



УДК 615.33+547.963.32.07

ЛИГАНДЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ СРОДСТВОМ К ОПРЕДЕЛЕННЫМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ ПАР ОСНОВАНИЙ ДНК

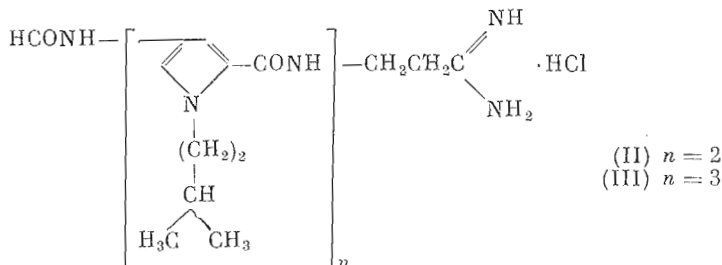
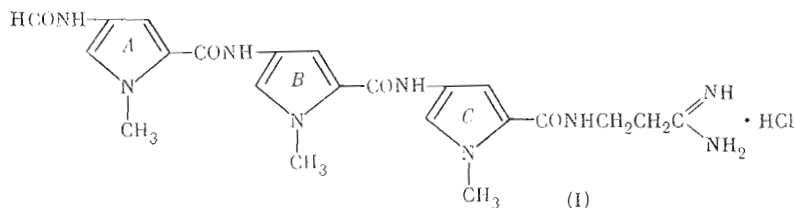
VII. СИНТЕЗ АНАЛОГОВ ДИСТАМИЦИНА А, СОСТОЯЩИХ ИЗ ДВУХ И ТРЕХ N-ИЗОАМИЛПИРРОЛКАРБОКСАМИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ, И АНАЛОГА, СОДЕРЖАЩЕГО МЕТИЛАМИДНЫЕ СВЯЗИ В МОЛЕКУЛЕ*

Гроховский С. Л., Жузе А. Л., Готтих В. П.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Синтезированы два аналога дистамицина А, содержащих в молекуле два и три 1-изоамил-4-аминопиррол-2-карбоксамидных фрагмента, а также аналог, в котором две амидные связи из трех заменены на метиламидные.

В продолжение исследований по изучению взаимодействия двуцепочечной ДНК с АТ-специфичным антибиотиком дистамицином А (I) нами синтезированы два его аналога (II) и (III), содержащие в молекулах N-изоамилпиррольные циклы вместо N-метилпиррольных.



Согласно предложенной ранее модели комплекса дистамицина А с ДНК [2], приведенной на рис. 1, замена метильных радикалов у атомов азота пиррольных циклов на изоамильные не должна оказать существенного влияния на способность таких аналогов связываться с ДНК, поскольку алкильный радикал у атомов азота пиррольных циклов направлен из узкой бороздки ДНК наружу. Мы также предполагали, что введение в молекулу антибиотика объемистых гидрофобных заместителей может изменить способность модифицированного антибиотика проникать через клеточные мембраны, не отражаясь на специфичности связывания с ДНК.

Синтез N-изоамильных аналогов дистамицина А был проведен по схеме 1. Соединение (VII), содержащее два N-изоамилпиррольных цикла, получали конденсацией хлорангидрида 1-изоамил-4-нитропиррол-2-карбо-

* Сообщение VI см. [1]. Сокращения: Npc(Me) — остаток 1-метил-4-нитропиррол-2-карбоновой кислоты; Npc(Amⁱ) — остаток 1-изоамил-4-нитропиррол-2-карбоновой кислоты; Arc(Me) — остаток 1-метил-4-аминопиррол-2-карбоновой кислоты; Arc(Amⁱ) — остаток 1-изоамил-4-аминопиррол-2-карбоновой кислоты; MeArc(Me) — остаток 1-метил-4-метиламинопиррол-2-карбоновой кислоты; DMF — диметилформамид.

