с ДНК близко к уменьшению величины молярной экстинкции у аналогов АМ с объемными заместителями в положении 7 [11]. Изме-



Спектры кругового дихроизма (а) и поглощения (б) свободного (1) и связанного с ДНК из тймуса теленка (2) соединения (XIX). Концентрация ДНК (шар оснований)  $4 \cdot 10^{-4}$  М, концентрация лиганда  $2 \cdot 10^{-6}$  М; 0,05 М фосфатный буфер (рН 6,8),  $5 \cdot 10^{-4}$  М EDTA

взаимодействия с ДНК актиномициновой части соединений (при взаимодействии с poly(dA) · poly(dT)) их дистамициновой части также не связывается с ДНК. Такое поведение этих соединений можно объяснить внутримолекулярным взаимодействием между актиномициновыми и дистамициновыми фрагментами молекул. Подтверждением этому служит уже упоминавшийся сдвиг максимума спектра флуоресценции данной группы в коротковолновую область, характерный для неполярного окружения, которое может возникнуть при внутримолекулярном взаимодействии. Такое взаимодействие не препятствует связыванию с ДНК актиномициновой части молекул, хотя и с меньшей константой в сравнении с исходными 7-замещенными аналогами АМ. Например, для соединения (XIX)  $K 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ , а для (XII) —  $K 5,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

### Экспериментальная часть

Растворы веществ в органических растворителях высушивали над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворители упаривали в вакууме при 20–25° С и 15 или 1 мм рт. ст. (в зависимости от температуры кипения растворителя). Вещества высушивали в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$  и  $\text{NaOH}$  при 20° С. Гидрирование проводили при 20° С и атмосферном давлении над катализатором Адамса [14]. Индивидуальность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках «Silufol» (ЧССР) в следующих системах: бензол — ацетон, 1 : 1 (А); бензол — ацетон — триэтиламин, 10 : 10 : 1 (Б); бензол — ацетон — метанол, 10 : 10 : 1 (В); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (Г). При колоночной хроматографии использовали силикагель L(40–100 мкм, Chemapol, ЧССР), а при гель-хроматографии — колонку (2,5×150 см) с сефадексом LH-20 в метаноле при скорости элюции 3,5 мл/ч. Температуру плавления определяли на приборе фирмы «Electrothermal» (Англия). Спектры поглощения измеряли на УФ-спектрофотометре «Beckman-25» (США) в метаноле, спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР — на спектрометрах «Varian XL-100» (США) с рабочей частотой 100 МГц и «Bruker-90» с рабочей частотой 90 МГц с гексаметилдисилоксаном в качестве внутреннего стандарта; сокращения: с — синглет, д — дублет, т — триплет, к — квадруплет, м — мультиплет. При отнесении сигналов ЯМР

аналогов АМ использовали данные работы [15]. Спектры КД снимали на приборе «Jobin-Yvon Mark III» (Франция).

7-Нитро-АМ (I). В 5,0 мл охлажденной до  $-10^{\circ}\text{C}$  конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $d$  1,83) растворяли 100 мг (0,08 ммоль) АМ (Реанал, Венгрия) и после 10 мин перемешивания добавляли раствор 0,034 мл  $\text{HNO}_3$  ( $d$  1,52) в 0,2 мл конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . После перемешивания в течение 30 мин при  $-2^{\circ}\text{C}$  раствор выливали на смесь 50 г льда с 25 мл  $\text{CHCl}_3$ , перемешивали до растворения льда и отделяли органической слой. Водный раствор экстрагировали  $\text{CHCl}_3$  ( $5 \times 25$  мл). Органические экстракты соединяли, промывали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , сушили и упаривали. Хроматографировали на колонке ( $4 \times 25$  см) с силикагелем в системе А и затем на колонке с сефадексом. Выход 72,5 мг (70%);  $R_f$  0,46 (А); УФ:  $\lambda_{\text{макс}}$  451, 354 нм; ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ , м.д.): 0,85–1,50 [30 H, м,  $\text{CH}_3$  (Val, MeVal, Thr)], 2,01–2,24 [8 H, м,  $\beta$ -H (Val, MeVal),  $\text{CH}_2$  (Pro)], 2,20 (3 H, с, 4- $\text{CH}_3$ ), 2,70 (3 H, с, 6- $\text{CH}_3$ ), 2,82 [6 H, с,  $\text{NCH}_3$  (Sar или MeVal)], 2,94 [6 H, с,  $\text{NCH}_3$  (MeVal или Sar)], 3,46–4,06 [14 H, м,  $\text{NCH}_2$  (Pro),  $\text{CH}_2$  (Sar)],  $\alpha$ -H (Val, MeVal, Thr)], 5,27 (2 H, м,  $\beta$ -H Thr), 6,15 (2 H, м,  $\alpha$ -H Pro), 8,14 (с, 8-H).

