



УДК 547.96:541.69:577.182.03

ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ СТРОЕНИЕМ И СВОЙСТВАМИ ЦИКЛОДЕНСИПЕПТИДОВ ВАЛИНОМИЦИНОВОГО РЯДА

X*. [L-Pro², L-Pro⁶, L-Pro¹⁰]ВАЛИНОМИЦИН
И [D-Pro⁴, D-Pro⁸, D-Pro¹²]ВАЛИНОМИЦИН

*Балашова Т. А., Фомина Л. А., Гуревич А. В.,
Старовойтова Н. В., Сенявина Л. Б., Авотинь Г. Я.,
Иванов В. Т., Овчинников Ю. А.*

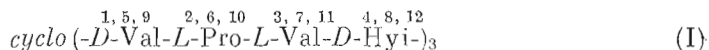
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

Спектральными, экстракционным и кондуктометрическим методами изучены конформационные и ионофорные свойства двух аналогов валиномицина: *cyclo*[-(D-Val-L-Pro-L-Val-D-Hyⁱ)₃-] (I) и *cyclo*[-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Pro)₃-] (II). Показано, что замена в валиномицине остатков молочной кислоты на остатки L-пролина приводит к полной дестабилизации конформаций, характерных для валиномицина: аналог (I) в растворе существует в виде сложного набора пространственных форм как с *цис*-, так и с *транс*-конфигурацией третичной амидной связи. Конформации основных форм аналога (II) подобны валиномициновым: «браслетная» конформация в неполярных средах и «пропеллерная» в полярных. Кроме того, в растворе присутствует до 20% минорных форм, в том числе форм с *цис*-конфигурацией одной или двух связей L-Val-D-Pro.

Депсипептид (I) является слабым комплексоном; конформация его комплексов со щелочными металлами не обладает элементами симметрии. Пространственная структура депсипептидной цепи комплексов соединения (II) аналогична структуре комплексов валиномицина. В метаноле и этаноле образуются комплексы с соотношением макроцикл — катион 2 : 1.

Для исследованных аналогов наблюдается корреляция между способностью связывать катионы в гомогенных средах и способностью переносить эти ионы из водной среды в органическую.

В работе продолжено исследование пролинсодержащих аналогов мембраноактивного антибиотика валиномицина. Были изучены аналоги валиномицина, отличающиеся от него заменой остатков молочной и D-α-оксизовалериановой кислоты соответственно на остатки L- и D-пролина:



При постановке этой работы мы учитывали, что соединения (I) и (II) занимают по своей структуре промежуточное положение между валиномицином и пролиномицином. Последний является синтетическим циклодесипептидом, образующим чрезвычайно устойчивые комплексы со щелочными катионами и существенно отличающимися от валиномицина по механизму трансмембранного переноса ионов [2—4]. С другой стороны, данную работу можно рассматривать как логическое продолжение исследований, рассмотренных в сообщении VII [5] и посвященных аналогам валиномицина с модифицированными сложноэфирными группами.

Как и в предыдущих работах настоящей серии, метод КД-спектроскопии использовался в основном для характеристики конформационной подвижности пептида и обнаружения конформационных перестроек при смене растворителя или в результате комплексообразования. С помощью

* Сообщение IX см. [1].

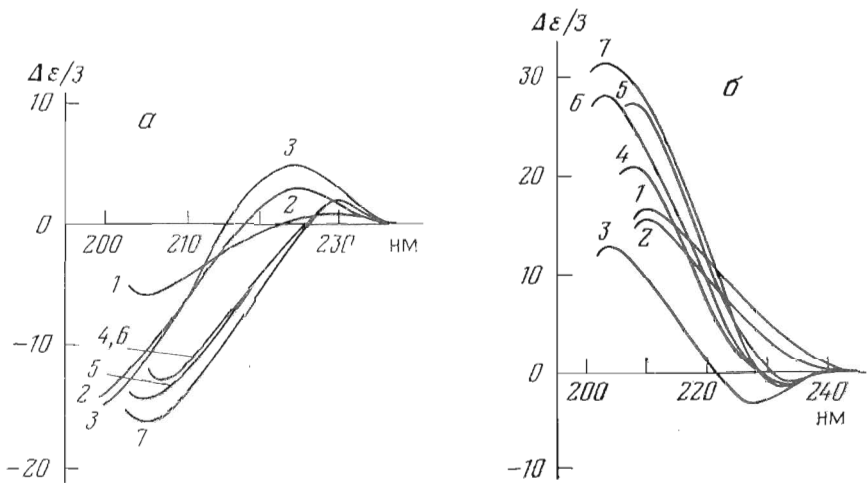


Рис. 1. Кривые КД соединений (I) (а) и (II) (б): 1 - гептан - диоксан, 2: 1,5 (а) и 1: 2,5 (б), 2 - EtOH, 3 - EtOH-H₂O, 1: 5 (а) и 1: 1 (б), 4 - 1 M NaClO₄, 5 - 0,7 · 10⁻² M KCl, 6 - 2,0 · 10⁻² M CsCl, 7 - 6 · 10⁻³ M RbCl

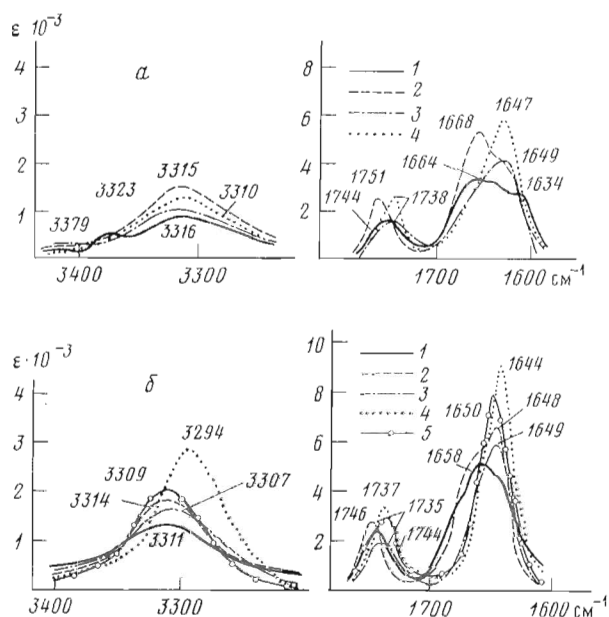


Рис. 2. ИК-спектры соединений (I) (а) и (II) (б) в CHCl₃ (1), CCl₄ (2), их Na⁺-комплексов в CHCl₃ (3), K⁺-комплексов в CHCl₃ (4), Cs⁺-комплексов в CHCl₃ (5)

ИК-спектров характеризовалось состоянием карбонильных групп и участие групп NH во внутримолекулярных водородных связях (ВМВС); дальнейшая детализация структуры проводилась на основании спектров ЯМР, дающих наиболее обширную информацию.