Схема 1

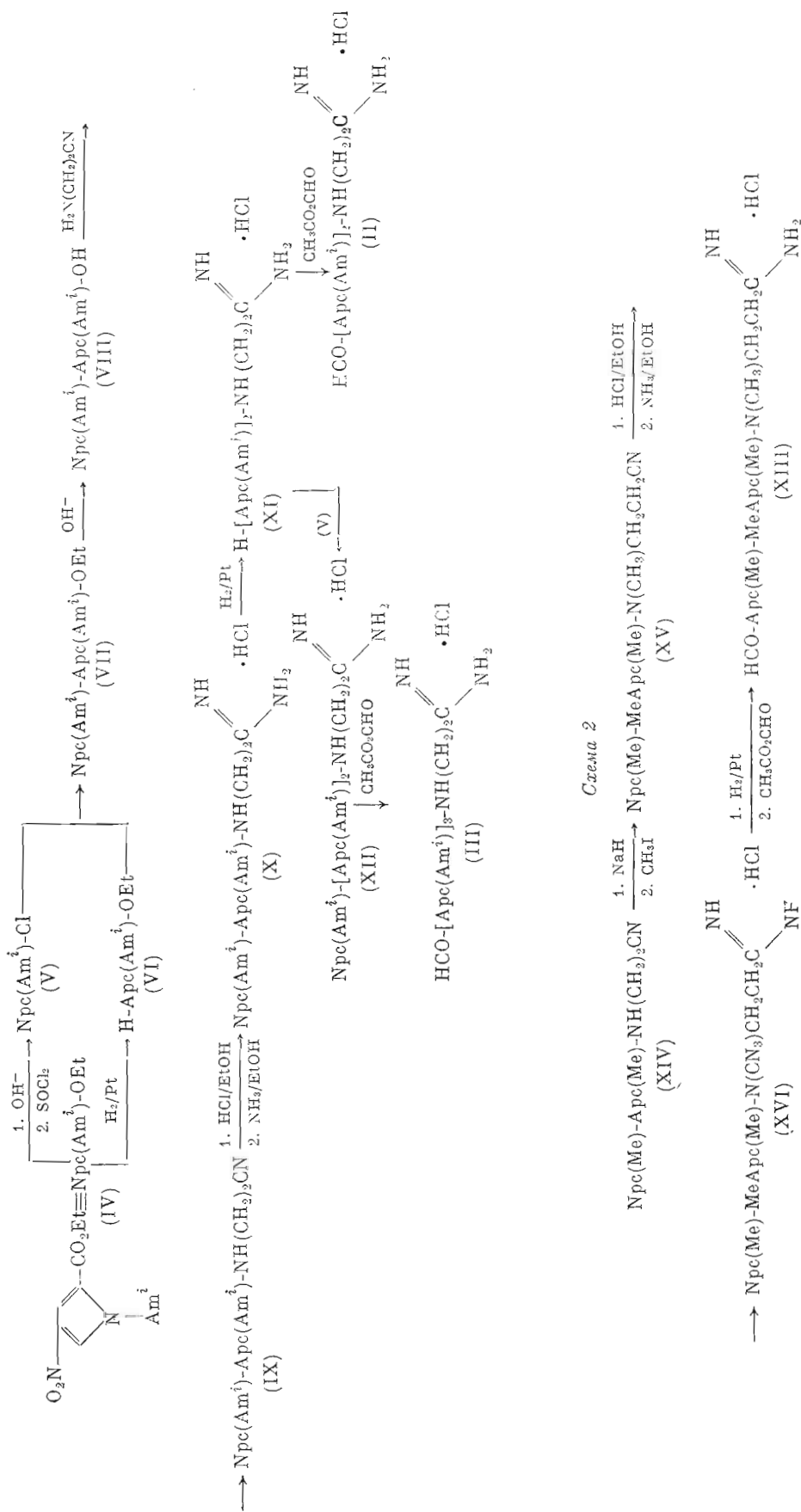
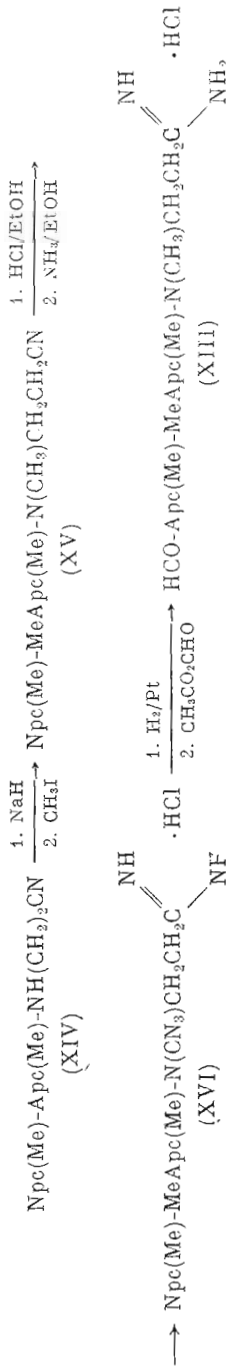