7-Амино-АМ (II). Красный раствор 62 мг (0,05 ммоль) соединения (I) в 50 мл метанола гидрировали над катализатором Адамса до образования бледно-зеленого раствора и затем перемешивали на воздухе 1 ч. Раствор, ставший темно-красным, отфильтровывали от катализатора и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке ( $4 \times 30$  см) с силикагелем в системе А и на колонке с сефадексом LH-20 в метаноле. Выход 48 мг (79%); УФ:  $\lambda_{\text{макс}}$  503 нм,  $R_f$  0,27 (А); ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ , м.д.): 0,80–1,40 [30 H, м,  $\text{CH}_3$  (Val, MeVal, Thr)], 2,00–2,30 [8 H, м,  $\text{CH}_2$  (Pro),  $\beta$ -H (Val, MeVal)], 2,20 (3 H, с, 4- $\text{CH}_3$ ), 2,39 (3 H, с, 6- $\text{CH}_3$ ), 2,88 [6 H, с,  $\text{NCH}_3$  (Sar или MeVal)], 2,98 [6 H, с,  $\text{NCH}_3$  (MeVal или Sar)], 3,60–4,10 [14 H, м,  $\text{NCH}_2$  (Pro),  $\text{CH}_2$  (Sar),  $\alpha$ -H (Val, MeVal, Thr)], 6,15 (2 H, м,  $\alpha$ -H Pro), 7,27 (с, 8-H).

7-(*N*-Карбобензоксид-*L*-валилгликолиламино)-АМ (III). К 50 мг (0,04 ммоль) 7-амино-АМ, растворенным в смеси 10 мл абс. бензола и 3 мл абс. пиридина, добавляли раствор 68 мг (0,20 ммоль) свежеприготовленного *Z*-Val-Glo-Cl [1] в 5 мл абс. бензола. Через 5 мин раствор упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали 1 н.  $\text{HCl}$ , насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водой, сушили и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке ( $4 \times 30$  см) с силикагелем в системе А и на колонке с сефадексом. Выход 51 мг (82%);  $R_f$  0,44 (А). ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ , м.д.): 0,80–1,33 [м,  $\text{CH}_3$  (*D*-Val, *L*-Val, MeVal, Thr)], 1,83–2,28 [9 H, м,  $\text{CH}_2$  (Pro),  $\beta$ -H (Val, MeVal)], 2,17 (3 H, с, 4- $\text{CH}_3$ ), 2,41 (3 H, с, 6- $\text{CH}_3$ ), 2,85 [6 H, с,  $\text{NCH}_3$  (Sar или MeVal)], 2,92 [6 H, с,  $\text{NCH}_3$  (MeVal или Sar)], 3,58–4,05 [15 H, м,  $\text{NCH}_2$  (Pro),  $\text{CH}_2$  (Sar),  $\alpha$ -H (Val, MeVal, Thr)], 5,08 (2 H, с,  $\text{PhCH}_2$ ), 5,20 (2 H, м,  $\beta$ -H Thr), 6,13, (2 H, м,  $\alpha$ -H Pro), 7,28 (5 H, м, Ph), 7,73 (с, 8-H)

7-(*N*-Карбобензоксид-*L*-валилгликолил - *L* - валилгликолиламино)-АМ (VI) получен, как и (III), из соединения (IV), выход 87%,  $R_f$  0,40 (А), УФ:  $\lambda_{\text{макс}}$  448 нм.