Рассмотрим вначале данные по структуре свободных соединений (I) и (II). Их спектры КД (рис. 1), хотя и недостаточно информативные, указывают на протекание конформационных перестроек при переходе от смеси гептан - диоксан к этанолу или к смеси этанол - вода.

В ИК-спектрах соединения (I) в CCl₄ (рис. 2а) кроме полосы с ν_{NH} 3315 см⁻¹ присутствует широкая полоса с ν_{NH} 3420 см⁻¹, а в CHCl₃ - полосы с ν_{NH} 3420 и 3375 см⁻¹, что указывает на присутствие в молекуле как свободных, так и слабосвязанных групп NH. Соединение (I) в CDCl₃ дало чрезвычайно сложный, практически не интерпретируемый спектр

Химические сдвиги (м. д.)^{1*} и константы спин-спинового взаимодействия ^{2*} (Пн, в скобках) протонов соединений (I) и (II) и их комплексов
 В квадратных скобках приведены значения $(\Delta\delta/\Delta T) \cdot 10^3$, м. д./град (t 25–30° С.)

Соединение	Растворитель	Концентрация, 10^{-2} М	Фрагмент										Содержание форм, %	
			C ^δ H _c (Fro)		C ^α H остатков				NH остатков					
			1, 5, 9	3, 7, 11	2, 6, 10	4, 8, 12	1, 5, 9	3, 7, 11						
(I)	CDCl ₃	~1	3,3–5,5										7,0–8,5	
	CD ₃ CN	~1	Спектры аналогичного вида										7,36[2,3] (4,6); 7,96[2,2] (4,6)	
	C ₆ D ₁₂ – (CD ₃) ₂ CO, 1:1	~1											5,12(2,2) 4,03(10,2)	3,90(10,3)
	C ₂ D ₅ OH	0,8	3,85(11,4)	4,40(11,0)	4,87(7,9) ^{3*}	6,09(1,9)	8,23[4,6] (5,4); 8,66[3,7] (10,0)							
CD ₂ C ₆ D ₁₄	0,8	3,06 3,50	3,31 4,30	4,12(9,5)	3,76(10,2)	4,39(9,0) ^{3*}	7,17[0,7] (10,2)	8,34[5,9] (5,4)	100 ^{4*}					
(II)	CCl ₄	5,0	3,53	4,22	4,18(9,6)	3,67(10,4)	4,38(8,5) ^{3*}	7,26(10,2)	8,50(5,2)	100				
	C ₆ D ₁₂	0,6	3,41	4,22	4,31 4,30(9,3)	3,99(10,2)	4,58 4,56(10,0) ^{3*}	7,31 8,31[1,5] (10,4)	8,38 8,39[9,8] (6,1)	100				
	CDCl ₃	0,15	3,59	4,24	3,74(11,3)	3,90(10,7)	4,40(7,4) ^{3*}	7,89[2,0] (6,0); 8,35[2,4] (4,8)	8,08(7,0); 8,47(4,9)	75–80 (форма A)				
	CDCl ₃	2,5	3,57	4,25	4,25(9,4)	3,80(10,2)	4,47(6,0) ^{3*}	7,35[2,4] (10,4)	8,51[5,4] (5,5)	10–15 (форма B) 5–10				
CD ₂ C ₆ D ₁₄	1,4	3,54	4,30						85					

Соедине- ние	Растворитель	Концент- рация, 10 ⁻⁴ M	Фрагмент						Содержание форм. %
			C α H (Pro)	C α H остатков			NH остатков		
				1, 5, 9	3, 7, 11	2, 6, 10	4, 8, 12	1, 5, 9	
(II)	CCl ₄ -(CD ₃) ₂ SO, 9:1	5,0	4,80	3,86	5,98(6,6)	5,08(9,9) ** 5,11(8,8) **	7,30[3,0] (10,7); 8,13[8,2] (11,9) 7,38[3,0] (8,7); 8,30[8,6] (9,8) 7,40[3,0]; 8,55[6,0] (6,0)	15	
	(CD ₃) ₂ SO	5,0	4,83 (<3)	3,96(10,4)	5,51(6,8)	4,43(8,3) **	7,16[1,0] (10,0) 8,91[9,7] (5,9)		
	CD ₃ OH	6,1	4,59(4,9)	4,26(10,8)	5,06(6,6)	4,61(10,8) **	7,44[2,5] (10,0) 8,59[6,0] (7,6) ($\tau_{1/2} \geq 6$ ч) ($\tau_{1/2} \sim 2,5$ ч)		
							7,46(8,0); 8,08(9,2)		
							7,75(8,8); 8,18(10,8)		
	CDCl ₃ +Na+	1,7	3,64(10,6)	3,83(10,4)	5,22(7,0)	4,63(10,6) **	7,92(9,2); 8,36(6,4) 7,61(5,3) 7,80(4,4)	15	
	CDCl ₃ +K+	6,0	3,78(11,1)	3,89(11,0)	5,00(7,2)	4,39(8,7) **	8,02[2,0] (5,9) 8,41[2,0] (5,0)		
	CDCl ₃ +Tl+	5,0	3,75(11,2)	3,89(10,9)	5,26(7,2) 5,05	4,44 4,39	7,96(6,1) 8,40(4,9)		
	CD ₃ OH+K+	6,0	3,76(10,9)	3,97(10,6)	5,10(7,0)	4,40(11,0) **	8,07(6,0); 8,45(5,2) 8,09[2,0] (5,8) 8,44[2,3] (4,7)		

* Значения $\delta_{\text{NH}_3(\text{Val})}$ находятся в пределах 0,8—1,2 м. д.; $\delta_{\text{NH}_3(\text{L-Lac})}$ —1,45—1,50; $\delta_{\text{C}\beta\text{H}}$ и $\delta_{\text{C}\gamma\text{H}}$ —1,8—2,5. ** $\int_{\text{NH}-\text{C}\alpha\text{H}}^{\text{NH}-\text{C}\beta\text{H}} = 1,09$; $\int_{\text{NH}-\text{C}\beta\text{H}}^{\text{NH}-\text{C}\gamma\text{H}}$ не определен.