Схема 2



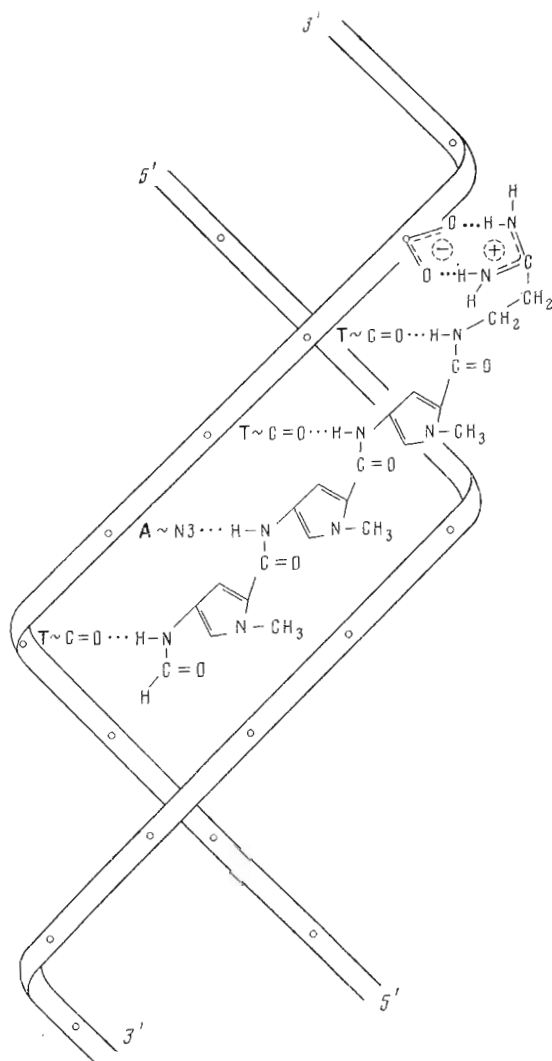


Рис. 1. Модель комплекса дистамицина А с ДНК [2]

новой кислоты (V) * с этиловым эфиром 1-изоамил-4-аминопиррол-2-карбоновой кислоты (VI). После омыления этилового эфира (VII) нитрохлориду (VIII) конденсировали с помощью карбонилдимидазола с β -аминопропионитрилом, нитрильную группу в полученном соединении (IX) превращали в хлоридат амидина последовательной обработкой растворами HCl и NH₃ в этаноле. Аминоамидин (XI) получали гидрированием нитросоединения (X) над катализатором Адамса. Обработка соединения (XI) формилуксусным ангидридом привела к аналогу (II), содержащему два N-изоамилпиррольных цикла. Конденсацией аминоамидина (XI) с хлорангидридом (V) был получен нитроамидин (XII), гидрирование и последующее формилирование которого привело к аналогу (III), содержащему три N-изоамилпиррольных цикла.

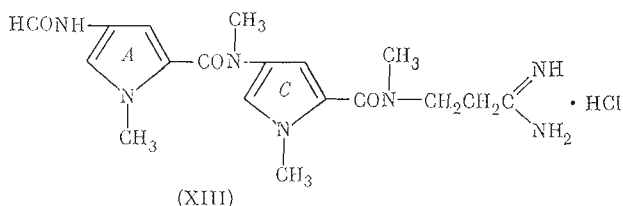
Изучение связывания соединений (II) и (III) с ДНК и синтетическими полидезоксирибонуклеотидами методами КД- и УФ-спектроскопии [4] показало, что они проявляют высокое сродство к ДНК и полидезоксирибонуклеотидам, содержащим А·Т-пары оснований. Характер оптических эффектов, проявляемый этими аналогами при связывании, сходен с оптическими эффектами, проявляемыми при связывании с ДНК N-метильными и N-пропильными аналогами дистамицина А. Эти данные подтверждают сделанные ранее предположения о том, что заместители при атомах азота пиррольных циклов в комплексе антибиотика с ДНК направлены

* Методики синтеза соединений (V)–(VIII) описаны в работе [3].