7-(*N*-Карбобензоксид-*L*-валилгликолил-*L*-валилгликолил-*L*-валилгликолиламино)-АМ (VII) получен аналогично из соединения (V), выход 83%,  $R_f$  0,41 (А), УФ:  $\lambda_{\text{макс}}$  443 нм.

7-(*N*-Фталилглициламино)-АМ (IX). К раствору 40 мг (0,03 ммоль) соединения (II) в смеси 40 мл абс. бензола и 20 мл абс. пиридина приливали раствор 30 мг (0,15 ммоль) хлорангидрида фталилглицина [9] в 5 мл абс. бензола и встряхивали 15 мин. Выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке ( $4 \times 30$  см) с силикагелем в системе А и на колонке с сефадексом. Выход 42 мг (92%);  $R_f$  0,46 (А), УФ:  $\lambda_{\text{макс}}$  440 нм, ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ , м.д.): 0,70–1,34 [30 H, м,  $\text{CH}_3$  (Val, MeVal, Thr)], 1,90 (4 H, м,  $\text{CH}_2$ Pro), 1,99 (3 H, с, 4- $\text{CH}_3$ ), 2,16 [4 H, м,  $\beta$ -H (Val, MeVal)], 2,40 (3 H, с, 6- $\text{CH}_3$ ), 2,85 [6 H, с,

NCH<sub>3</sub> (Sar или MeVal)], 2,93 [6 H, с, NCH<sub>3</sub> (MeVal или Sar)], 3,60–4,08 [14 H, м, NCH<sub>2</sub>(Pro), CH<sub>2</sub>(Sar), α-H (Val, MeVal, Thr)], 4,60 (2 H, м, CH<sub>2</sub>Gly), 5,24 (2 H, м, β-H Thr), 6,20 (2 H, м, α-H Pro), 7,75–7,88 (5 H, м, 8-H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>).

*7-Глициламино-AM (X)*. Раствор 32 мг (0,022 ммоль) соединения (IX) в 2 мл метанола, содержащего 0,184 мл 100%-ного гидразингидрата и 0,212 мл ледяной уксусной кислоты (рН 6,8), выдерживали 1 ч при 50° С. Раствор упаривали в вакууме, остаток распределяли между 10 мл этилацетата и 10 мл 0,5 н. HCl, водный слой отделяли, промывали этилацетатом, подщелачивали твердым NaHCO<sub>3</sub> и экстрагировали этилацетатом (4×10 мл). Органический слой отделяли, сушили и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с сефадексом. Выход 21 мг (72%), R<sub>f</sub> 0,42 (B). Соединение (X) гомогенно по данным электрофореза на бумаге «Whatman 1» в 1 М AcOH (1 ч, 20 В/см).

*N-Оксисукцинимидный эфир N-карбобензоксиг-аминомасляной кислоты*. К охлажденному до 0° С раствору 1,186 г (5 ммоль) N-карбобензоксиг-аминомасляной кислоты (Reanal, Венгрия) и 0,575 г (5 ммоль) N-оксисукцинимиды (Sigma, США) в 10 мл ТГФ добавляли при перемешивании 1,032 г (5 ммоль) ДЦК, перемешивали 1 ч при 0° С и оставляли на ночь при 5° С. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали ТГФ (2×5 мл). Объединенные фильтраты упаривали в вакууме. К полученному густому маслу добавляли 15 мл изопропанола и оставляли на сутки при 5° С. Закристаллизовавшееся вещество отфильтровывали и промывали петролевым эфиром. Выход 1,203 г (71%), т. пл. 68° С, ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д.): 1,83 (2 H, м, β-H), 2,53 (2 H, т, J 7 Гц, α-H), 2,65 (4 H, с, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3,18 (2 H, м, γ-H), 4,99 (2 H, с, PhCH<sub>2</sub>), 7,24 (5 H, с, Ph).