** $\sum_{\text{NH}-\text{C}\beta\text{H}}^{\text{NH}-\text{C}\alpha\text{H}} (\text{Pro})$. ** При 0°C.

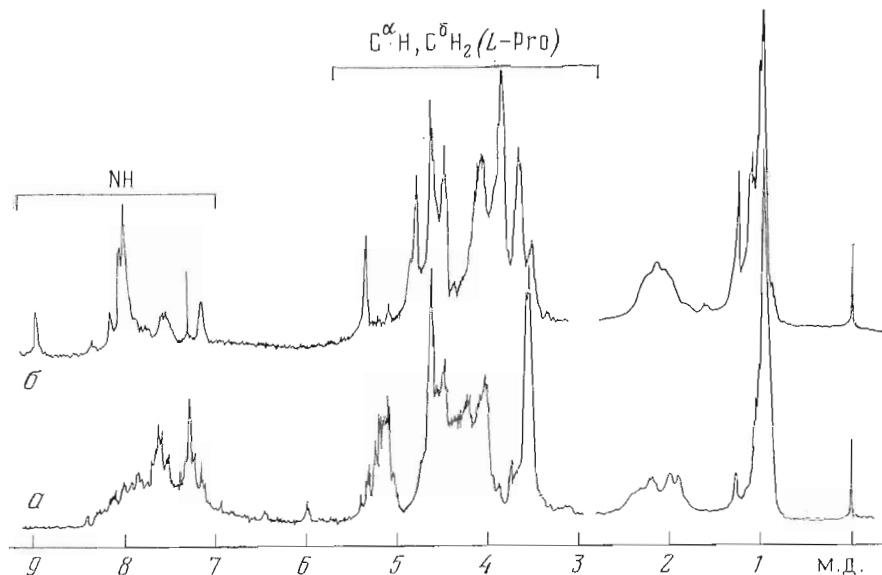


Рис. 3. Спектр ^1H -ЯМР (300 МГц) соединения (I) (а) в CDCl_3 ($\sim 10^{-2}$ М, 30°C) и его комплекса с калием (б)

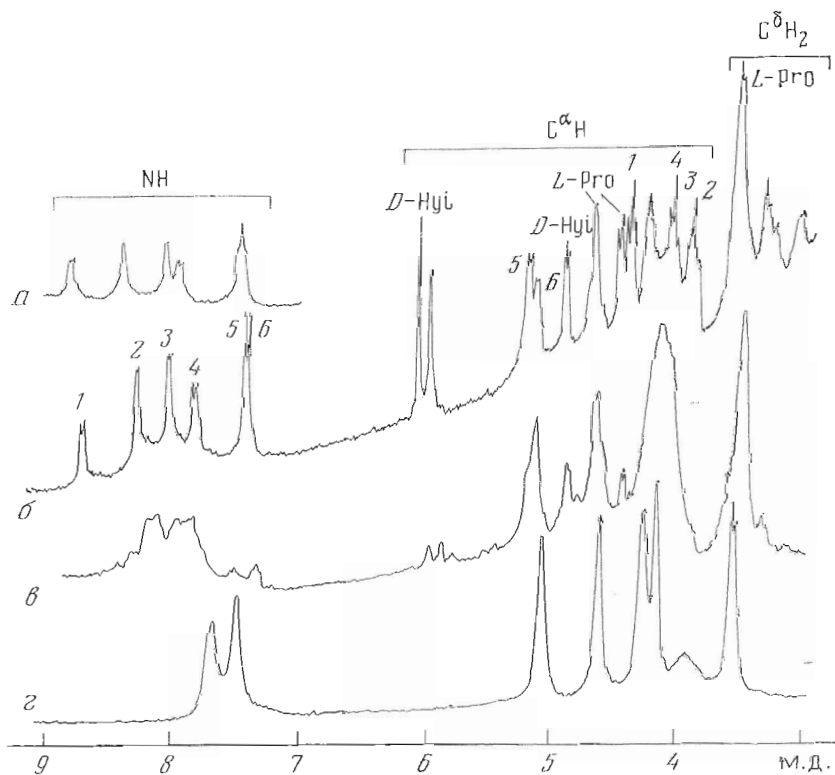


Рис. 4. Спектры ^1H -ЯМР (300 МГц) депептида (I) в $\text{CD}_3\text{C}_6\text{D}_{14}$ ($\sim 8 \cdot 10^{-3}$ М) при 0 (а), 30 (б), 50 (в) и 120°C (г). Цифрами обозначены сигналы N -протонов и соответствующие им сигналы C^α -протонов

^1H -ЯМР (рис. 3а, табл. 1), не упрощающийся ни при нагревании, ни при охлаждении, ни даже при переходе соединения в калиевый комплекс (рис. 3б). ^{13}C -ЯМР-спектр депептида (I) в CDCl_3 подтверждает наличие нескольких медленно (в шкале частот ЯМР) конвертируемых форм

Химические сдвиги (м. д.) сигналов ^{13}C соединений (I) и (II) и их комплексов

Соединение	Растворитель	Концентрация, 10^{-2} М	Фрагмент					
			C^βPro	$\text{C}^\gamma\text{Pro}$	$\text{C}=\text{O}$ остатков			
					1, 5, 9	2, 6, 10	3, 7, 11	4, 8, 12
(I)	CDCl_3	14,8	31,92 29,70 *	22,22 24,53 *	169,33; 170,18; 170,97; 171,49; 172,01 *; 172,07 *;			
(II)	CDCl_3^{**}	12,0	28,47 29,60 28,80	24,51 24,37 24,17	173,34 169,58 171,88 172,34 171,52			
	CD_3OH	9,1	30,77	25,31	171,81	173,43	173,35	174,31
	CDCl_3+K^+	8,0	29,90	24,10	175,11	173,09	172,63	174,31
	$\text{CDCl}_3+\text{TI}^+$	5,0	30,00	24,20	173,07		174,15	
	$\text{CD}_3\text{OH}+\text{K}^+$	8,0	30,76	24,92	176,12	174,50	173,83	175,87

* Наиболее интенсивные сигналы.