из узкой бороздки ДНК наружу [2]. Результаты определения угла наклона пиррольных циклов относительно оси ДНК у аналогов дистамицина А с различными заместителями у атомов азота, полученные измерением анизотропии поглощения этих комплексов в потоке [5], также свидетельствуют о том, что введение в положение 1 пиррольных колец дистамицина А объемистых заместителей не оказывает существенного влияния на геометрию их комплексов с ДНК.

Биологические испытания N-изоамильных аналогов (II) и (III) на клетках культуры ткани показали, что они обладают высокой цитотоксичностью [6]. Аналог (II) с двумя N-изоамилпиррольными циклами оказался токсичнее дистамицина более чем в 10 раз, а аналог (III) с тремя N-изоамилпиррольными циклами — более чем в 20 раз. Одной из возможных причин этого факта может быть то, что введение в молекулу антибиотика гидрофобных заместителей усиливает его способность проникать через клеточные мембраны.

Как видно из модели комплекса дистамицина А с ДНК (см. рис. 1), специфичность связывания антибиотика с А·Т-парами ДНК обусловлена образованием водородных связей между NH-группами амидных связей дистамицина А и атомами O2 остатков тимина и N3 остатков аденина, расположенными в узкой бороздке ДНК. Для исследования влияния модификации амидных групп на образование комплекса дистамицина А с ДНК нами было синтезировано соединение (XIII), в котором две амидные связи из трех были заменены на метиламидные.



Синтез аналога (XIII) был проведен по схеме 2. Метилирование нитронитрила (XIV) [7] проводилось по методу, разработанному для метилирования амидных групп в N-защищенных α-аминокислотах [8], который заключается в последовательной обработке вещества гидридом натрия в DMF и иодистым метилом. Нитрильная группа соединения (XV) обычным методом превращалась в амидиновую и в полученном нитроамидине (XVI) нитрогруппу восстанавливали гидрированием над катализатором Адамса. Образовавшийся амин без выделения конденсировали с формилуксусным ангидридом с образованием соединения (XIII).

Измерение связывания аналога (XIII) с ДНК методом КД [9] показало, что он не проявляет заметного сродства к ДНК. Тем не менее эти данные могут служить только косвенным свидетельством в пользу участия амидных групп в связывании антибиотика с ДНК. Изучение конформации модельных соединений, содержащих метиламидную связь,

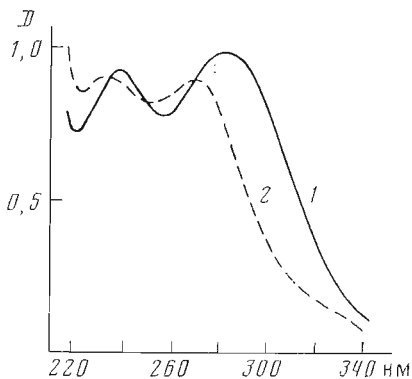
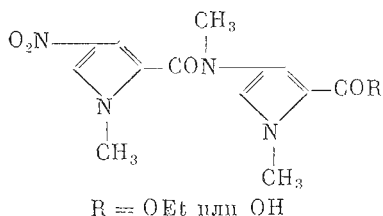


Рис. 2. Спектры поглощения Nrc-Arc-OEt (1) [3] и Nrc-MeArc-OEt (2) в метаноле

методом ^1H -ЯМР [3] показало, что они находятся в растворе как в *транс*-, так и в *цис*-конформации относительно метиламидной связи, в отличие от соединений с амидной связью, для которых характерна только *транс*-конформация. Можно предположить поэтому, что и конформация аналога (XIII) также отличается от конформации соответствующего неметилированного производного. Об этом, в частности, свидетельствует характерный сдвиг максимума поглощения при 300 нм в коротковолновую область спектра у соединений, содержащих метиламидную связь между пиррольными циклами (см. рис. 2). По предварительным данным, аналоги дистамицина А, содержащие две амидные и одну метиламидную группировку, также не связываются с ДНК.