*7-(N-Карбобензоксиг-аминобутирилглициламино)-AM (XI)*. Раствор 24 мг (0,018 ммоль) соединения (X) и 60 мг (0,57 ммоль) N-оксисукцинимидного эфира N-карбобензоксиг-аминомасляной кислоты в смеси 15 мл абс. бензола и 1 мл абс. пиридина выдерживали 20 ч при 20° С. Раствор упаривали в вакууме, остаток растворяли в 20 мл этилацетата. Раствор промывали 1 н. HCl (5×10 мл), насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (3×10 мл), водой, сушили и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в системе А и на колонке с сефадексом. Выход 18 мг (64%), R<sub>f</sub> 0,43 (A), УФ: λ<sub>макс</sub> 443 нм.

*Удаление карбобензоксигрупп*. К 0,03 ммоль N-защитенного соединения (III, V, VII и XI) прибавляли 2 мл насыщенного раствора HBr в ледяной уксусной кислоте и выдерживали 40 мин при 20° С. Реакционный раствор упаривали в вакууме, твердый остаток растворяли в 50 мл смеси (1:1) этилацетата и 0,5 н. HCl. Водный слой отделяли, промывали этилацетатом, подщелачивали твердым NaHCO<sub>3</sub> (в случае соединения (XI) — Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) и экстрагировали этилацетатом (3×20 мл). Органический экстракт сушили и упаривали в вакууме, а остаток хроматографировали на колонке с сефадексом LH-20 в метаноле. Таким образом получены: 7-(L-валилгликолиламино)-AM (IV), выход 82%, УФ: λ<sub>макс</sub> 443 нм, R<sub>f</sub> 0,00 (A), 0,67 (B); 7-(L-валилгликолил-L-валилгликолиламино)-AM (VI), выход 68%, УФ: λ<sub>макс</sub> 442 нм, R<sub>f</sub> 0,00 (A), 0,64 (B); 7-(L-валилгликолил-L-валилгликолил-L-валилгликолиламино)-AM (VIII), выход 65%, УФ: λ<sub>макс</sub> 443 нм, R<sub>f</sub> 0,00 (A), 0,64 (B); 7-(γ-аминобутирилглициламино)-AM (XII), выход 67%, УФ: λ<sub>макс</sub> 441 нм, R<sub>f</sub> 0,00 (A), 0,58 (B).

Соединения (IV, VI, VIII, XII) были гомогенны по данным электрофореза на бумаге «Whatman 1» в 1 М AcOH (1 ч, 20 В/см).

*N,N'-бис(7-L-валилгликолиламино)-AM оксамид (XIII)*. К раствору 22 мг (0,015 ммоль) соединения (IV) в 25 мл смеси (4:1) абс. бензола и абс. пиридина добавляли в течение 15 мин по каплям при перемешивании раствор 1,2 мг (0,01 ммоль) оксалилхлорида [16] в 10 мл бензола и перемешивали еще 15 мин. Растворитель упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 15 мл этилацетата и промывали 1 н. HCl до удаления непро-

реагировавшего соединения (IV), затем экстрагировали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  до полного удаления примеси моноамида щавелевой кислоты, а оставшийся этилацетатный раствор диамида щавелевой кислоты (XIII) сушили и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонках с силикагелем ( $2,5 \times 20$  см) в системе А и с сефадексом в метаноле. Выход 12 мг (55%), УФ:  $\lambda_{\text{max}}$  442 нм,  $R_f$  0,33 (А).

*N,N'*-бис[7-(*L*-валилгликолил-*L*-валилгликолиламино) - АМ]оксамид (XIV). Синтез был проведен аналогично синтезу соединения (XIII), исходя из соединения (VI) и оксалилхлорида. Выход 64%,  $R_f$  0,31 (А), УФ:  $\lambda_{\text{max}}$  446 нм.

*N,N'*-бис[7-(*L*-валилгликолил-*L*-валилгликолил-*L*-валилгликолиламино)-АМ]оксамид (XV). Синтез был проведен аналогично синтезу соединения (XIII), исходя из соединения (VIII) и оксалилхлорида. Выход 62%,  $R_f$  0,30 (А), УФ:  $\lambda_{\text{max}}$  447 нм.