** Приведенные для C^β и C^γ остатков D-Pro два значения отвечают двум формам депсипептида (II) (A и B).

Таблица 3

Разница между химическими сдвигами сигналов $^{13}\text{C}^\beta$ и $^{13}\text{C}^\gamma$ ($\Delta\delta_{\text{C}^\beta, \gamma}$ м. д.) и значения торсионных углов ψ (град) пролиновых остатков

Соединение	Растворитель	Концентрация, 10^{-2} М	$\Delta\delta^*_{\text{C}^\beta, \gamma}$	ψ^{**}
(I)	CDCl_3	14,8	3,96 5,17 9,70	-30 или 150 -63 или -177 -39 или 149
(II)	CDCl_3^{**}	12,0	5,23 4,63	65 или 175 48 или -168
	CD_3OH	9,1	5,46	71 или 169
	CDCl_3+K^+	8,0	5,80	81 или 159
	$\text{CD}_3\text{OH}+\text{K}^+$	8,0	5,84	82 или 158
	$\text{CDCl}_3+\text{TI}^+$	5,0	5,80	81 или 159

* Погрешность измерения $\Delta\delta \pm 0,05$ м. д.** Значения угла ψ приведены с точностью $\pm 10^\circ$, согласно [8].** Приведенные для этого растворителя два значения $\Delta\delta_{\text{C}^\beta, \gamma}$ и ψ отвечают двум формам депсипептида (II) (A и B).

этого соединения. Химические сдвиги $^{13}\text{C}^\gamma$ L-пролина (~ 22 и $\sim 24,5$ м. д.), как и значения $\Delta\delta_{\text{C}^\beta, \gamma}$ (табл. 2, 3), свидетельствуют о том, что одной из причин сложности спектральной картины является участие в равновесии форм, содержащих как *транс*-, так и *цис*-связи D-Val-L-Pro [6-8]. Судя по относительной интенсивности сигналов ^{13}C , между этими остатками преобладают *транс*-связи.

В метилциклогексане при $0 \div -40^\circ\text{C}$ спектр соединения (I) значительно упрощается. Например, в области сигналов NH (рис. 4) присутствуют шесть дублетов равной интенсивности, указывая на реализацию несимметричной структуры, содержащей, по-видимому, одну или несколько *цис*-связей D-Val-L-Pro. К сожалению, из-за недостаточной растворимости соединения (I) в метилциклогексане не удалось получить его ^{13}C -ЯМР-спектр, который позволил бы более определенно судить о конформации третичных амидных связей. При нагревании до 30°C появляется $\sim 10\%$ дополнительных форм. При 50°C начинается слияние сигналов, приводящее при 120°C к формированию спектра с числом сигналов, отвечающим числу протонов в одном тетрадепсипептидном фрагменте соединения (I).

Для оценки экранирования N-протонов к раствору анализируемого соединения добавляли раствор иминоксильного радикала (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил) в $CD_3C_6D_{11}$. При этом в спектре депсипептида (I) в $CD_3C_6D_{11}$ наблюдалось уширение сигналов при 7,36 (2 NH) и 8,23 м.д. на 60 Гц/моль, сигнала NH при 7,98 м.д. на 100 Гц/моль и сигналов при 7,73 и 8,66 м.д. на 900 и 800 Гц/моль соответственно. Очевидно, четыре N-протона экранированы от растворителя, участвуя в образовании ВМВС, а два протона NH-группы экранированы в растворитель [9]. Четыре константы ${}^3J_{HN-C\alpha H}$, наблюдаемые в спектре, имеют высокие значения (9,8–10,6 Гц), отвечающие значению угла $\varphi \sim 120^\circ$. Две другие ${}^3J_{HN-C\alpha H}$ имеют сравнительно небольшие (5,0 и 5,4 Гц) значения. Фрагменты $HC^\alpha-C^\beta H$ всех остатков D-Pro и двух остатков L-Val (NH-группы которых образуют водородные связи и дают высокие константы ${}^3J_{HN-C\alpha H}$), судя по значениям ${}^3J_{HC^\alpha-C^\beta H}$ (табл. 1), имеют преимущественно *gosh*-ориентацию протонов; остальные остатки валина имеют *транс*-ориентацию $HC^\alpha-C^\beta H$ -протонов. Дальнейшая детализация структуры депсипептида (I) в метилциклогексане требует привлечения дополнительных данных.

Спектры 1H -ЯМР соединения (I) в CD_3CN , смеси $C_6D_{12}-(CD_3)_2CO$ (1:1) и в C_2D_5OH напоминают по своей сложности спектры в хлороформе. Такие сложные спектры свидетельствуют о том, что соединение (I) в растворе представляет собой набор форм разной населенности и разной степени симметрии с *цис*- и *транс*-конфигурацией третичных амидных связей D-Val-L-Pro.

В ИК-спектрах депсипептида (II), снятых в растворах CCl_4 и $CHCl_3$ (рис. 2б), практически отсутствуют полосы с $\nu_{NH} > 3400 \text{ см}^{-1}$, откуда следует, что все группы NH принимают в этих условиях участие в образовании ВМВС. В области карбонильных частот присутствуют нерасщепленные полосы сложноэфирных CO-групп (1746 и 1744 см^{-1}); можно также различить перекрывающиеся полосы вторичных и третичных (1648–1658 см^{-1}) амидов. Указанный интервал частот согласуется с участием CO-групп вторичных амидов в образовании ВМВС [10].

В целом характер ИК-спектров согласуется с присутствием «браслетной» конформации циклического остова, доминирующей в неполярных средах у валиномицина и всех его 12-членных аналогов с $(-D-L-L-D-)_3$ -набором конфигураций асимметрических центров [2, 5, 10–12].