Экспериментальная часть

Общие методы, использованные в работе, описаны в предыдущем сообщении [4]. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре «Векшман-25» (США). Для ТСХ использовали следующие системы растворителей: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1 (А); 1 М ацетат аммония (рН 7,6) — 96% этанол, 3:7 (Б); изопропанол — конц. водный аммиак — вода, 7:1:3 (В); хлороформ — абс. этанол, 95:5 (Г). Условные обозначения пиррольных циклов (А, В, С) приведены на рисунках в тексте.

Npc(Amⁱ)-Apc(Amⁱ)-NH(CH₂)₂CN (IX). 5,0 г (12,3 ммоль) соединения (VIII) [3] растворяли в 25 мл абс. DMF и к раствору добавляли 13 ммоль *N,N'*-карбонилдимидазола (Fegak, ФРГ). Через 30 мин к раствору прибавляли 4,0 г (75 ммоль) β-аминопропионитрила [10] и реакционную смесь оставляли на 72 ч при 20°С. Раствор упаривали, образовавшееся масло перекристаллизовывали из водного этанола. Выход соединения (IX) 3,9 г (69%), т. пл. 138–142°С. *R_f* 0,87 (А), 0,90 (Б), 0,22 (Г). ПМР (CD₃OD, δ, м.д.): 8,09 д (5-H^А), 7,47 д (5-H^С), 7,59 д (3-H^А), 7,13 д (3-H^С), 4,59 м (NCH₂^{А,С}), 3,75 т (NHCH₂), 2,7 т (CH₂CN), 1,6 м (CH₂CH), 0,9 м (CH₃).

Npc(Amⁱ)-Apc(Amⁱ)-NH(CH₂)₂C(=NH)NH₂·HCl(X). 4,0 г (8,8 ммоль) соединения (IX) растворяли при 0°С в 100 мл абс. этанола, насыщенного HCl, и оставляли при 4°С на 20 ч. Раствор упаривали, остаток несколько раз упаривали с абс. этанолом и к остатку при 0°С прибавляли 100 мл абс. этанола, насыщенного NH₃. Реакционную смесь оставляли при 4°С на 3 ч и затем упаривали. Остаток упаривали несколько раз с абс. этанолом, растворяли в небольшом объеме метанола и наносили на колонку (3×150 см) с сефадексом LH-20. Элюировали метанолом со скоростью 10 мл/ч, собирая фракции по 15 мл. Фракции, содержавшие соединение (X), объединяли и упаривали. Выход соединения (X) 3,7 г (82%) (масло). *R_f* 0,53 (А), 0,63 (Б), 0,42 (В). ПМР [DCON(CD₃)₂, δ, м.д.]: 10,54 с (NH^{А,С}), 8,60 т (NH^С), 8,22 д (5-H^А), 7,77 д (3-H^А), 7,48 д (5-H^С), 7,09 д (3-H^С), 4,58 м (NCH₂^А), 4,40 м (NCH₂^С), 3,7 т (NHCH₂), 2,9 т (NHCH₂CH₂), 1,65 м (CH₂CH), 0,94 м (CH₃).

HCO-[Apc(Amⁱ)]₂-NH(CH₂)₂C(=NH)NH₂·HCl (II). 0,50 г (1 ммоль) соединения (X), растворенного в смеси 8 мл этанола и 0,25 мл 6 н. водной HCl, гидрировали в присутствии 0,2 г катализатора Адамса до прекращения поглощения водорода. Катализатор отфильтровывали, к раствору добавляли 0,28 мл (2 ммоль) триэтиламина и упаривали. К остатку добавляли формилуксусный ангидрид, полученный выдерживанием при 55°С в течение 2 ч смеси 1,7 мл 99,5% муравьиной кислоты и 3,9 мл уксусного ангидрида. Раствор оставляли на 2 ч при 20°С и затем упаривали. Остаток несколько раз упаривали с абс. этанолом, растворяли в небольшом объеме метанола и наносили на колонку с сефадексом LH-20. Разделение проводили дважды в условиях, описанных в предыдущей методике. Выход соединения (II) после лиофилизации 0,28 г (56%). *R_f* 0,43 (А), 0,54 (Б), 0,36 (В). ПМР (CD₃OD, δ, м.д.): 8,11 с (HCO), 7,22 м

* с — синглет, д — дублет, т — триплет, к — квадруплет, м — мультиплет.