*Npc-Gly-OEt* (XX). 30,0 г (0,176 моль) 1-метил-4-нитропиррол-2-карбоновой кислоты [17] кипятили 1 ч с 40 мл  $\text{SOCl}_2$ , полученный раствор упаривали досуха, остаток несколько раз упаривали с сухим бензолом и растворяли в 200 мл сухого бензола. 90,0 г (0,72 моль) хлоргидрата этилового эфира глицина растворяли в 200 мл воды, прибавляли 98 мл (0,70 моль) триэтиламина и затем бензольный раствор хлорангидрида. Смесь интенсивно перемешивали 2 ч при 20° С, охлаждали до 0° С, осадок отфильтровывали, промывали небольшим количеством холодного метанола и перекристаллизовывали из метанола. Выход соединения (XX) 39,4 г (88%), т. пл. 117–119° С, ЯМР [ $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ , м.д.]: 1,22 (3 Н, т,  $J$  7 Гц,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 3,42 (3 Н, с,  $\text{NCH}_3$ ), 3,97 (2 Н, д,  $J$  6 Гц,  $\text{NHCH}_2$ ), 4,14 (2 Н, к,  $J$  7 Гц,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 7,51 (Н, д,  $J$  2 Гц, 3-Н Npc), 8,15 (Н, д,  $J$  2 Гц, 5-Н Npc), 8,87 (Н, т,  $J$  6 Гц,  $\text{NHCH}_2$ ).

*Npc-Apc-Gly-OEt* (XXI). Раствор 7,7 г (30 ммоль) соединения (XX) в 100 мл абс. этанола, содержавшего 32 ммоль  $\text{HCl}$ , гидрировали над 1,2 г катализатора Адамса до прекращения поглощения водорода. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали и остаток растворяли в 40 мл абс. пиридина. Хлорангидрид, полученный из 5,2 г (31 ммоль) 1-метил-4-нитропиррол-2-карбоновой кислоты (см. предыдущую методику), растворяли в 40 мл бензола. Растворы смешивали и оставляли на 15 ч при 20° С. Осадок отфильтровывали, промывали метанолом и эфиром. Выход 7,5 г (67%), т. пл. 253–256° С,  $R_f$  0,74 (Г), ЯМР [ $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ , м.д.]: 1,23 (3 Н, т,  $J$  7 Гц,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 3,86 (3 Н, с,  $\text{NCH}_3$ ), 3,97 (2 Н, д,  $J$  6 Гц,  $\text{NHCH}_2$ ), 4,02 (3 Н, с,  $\text{NCH}_3$ ), 4,15 (2 Н, к,  $J$  7 Гц,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 6,96 (Н, д,  $J$  2 Гц, 3-Н Apc), 7,28 (Н, д,  $J$  2 Гц, 3-Н Npc), 7,60 (Н, д,  $J$  2 Гц, 5-Н Apc), 8,16 (Н, д,  $J$  2 Гц, 5-Н Npc), 8,46 (Н, т,  $J$  6 Гц,  $\text{NHCH}_2$ ), 10,32 (Н, с, NH Apc).

*HCl \cdot H-Apc-Apc-Gly-OEt* (XXII). Суспензию 2,0 г (5,3 ммоль) соединения (XXI) в 30 мл абс. этанола, содержавшего 8 ммоль  $\text{HCl}$ , гидрировали над 0,8 г катализатора Адамса. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали, остаток растворяли в 5 мл метанола и нанесли на колонку ( $3 \times 150$  см) с сефадексом LH-20. Элюцию проводили метанолом со скоростью 15 мл/ч. Фракции, содержавшие соединение (XXII), объединяли и упаривали. Выход соединения (XXII) 0,81 г (40%),  $R_f$  0,32 (Г), ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ , м.д.): 1,16 (3 Н, т,  $J$  7 Гц,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 3,71 (3 Н, с,  $\text{NCH}_3$  Apc), 3,79 (3 Н, с,  $\text{NCH}_3$  Apc), 3,90 (2 Н, с,  $\text{CH}_2$  Gly), 4,05 (2 Н, к,  $J$  7 Гц,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 6,73 (Н, д,  $J$  2 Гц, 3-Н Apc), 6,80 (Н, д,  $J$  2 Гц, 3-Н Apc), 6,89 (Н, д,  $J$  2 Гц, 5-Н Apc), 7,05 (Н, д,  $J$  2 Гц, 5-Н Apc).