Общий вид спектров 1H -ЯМР соединения (II) в CCl_4 и C_6D_{12} (соответствие числа и мультиплетности сигналов структурной формуле) (табл. 1) свидетельствует о том, что депсипептид (II) существует в этих растворителях в виде одной формы с C_3 -симметрией (форма A) или нескольких быстро конвертируемых конформеров. В других слабополярных растворителях депсипептид (II) существует в виде нескольких медленно конвертируемых форм различной населенности с преобладанием одной из них (формы A), населенность которой составляет 80–85% (табл. 1). Значения химических сдвигов сигналов ${}^{13}C$ -остатков D-Pro (24,37 м.д.) в форме A и значение $\Delta\delta_{\text{св.г}}$ D-Pro (5,23 м.д.) в спектре ${}^{13}C$ -ЯМР (табл. 3) указывают на *транс*-конфигурацию третичных амидных связей L-Val-D-Pro [6–8].

При добавлении к раствору соединения (II) в $CDCl_3$ раствора 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксида в $CDCl_3$ наблюдается небольшое уширение сигналов N-протонов формы A на 29 и 21 Гц/моль для D- и L-остатков валина соответственно. Подобное незначительное уширение сигналов NH говорит о том, что все N-протоны экранированы от растворителя [9]. Уменьшение концентрации соединения (II) в $CDCl_3$ в 16 раз (табл. 1) не оказало влияния на химические сдвиги сигналов; следовательно, депсипептид (II) не склонен к образованию ассоциатов и экранированность N-протонов вызвана их участием в образовании ВМВС. Значение химического сдвига сигнала ${}^{13}C^\beta$ (D-Pro) (29,60 м.д., табл. 2) говорит о том, что в молекуле депсипептида (II) отсутствуют γ -изгибы, включающие остаток D-Pro в $i+1$ -положение, т. е. не образуется ВМВС типа $3 \rightarrow 1$, образованные NH-группой D-Val и CO-группой L-Val (для остатков пролина в γ -изгибах в положении $i+1$ характерны значения $\delta_{\text{св.г}}$ 24–25 м.д. [13]).

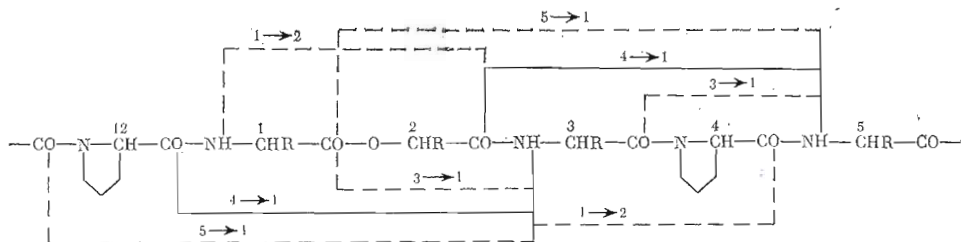


Схема возможных типов VMBC во фрагменте депептида (II)

Вероятно, группы NH остатков *D*-Val образуют VMBC типа 4→1 с CO-группой *L*-Lac, стабилизируя β-изгибы, образованные фрагментами *L*-Lac-*L*-Val-*D*-Pro-*D*-Val (см. схему). Наблюдаемый в ¹H-ЯМР-спектре депептида (II) аномальный сдвиг в слабое поле (4,2—4,3 м.д., табл. 1) одного из C^δH₂-протонов остатка *D*-Pro (химический сдвиг C^δH₂-протонов остатка пролина 3,6—3,7 м.д. [14]) обусловлен, как и в случае соответствующих октадепептидов [1], экранированием карбонильной группы остатка *L*-Lac, участвующей в образовании VMBC и стабилизирующей β-изгиб фрагмента *L*-Lac-*L*-Val-*D*-Pro-*D*-Val. Значение угла ψ пролинового остатка (табл. 3) согласуется с включением этого остатка в β-изгиб в *i*+2-положение [15, 16].

Исследование соединения (II) при различных температурах выявило сильное уширение сигнала NH остатков *L*-Val основной формы при охлаждении и его высокую зависимость от температуры ($\Delta\delta/\Delta T = 9,8 \cdot 10^{-3}$ м.д./град по сравнению с $1,5 \cdot 10^{-3}$ м.д./град для аналогичного сигнала остатка *D*-Val (табл. 1)). В других слабополярных растворителях (например, в CD₃C₆D₁₁) уширения сигналов не наблюдается при охлаждении раствора депептида (II) до -52°С, хотя также сохраняется дифференциация значений температурных градиентов: $2,4 \cdot 10^{-3}$ м.д./град (*D*-Val) и $5,4 \cdot 10^{-3}$ м.д./град (*L*-Val) (табл. 1). Мы объясняем эти факты меньшей устойчивостью части VMBC, образованных группами NH остатков *L*-Val. Миграция «ослабленного звена» VMBC по циклу приводит к уширению сигнала при охлаждении, а дальнейшее ослабление VMBC при нагревании — к сдвигу сигнала. Ослабленность VMBC, образованных NH-группами *L*-валина, согласуется с их разрушением при переходе в полярным растворителям.

Высокое значение ³J_{NH-C^αH} остатков *D*-Val (10,2 Гц, табл. 1) основной формы депептида (II) указывает на *транс*-ориентацию NH—C^αH протонов этого остатка [17]. Вициальная константа ³J_{NH-C^αH} остатков *L*-Val (5,2 Гц, табл. 1) не позволяет однозначно выбрать торсионный угол φ. Однако анализ вициальных гомоядерных констант спин-спинового взаимодействия, позволяющих получить возможные значения углов φ (табл. 4), полученная разница значений химических сдвигов ¹³C^β и ¹³C^γ остатка *D*-Pro (табл. 3), дающая возможные значения угла ψ *D*-Pro [8], оценка населенностей вращательных состояний по связи C^α—C^β валиновых остатков (табл. 5) [11], а также конформационные ограничения, вносимые участием всех протонов NH в образовании VMBC типа 4→1, позволяют предложить наиболее вероятные значения торсионных углов формы А депептида (II) (градусы):

	<i>D</i> -Val	<i>L</i> -Lac*	<i>L</i> -Val	<i>D</i> -Pro
φ	104	-120	-71	60*
ψ	-90*	0	90*	65
χ ¹	180		180	

Увеличение полярности растворителя вызывает изменение конформации основной формы депептида (II), характерной для неполярной среды. При постепенном переходе от CCl₄ к (CD₃)₂SO, как видно из рис. 5, спектральные изменения практически заканчиваются при добавлении ~15% (CD₃)₂SO, после чего наблюдается слабая зависимость δ_{NH} от тем-

* Значения торсионных углов взяты из молекулярных моделей Драйдинга.