(5-Н^А), 6,88 д (3-Н^А), 6,83 д (3-Н^С), 4,30 т (NCH₂), 3,62 т (NHCH₂), 2,71 т (NHCH₂CH₂), 1,58 м (CH₂CH), 0,87 м (CH₃). $\epsilon_{236} = (21,3 \pm 0,5) \cdot 10^3$, $\epsilon_{295} = (21,8 \pm 0,5) \cdot 10^3$ (H₂O).

Nrc(Amⁱ)-[Arc(Amⁱ)]₂-NH(CH₂)₂C(=NH)NH₂·HCl (XII). 1,0 г (2 ммоль) соединения (X) восстанавливали до аминопроизводного (XI) в условиях, аналогичных описанным в предыдущей методике, растворяли в смеси 5 мл абс. этанола и 1,4 мл триэтиламина и прибавляли раствор хлорангидрида (V) в 5 мл бензола. (Хлорангидрид получали кипячением 0,70 г (3,1 ммоль) *Nrc(Amⁱ)-OH* [3] с 10 мл SOCl₂ и 0,02 мл DMF в течение 1 ч. SOCl₂ упаривали досуха и полученный остаток многократно упаривали с бензолом.) Реакционную смесь оставляли на 15 ч при 20°С, упаривали и дважды подвергали разделению на сефадексе LH-20 в условиях, аналогичных вышеописанным. Выход соединения (XII) 0,57 г (41%). *R_f* 0,66 (А), 0,81 (Б), 0,65 (В). ПМР (CD₃OD, δ, м.д.): 8,21 д (5-Н^А), 7,84 д (3-Н^А), 7,3 м (5-Н^{В,С}), 6,9 м (3-Н^{В,С}), 4,6 м (NCH₂), 3,6 т (NHCH₂), 2,8 т (NHCH₂CH₂), 1,6 м (CH₂CH), 0,9 м (CH₃).

HCO-[Arc(Amⁱ)]₃-NH(CH₂)₂C(=NH)NH₂·HCl (III) получали по методике, аналогичной методике синтеза соединения (II), исходя из 0,8 ммоль соединения (XII). Выход соединения (III) 33%, *R_f* 0,48 (А), 0,67 (Б), 0,58 (В), ПМР (CD₃OD, δ, м.д.): 8,12 с (HCO), 7,24 м (5-Н^{А, В, С}), 6,8–7,0 м (3-Н^{А, В, С}), 4,36 м (NCH₂), 3,65 т (NHCH₂), 2,7 т (NHCH₂CH₂), 1,6 м (CH₂CH), 0,9 м (CH₃).

Nrc(Me)-MeArc(Me)-N(CH₃)CH₂CH₂CN (XV). 0,60 г (25 ммоль) NaH суспендировали в 20 мл абс. DMF, перемешивали 15 мин при 30°С и прибавляли 0,60 г (4,8 ммоль) соединения (XIV) [7]. При этом выделялся водород и раствор окрашивался в красный цвет. Через 15 мин к смеси по каплям прибавляли 3 мл CH₃I и суспензию перемешивали 2 ч при 30°С. Реакционную смесь выливали в 300 мл воды, содержащей 3 мл АсОН. Продукт реакции экстрагировали хлороформом (3×50 мл), экстракт промывали водой, высушивали и упаривали. Остаток растворяли в небольшом объеме метанола и напосили на колонку (2×115 см) с сефадексом LH-20. Элюцию проводили метанолом при 4°С со скоростью 5 мл/ч, собирая фракции по 10 мл. Получали 0,48 г (74%) соединения (XV) в виде бесцветного масла. *R_f* 0,49 (А), 0,64 (Б). ПМР (CD₃OD, δ, м.д.): 7,81 д (5-Н^А), 6,96 м (3-Н^А), 6,53 м (5-Н^С), 6,50 м (3-Н^С), 3,90 с (NCH₃^А), 3,69 с (NCH₃^С), 3,38 с (CONCH₃^А), 3,27 с (CONCH₃^С), 3,5 м (NCH₂), 2,76 т (CH₂CN), *m/e*: 372 (*M*⁺).