*Dns-Gly-Apc-Apc-Gly-OH* (XXVI). К смеси 0,43 г (1,4 ммоль) дансилглицина (Reanal, Венгрия) и 1,4 ммоль КДИ прибавляли 1 мл абс. ДМФА и через 10 мин — 0,30 г (0,78 ммоль) соединения (XXII). Через 15 ч раствор упаривали, остаток растворяли в 2 мл метанола, осадок отфильтровывали и раствор наносили на колонку ( $2 \times 90$  см) с сефадексом LH-20. Элюцию проводили метанолом со скоростью 4 мл/ч. Фракции, содержавшие этиловый эфир кислоты (XXVI), объединяли, упаривали, остаток раство-



ряли в 10 мл метанола и прибавляли 1 мл 2 н. NaOH. Через 30 мин раствор упаривали, остаток растворяли в 20 мл воды, раствор фильтровали и подкисляли AcOH до pH 3. Осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили. Выход соединения (XXVI) 0,24 г (54%),  $R_f$  0,71 (Г), т. пл. 194–196° С, ЯМР [(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ, м.д.]: 2,76 [6 H, с, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 3,78 (6 H, с, NCH<sub>3</sub> Аpc), 3,85 (4 H, м, CH<sub>2</sub>), 6,78 (2 H, м, 3-Н Аpc), 6,99 (H, д, J 2 Гц, 5-Н Аpc), 7,18 (H, д, J 2 Гц, 5-Н Аpc), 7,73 (H, т, J 6 Гц, NHCH<sub>2</sub>), 7,14–8,23 (6 H, м, Dns), 9,80 (2 H, с, CONH).

*Ac-Apc-Apc-Gly-OH* (XXV). К раствору 0,75 г (2 ммоль) соединения (XXII) в 5 мл пиридина прибавляли раствор 0,24 г (3 ммоль) хлористого ацетила в 5 мл бензола и оставляли на 15 ч при 20° С. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 3 мл метанола и хроматографировали на колонке с сефадексом. Фракции, содержавшие соединение (XXIII) \*, объединяли, упаривали, растворяли в 15 мл метанола, прибавляли 2 мл 2 н. NaOH и через 30 мин упаривали. Остаток растворяли в 30 мл воды, раствор фильтровали и подкисляли AcOH до pH 3. Осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили. Выход соединения (XXV) 0,45 г (64%), ЯМР [(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ, м.д.]: 1,99 (3 H, с, Ac), 3,75 (3 H, с, NCH<sub>3</sub>), 3,78 (3 H, с, NCH<sub>3</sub>), 6,84 (H, д, J 2 Гц, 3-Н Аpc), 6,88 (H, д, J 2 Гц, 3-Н Аpc), 7,09 (H, д, J 2 Гц, 5-Н Аpc), 7,18 (H, д, J 2 Гц, 5-Н Аpc), 8,18 (H, т, J 7 Гц, NHCH<sub>2</sub>), 9,87 (H, с, NH Аpc), 9,93 (H, с, NH Аpc).

*Npc-Apc-Gly-OH* (XXIV). К раствору 1,2 г (3,2 ммоль) соединения (XXI) в 30 мл метанола прибавляли 3 мл 2 н. NaOH и через 30 мин раствор упаривали. Остаток растворяли в 60 мл воды, раствор фильтровали и добавляли AcOH до pH 3. Осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили. Выход соединения (XXIV) 0,79 г (71%), ЯМР [(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ, м.д.]: 3,83 (3 H, с, NCH<sub>3</sub> Аpc), 3,84 (2 H, д, J 6 Гц, NHCH<sub>2</sub>), 3,97 (3 H, с, NCH<sub>3</sub> Нpc), 6,93 (H, д, J 2 Гц, 3-Н Аpc), 7,26 (H, д, J 2 Гц, 3-Н Нpc), 7,61 (H, д, J 2 Гц, 5-Н Аpc), 8,14 (H, д, J 2 Гц, 5-Н Нpc), 8,32 (H, т, J 6 Гц, NHCH<sub>2</sub>), 10,30 (H, с, CONH).