Видиальные гомоядерные константы ${}^3J_{\text{HN}-\text{C}^\alpha\text{H}}$ и возможные величины торсионных углов φ соединения (II)

Растворитель	${}^3J_{\text{HN}-\text{C}^\alpha\text{H}}$, Гц		φ , град	
	D-Val	L-Val	D-Val	L-Val
CCl ₄ , C ₆ D ₁₂	10,2	5,1	103,8; 136,3	-70,5; -169,5; 20,4; 99,6
CDCl ₃	10,4	6,1	105,9; 134,1	-76,2; -163,8; 27,1; 92,9
CD ₃ C ₆ D ₁₁	10,1	5,5	103,4; 136,6	-72,9; -167,1; 23,1; 96,9
(CD ₃) ₂ SO	10,0	5,9	102,5; 137,5	-75,1; -164,9; 25,7; 94,3
CD ₃ OH	10,0	7,6	102,5; 137,5	-84,9; -155,1; 39,3; 80,7
CDCl ₃ +Na ⁺	5,3	4,4	71,8; 168,2; -21,5; -98,5	-66,6; -173,4; 15,5; 104,5
CDCl ₃ +K ⁺	5,9	5,0	75,1; 164,9; -25,7; 94,3	-70,1; -169,9; 19,5; 100,5
CDCl ₃ +Tl ⁺	6,1	4,9	76,2; 163,8; -27,1; -92,9	-69,5; -170,5; 18,8; 101,2
CD ₃ OH+K ⁺	5,8	4,7	74,6; 165,5; -25,0; -95,0	-68,3; -171,7; 17,5; 102,5

Таблица 5

Населенность вращательных состояний по связи C^α—C^β остатков L-(D)-Val соединения (II) и видиальные константы спин-спинового взаимодействия этих фрагментов

Растворитель	${}^3J_{\text{HC}^\alpha-\text{C}^\beta\text{H}}$, Гц		Населенность форм, %			
	D-Val	L-Val	D-Val		L-Val	
			b (χ' 180°)	a (χ' 60°) + c (χ' -60°)	b (χ' 180°)	a (χ' -60°) + c (χ' 60°)
CCl ₄	9,5	10,2	64	36	70	30
C ₆ D ₁₂	9,6	10,4	64	36	72	28
CDCl ₃	9,3	10,2	62	38	72	28
CD ₃ C ₆ D ₁₁	9,4	10,2	63	37	72	28
(CD ₃) ₂ SO	<3	10,1	<4	~100	69	31
CD ₃ OH	4,9	10,8	22	78	75	25
CDCl ₃ +Na ⁺	10,6	10,4	74	26	72	28
CDCl ₃ +K ⁺	11,1	11,0	78	22	77	23
CDCl ₃ +Tl ⁺	11,2	10,9	79	21	76	24
CD ₃ OH+K ⁺	10,9	10,6	76	24	74	26

пературы ($\Delta\delta/\Delta T$ 0,3—1,0·10⁻³ м.д./град) у D-Val и высокая зависимость $\Delta\delta/\Delta T$ (11,0—9,7·10⁻³ м.д./град) у L-Val (табл. 1). Следовательно, при увеличении полярности среды происходит разрыв ВМВС, образованных N-протонами остатков L-Val, и в молекуле реализуется конформация с сохранением трех ВМВС типа 4→1, образованных NH-группой D-Val. Для наблюдаемой конформации характерны высокие значения ${}^3J_{\text{HN}-\text{C}^\alpha\text{H}}$ (10,0 Гц) у D-Val и низкое значение ${}^3J_{\text{HN}-\text{C}^\alpha\text{H}}$ (5,9 Гц) у L-Val а также сохранение *транс*-ориентации боковой цепи остатков L-Val (${}^3J_{\text{HC}^\alpha-\text{C}^\beta\text{H}}$ 10,1 Гц), входящих в сохраняющиеся β-изгибы, и изменение ориентации боковой цепи остатков D-Val — увеличение доли *gаш*-ротамера (${}^3J_{\text{HC}^\alpha-\text{C}^\beta\text{H}}$ < 3 Гц). Аналогичные спектральные признаки найдены для доминирующей формы депсипептида (II) в метаноле. Протоны NH-группы D-валина ($\Delta\delta/\Delta T$ 2,5·10⁻³ м.д./град) медленнее обмениваются в CD₃OD на дейтерий (период полуобмена $\tau_{1/2} \geq 6$ ч), чем N-протоны L-валина ($\Delta\delta/\Delta T$ 6,0·10⁻³ м.д./град; $\tau_{1/2} \sim 2,5$ ч); судя по величине $\delta_{\text{сг}}$ D-Pro (25,31 м.д.) и $\Delta\delta_{\text{св.г}}$ (5,5 м.д.) (табл. 2, 3), все третичные амидные связи депсипептида (II) в CD₃OH имеют *транс*-конфигурацию [6—8].

Таким образом, «пропеллерная» конформация депсипептида (II) устойчива в более широком диапазоне полярности растворителя (15—100% (CD₃)₂SO в CCl₄), чем аналогичная конформация валиномицина (10—50% (CD₃)₂SO в CCl₄) [11].

В спектрах ¹H- и ¹³C-ЯМР додекааналога (II) помимо сигналов основной формы наблюдаются также сигналы, относящиеся к другим формам.