Nrc(Me)-MeArc(Me)-N(CH₃)CH₂CH₂C(=NH)NH₂·HCl (XVI). Синтез проводили по методике, аналогичной методике синтеза соединения (X), исходя из 1 ммоль соединения (XV). Выход соединения (XVI) 64% (масло), *R_f* 0,15 (А), 0,36 (Б). ПМР (CD₃OD, δ, м.д.): 7,77 м (5-Н^А), 6,96 м (3-Н^А), 6,53 м (5-Н^С), 6,47 м (3-Н^С), 3,88 с (NCH₃^А), 3,72 с (NCH₃^С), 3,41 с (CONCH₃^А), 3,22 с (CONCH₃^С), 3,6 м (NCH₂), 2,8 т (CH₂CNH₂).

HCO - Arc(Me)-MeArc(Me)-N(CH₃)CH₂CH₂C(=NH)NH₂·HCl (XIII). Синтез проводили по методике, аналогичной методике синтеза соединения (II), исходя из 0,5 ммоль соединения (XVI). Выход соединения (XIII) 52% (масло), *R_f* 0,12 (А), 0,30 (Б). ПМР (CD₃OD, δ, м.д.): 7,97 с (HCO), 6,94 д (5-Н^А), 6,80 д (5-Н^С), 6,24 д (3-Н^А), 5,96 д (3-Н^С); 3,66 с, 3,62 с (NCH₃), 3,7 м (NCH₂), 3,2 с (CONCH₂^А), 3,09 с (CONCH₃^С), 2,7 т (CH₂CH₂).

Авторы выражают благодарность О. В. Туриной за параболку препаративных количеств этилового эфира 4-нитропиррол-2-карбоновой кислоты и В. М. Орлову за съемку масс-спектра.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хорлин А. А., Гроховский С. Л., Жузе А. Л., Готтих Б. П. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 8, с. 1063–1069.
2. Заседателева 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.
3. Турчин К. Ф., Гроховский С. Л., Жузе А. Л., Готтих Б. П. Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1065–1077.

4. Gursky G. V., Tumanyan V. G., Zasedatelev A. S., Zhuze A. L., Grokhovskiy S. L., Gottikh B. P. In: Nucleic acid - protein recognition / Ed. Vogel H. J. N. Y. - San Francisco - London: Acad. Press, 1977, p. 189-217.
5. Свешников П. Г., Гроховский С. Л., Жузе А. Л., Кондрагьева Н. О., Макаров В. Л., Полегаев А. И. Молекулярн. биология, 1978, т. 12, № 3, с. 557-563.
6. Гончарская Т. Я., Навашин С. М., Гроховский С. Л., Жузе А. Л. Антибиотики, 1977, т. 22, № 11, с. 998-1002.
7. Гроховский С. Л., Жузе А. Л., Готтих Б. П. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1078-1086.
8. Coggins J. R., Benoiton N. L. Canad. J. Chem., 1971, v. 49, p. 1938-1971.
9. Крылов А. С., Гроховский С. Л., Заседателев А. С., Жузе А. Л., Гурский Г. В., Готтих Б. П. Биофизика, 1979, т. 24, № 1, с. 181-188.
10. Синтезы органических препаратов. Т. 4, М.: ИЛ, 1953, с. 46-47.

Поступила в редакцию
10.III.1982

**DNA BASE PAIR SEQUENCE SPECIFIC LIGANDS. VII. SYNTHESIS OF THE
DISTAMYCIN A ANALOGS CONSISTING OF TWO OR THREE
N-ISOAMYLPIRROL-CARBOXAMIDE FRAGMENTS AND THE ANALOG
CONTAINING METHYLAMIDE BONDS IN THE MOLECULE**

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

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

There were synthesized two analogs of distamycin A which contain in their structures two and three 1-isoamyl-4-aminopyrrol-2-carboxamide fragments. A third analog consisted of two 1-methyl-4-aminopyrrol units, wherein two out of its three amide bonds are substituted for methylamide ones.