*7-(Dns-Gly-Apc-Apc-Gly-L-Val-Glo-NH)-AM* (XVI), *7-(Npc-Apc-Gly-L-Val-Glo-NH)-AM* (XVII), *7-(Ac-Apc-Apc-Gly-L-Val-Glo-NH)-AM* (XVIII), *7-(Dns-Gly-Apc-Apc-Gly-Abu-Gly-NH)-AM* (XIX) синтезированы по следующей методике. К охлажденному до 0° С раствору 0,3 ммоль карбоксильного компонента [соединения (XXIV), (XXV) или (XXVI)] и 5,8 мг (0,05 ммоль) N-оксисукцинимиды в 5 мл абс. ДМФА прибавляли при перемешивании 10,3 мг (0,05 ммоль) ДЦК, в течение 5 мин температуре давали подняться до 20° С, после чего раствор приливали к 10 мл раствора 0,015 ммоль аминокомпонента [соединение (IV) или (XII)] в смеси абс. бензола и абс. пиридина (4:1). Реакционный раствор оставляли на ночь при 20° С и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в этилацетате, отмывали 1 н. HCl от окрашенных примесей, затем промывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> и водой. Органический раствор сушили и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонках с силикагелем (2,5×20 см; система В) и с сефадексом в метаноле. Выход соединений (XVI–XVIII) 5–10%, (XIX) – 30%;  $R_f$ : (XVI) 0,17, (XVII) – 0,29, (XVIII) – 0,28, (XIX) – 0,21 (в системе А). Соединение (XVII), ЯМР (CD<sub>3</sub>OD, δ, м.д.): 0,70–1,40 [м, CH<sub>3</sub> (Val, MeVal, Thr)], 1,89–2,26 [9 H, м, CH<sub>2</sub> (Pro), β-Н (Val, MeVal)], 2,24 (3 H, с, 4-CH<sub>3</sub>), 2,75 (3 H, с, 6-CH<sub>3</sub>), 2,87 [(6 H, с, NCH<sub>3</sub> (Sar или MeVal)], 2,99 [(6 H, м, NCH<sub>3</sub> (MeVal или Sar)], 3,53–4,05 [15 H, м, NCH<sub>2</sub> (Pro), α-Н (Val, MeVal, Thr), CH<sub>2</sub> (Sar)], 3,75 (3 H, с, NCH<sub>3</sub> Аpc), 4,07 (3 H, с, NCH<sub>3</sub> Нpc), 6,16 (2 H, м, α-Н Pro), 7,38–8,18 (5 H, м, Ar).