Рис. 5. Изменение химических сдвигов сигналов протонов депептида (II) ($5 \cdot 10^{-2}$ М, 30°C) при различных соотношениях CCl_4 и $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

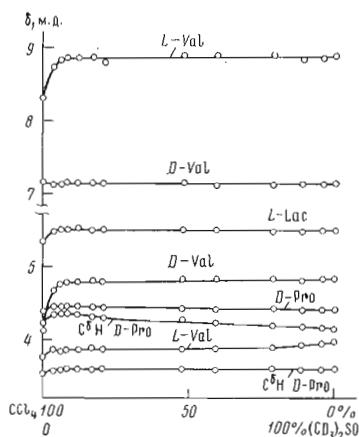


Рис. 5

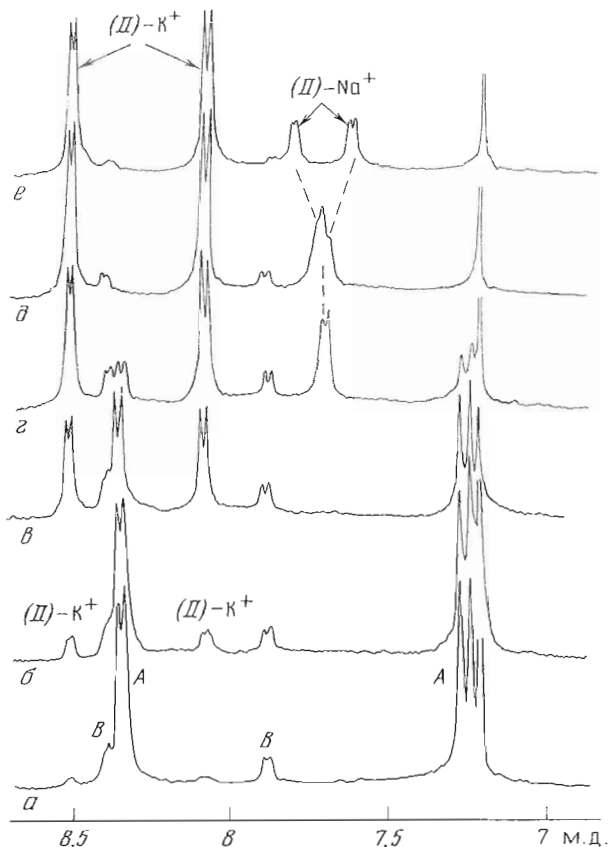


Рис. 6

В CDCl_3 имеется C_2 -симметричная минорная форма B ($\sim 15\%$, табл. 1). Значения химического сдвига сигналов ^{13}C D -Pro (24,17 м.д., табл. 2) и $\Delta\delta_{\text{св.т}}$ D -Pro (4,63 м.д., табл. 2, 3) указывают на *транс*-конфигурацию третичных пептидных связей L -Val- D -Pro. В спектре минорной формы B депептида (II) в CDCl_3 не наблюдается сильной зависимости химических сдвигов сигналов N-протонов от температуры: значения $\Delta\delta/\Delta T$ варьируют в пределах $2,0$ и $2,4 \cdot 10^{-3}$ м.д./град (табл. 1). Не наблюдается и уширения сигналов этой формы при охлаждении соединения (II) в CDCl_3 до $\sim -60^\circ \text{C}$, что подтверждает устойчивость ВМВС в форме B . Ориентация боковых цепей валиновых остатков трансoidная ($^3J_{\text{HC}^\alpha-\text{C}^\beta\text{H}}$ 11,3 и 11,7 Гц). Малые значения вицинальных $^3J_{\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}}$ (6,0 и 4,8 Гц, табл. 1), *транс*-ориентация изопропильных групп валиновых остатков и устойчивость ВМВС этой формы очень близки к параметрам, полученным для конформации комплекса депептида (II) со щелочными металлами. Однако при добавлении к раствору соединения (II) в CDCl_3 (рис. 6а), находящемуся в ампуле, сухого KSCN в спектре сохраняются сигналы минорной формы B и появляются сигналы образующегося калиевого комплекса (рис. 6б, в). При последующем добавлении в ампулу сухой соли NaSCN в спектре (при $\sim 7,7$ м.д., рис. 6 г, д, е) появляются также и сигналы комплекса депептида (II) с натрием. Ввиду низкой скорости обмена ионов натрия и калия в их комплексах с молекулами депептида (II) в условиях опыта спектры соединения (II) и его натриевого и калиевого комплексов хорошо разрешены и сохранение сигналов формы B депептида (II) в ^1H -ЯМР-спектре при появлении сигналов калиевого и натриевого комплексов свидетельствует о том, что форма B не является комплексной формой этого соединения. При переходе от CDCl_3 к $\text{CD}_3\text{C}_6\text{D}_{11}$ населенность формы B уменьшается, но появляются сигналы еще одной минорной формы C ($\sim 15\%$, табл. 1), дающей в области 7,2—8,7 м.д.

шесть равных по интенсивности сигналов N-протонов. Появление этих сигналов указывает на существование в растворе $CD_3C_6D_{11}$ асимметричной формы C, температура коалесценции которой с основной формой $>50^\circ C$. Наличие этой формы обусловлено, вероятно, возможностью *цис* — *транс*-изомерии третичной амидной связи. Аналог (II) в CD_3OH и $(CD_3)_2SO$ (табл. 2) сохраняет около 20% минорной формы, напоминающей упомянутую выше форму C (шесть сигналов равной интенсивности в области NH). Температура коалесценции сигналов основной и минорной форм ($>50^\circ C$ в метаноле и $\sim 100^\circ C$ в $(CD_3)_2SO$) характерна для *цис* — *транс*-изомерии третичных амидных связей.

Из изложенного следует, что замена в валиномицине остатков D- α -оксизовалериановой кислоты на остатки D-пролина не препятствует формированию структурных форм, характерных для валиномицина, хотя и приводит к ослаблению ВМВС, образованных N-протонами L-валина, и к появлению небольшой ($\sim 20\%$) доли новых, не реализующихся в самом валиномицине форм. В то же время аналогичная замена остатков молочной кислоты приводит к дестабилизации как «пропеллерной», так и «браслетной» конформаций, характерных для валиномицина, и к появлению конформеров с *цис*-конфигурацией третичной амидной связи.