\* ЯМР ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ, м.д.): 1,16 (3 H, т, J 7 Гц, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1,96 (3 H, с, Ac), 3,78 (3 H, с, NCH<sub>3</sub>), 3,81 (3 H, с, NCH<sub>3</sub>), 3,86 (2 H, д, J 7 Гц, NHCH<sub>2</sub>), 4,10 (2 H, к, J 7 Гц, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,82 (H, д, J 2 Гц, 3-Н Аpc), 6,90 (H, д, J 2 Гц, 3-Н Аpc), 7,11 (H, д, J 2 Гц, 5-Н Аpc), 7,20 (H, д, J 2 Гц, 5-Н Аpc), 8,31 (H, т, J 7 Гц, NHCH<sub>2</sub>).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Никитин С. М., Жузе А. Л., Крылов А. С., Готтх Б. П. Лиганды, обладающие сродством к определенным парам оснований ДНК. IV. Аналоги актиномицина D. Амидные производные актинодина с заместителями в положении 7.— Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 5, с. 743—751.
2. Goldberg I. H., Rabinowitz M., Reich E. Basis of actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reaction by actinomycin.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1962, v. 48, № 12, p. 2094—2101.
3. Sobell H. M., Jain S. C. Stereochemistry of actinomycin binding to DNA. II. Detailed molecular model of actinomycin—DNA complex and its implications.— J. Mol. Biol., 1972, v. 68, № 1, p. 21—34.
4. Гурский Г. В. Структура комплекса ДНК—актиномицин.— Молекулярная биология, 1969, т. 3, вып. 5, с. 749—757.
5. Sengupta S. K., Schaer D. The interaction of 7-substituted actinomycin D analogs with DNA.— Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 521, № 1, p. 89—100.
6. Михайлов М. В., Никитин С. М., Заседателев А. С., Жузе А. Л., Гурский Г. В., Готтх Б. П. Связывание аналогов актиномицина D, содержащих заместители в положении 7 хромофора антибиотика, с ДНК.— Молекулярная биология, 1979, т. 13, вып. 6, с. 1322—1326.
7. Заседателев А. С., Жузе А. Л., Циммер К., Гроховский С. Л., Тумилян В. Г., Гурский Г. В., Готтх Б. П. Стереохимическая модель молекулярного механизма «узнавания» АТ-пар при связывании с ДНК антибиотиков дистамицина А и нетропсина.— Докл. АН СССР, 1976, т. 231, № 4, с. 1006—1009.
8. Колчинский А. М., Мирзабеков А. Д., Заседателев А. С., Гурский Г. В., Гроховский С. Л., Жузе А. Л., Готтх Б. П. О структуре комплексов антибиотиков дистамицинового типа и актиномицина D с ДНК; новые экспериментальные данные о локализации антибиотиков в узкой бороздке ДНК.— Молекулярная биология, 1975, т. 9, вып. 1, с. 19—27.
9. Sheehan J. C., Frank V. S. A new synthetic route to peptides.— J. Amer. Chem. Soc., 1949, v. 71, № 5, p. 1856—1861.
10. Schwyzer R., Costopanagiotis A., Sieber P. Neue Synthesen auf dem Gebiete der melanophorenstimulierenden und corticotropen Hormone.— Chimia, 1962, v. 16, № 9, p. 295—298.
11. Михайлов М. В., Никитин С. М., Заседателев А. С., Жузе А. Л., Гурский Г. В., Смирнов И. В., Готтх Б. П. Изучение связывания с ДНК аналогов актиномицина D, содержащих заместители в положении 7 хромофора антибиотика.— Биофизика, 1980, т. 25, № 6, с. 803—808.
12. Yamaoka K., Ziffer H. The Optical properties of actinomycin D. II. Optical activity of the deoxyribonucleic acid complex.— Biochemistry, 1968, v. 7, № 3, p. 1001—1008.
13. Zimmer Ch. Effects of the antibiotics netropsin and distamycin A on the structure and function of nucleic acid.— In: Progress in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol. (Cohn W. F., ed.). N. Y.— San Francisco—London: Acad. Press, 1975, v. 15, p. 285—318.
14. Синтезы органических препаратов. Т. 1. М.: ИЛ, 1949, с. 357—364.
15. Angerman N. S., Victor T. A., Bell C. L., Danyluk S. S. A proton magnetic resonance study of the aggregation of actinomycin D in D<sub>2</sub>O.— Biochemistry, 1972, v. 11, № 13, p. 2402—2411.
16. Губен И. Методы органической химии. Т. 3. М.—Л.: Госхимтехиздат, 1935, с. 364.
17. Гроховский С. Л., Жузе А. Л., Готтх Б. П. Лиганды, обладающие сродством к определенным парам оснований ДНК. I. Синтез дистамицина А и его аналогов с различным числом N-метил- и N-пропилпиррольных остатков в молекуле.— Биоорганическая химия, 1975, т. 1, № 11, с. 1616—1623.

Поступила в редакцию  
17.VII.1980

### DNA BASE PAIR SEQUENCE SPECIFIC LIGANDS. V. ACTINOMYCIN D ANALOGS SUBSTITUTED AT POSITION 7 OF PHENOXAZONE CHROMOPHORE

NIKITIN S. M., GROKHOVSKY S. L., ZHUZE A. L.,  
MIKHAILOV M. V., ZASEDATELEV A. S., GURSKY G. V.,  
GOTTIKH B. P.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A number of 7-substituted analogs of actinomycin D were synthesized as a tool to study the mechanism of the antibiotic interaction with DNA. To obtain ligands with affinities for definite sequences of DNA, the compounds were synthesized in which (i) two 7-aminoactinomycin D moieties are bound by depsipeptide chains of various lengths and (ii) the 7-aminoactinomycin D moiety is bound to different analogs of antibiotic distamycin A.