Рассмотрим поведение соединений (I) и (II) при взаимодействии с ионами щелочных металлов. ИК- и ЯМР-спектры комплексов депсипептида (II) в хлороформе обнаруживают все характерные признаки образования обычных комплексов с соотношением макроцикл — катион 1 : 1, в которых катион внедряется в молекулярную полость, образованную шестью лигандными карбонильными O-атомами, а депсипептидная цепь образует «браслет», стабилизируемый шестью ВМВС. Действительно, в ИК-спектрах (II) с Na^+ , K^+ и Cs^+ (рис. 2б) полосы валентных колебаний карбониллов сложноэфирных СО-групп (1737 , 1737 и 1735 см^{-1} соответственно) смещены в низкочастотную область по сравнению со свободным макроциклом ($\nu_{COO} 1744\text{ см}^{-1}$), что указывает на их участие в ион-дипольном взаимодействии. Перекрытие полос валентных колебаний вторичных и третичных амидных карбониллов в области амид I затрудняет возможность определения участия в ион-дипольном взаимодействии карбонильного кислорода третичных амидных групп. В спектрах комплексов наблюдается также увеличение интенсивности полос амид A (особенно для K^+ -комплекса), сужение и длинноволновый сдвиг полос амид I вторичных амидных групп. Такой характер изменения спектра можно объяснить усилением и стабилизацией ВМВС. У комплекса (II) с Cs^+ наблюдается более высокая, чем у K^+ -комплекса, частота ν_{NH} (3309 см^{-1} по сравнению с 3294 см^{-1}), указывающая на ослабление системы водородных связей в комплексе при увеличении размера полости в результате внедрения более объемистого катиона.

Спектры 1H - и ^{13}C -ЯМР таллиевого комплекса депсипептида (II) по химическим сдвигам сигналов и значениям констант спин-спинового взаимодействия идентичны спектрам калиевого комплекса (табл. 1, 2), что указывает на близость конформаций этих комплексов.

Спектры ^{13}C -ЯМР-комплексов (II) с K^+ и Tl^+ в $CDCl_3$ (табл. 2) подтверждают *транс*-конфигурацию третичных амидных связей ($\delta_{C_{CT}} D$ -Pro 24,10 и 24,20 м.д., $\Delta\delta_{C_{CT}}$ 5,80 м.д., табл. 2, 3). В спектре комплекса (II) — Tl^+ отсутствуют сигналы двух ^{13}CO -групп остатков валина. Этот факт, по-видимому отражающий спин-спиновое взаимодействие соответствующих ядер ^{13}C с ядрами $^{203,205}Tl$ (как в комплексе валиномицин — Tl^+ [11] и изолейциномицин — Tl^+ [12]), а также неблагоприятную (в отличие от упомянутых комплексов) для наблюдения расщепленного сигнала скорость обмена таллия между комплексом и средой, убедительно свидетельствует об участии шести СО-групп валиновых остатков в ион-дипольном взаимодействии, подтверждая обсуждавшиеся выше данные ИК-спектров. Спектры 1H -ЯМР комплексов (II) с Na^+ , K^+ и Tl^+ в $CDCl_3$ весьма близки друг другу по своим параметрам (табл. 1) и отвечают C_3 -симметричной конформации. Гомогенность спектра 1H -ЯМР калиевого комплекса депсипептида (II), сохраняющаяся в $CDCl_3$ при охлаждении до $-50^\circ C$, говорит

о том, что комплексы соединения (II) со щелочными металлами существуют в виде одной формы. Следует также отметить сравнительно низкие значения констант ${}^3J_{\text{HN}-\text{C}^\alpha\text{H}}$ (4,4–6,1 Гц, $\varphi -70^\circ$ (*L*-Val) и $\varphi 75^\circ$ (*D*-Val), табл. 4) и высокие значения констант ${}^3J_{\text{HC}^\alpha-\text{C}^\beta\text{H}}$ (10,4–11,2 Гц) валиновых остатков (транс-ориентации протонов $\text{HC}^\alpha-\text{C}^\beta\text{H}$ -фрагментов), типичные для ранее исследованных соединений валиномицинового ряда.

ИК-спектры комплексов (I)– K^+ и (I)– Na^+ в целом подобны спектрам комплексов аналога (II). Тем неожиданным оказался тот факт, что комплекс (I)– K^+ в хлороформе дал чрезвычайно сложный (рис. 3б), практически не интерпретируемый и не упрощающийся при нагревании до $\sim 60^\circ\text{C}$ спектр ${}^1\text{H}$ -ЯМР. Не исключено, что это отчасти связано с присутствием комплексов с неэквивалентной стехиометрией. Вместе с тем наблюдаемые спектры, как мы считаем, свидетельствуют о том, что упомянутая выше энергетическая невыгодность канонических «браслетных» структур этого соединения способствует образованию комплексов, не обладающих элементами симметрии и содержащих *цис*-связи *D*-Val-*L*-Pro. Аналогичные по сложности спектры ЯМР наблюдались также для комплексов соединения (I) в других растворителях (CDCl_3 – CD_3CN , 2 : 1; $\text{C}_2\text{D}_5\text{OH}$, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).

Комплексообразование соединения (II) в полярной среде – метаноле исследовалось методами ${}^1\text{H}$ -ЯМР и ${}^{13}\text{C}$ -ЯМР. Добавление KSCN при комнатной или повышенной температуре сопровождается изменением химических сдвигов сигналов ${}^1\text{H}$ и ${}^{13}\text{C}$. При соотношении соль – макроцикл $\sim 0,6$ и выше в спектрах не наблюдается дальнейшего изменения химических сдвигов сигналов (рис. 7). При -39°C в спектрах ${}^1\text{H}$ -ЯМР происходит разделение сигналов свободной и комплексной форм, что позволяет оценить их содержание непосредственно по площади сигналов. Уже при добавлении 0,68 эквивалента соли в спектре не наблюдаются сигналы свободной формы макроцикла; следовательно, в растворе не остается свободного макроцикла. Изложенные данные свидетельствуют об образовании комплексов с соотношением макроцикл – катион 2 : 1.

Таким образом, если в хлороформе циклодесипептид (II) образует с ионами щелочных металлов комплексы типа 1 : 1, то в метаноле образуется сандвичевый комплекс $(\text{II})_2-\text{K}^+$ и не наблюдается признаков образования обычных эквивалентных комплексов. Расчет констант устойчивости по данным ${}^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров по методу [18], исходя из допущения об образовании комплекса $(\text{II})_2-\text{K}^+$, привел к значению константы его устойчивости K_2 , равному $3,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Следует отметить, что, как видно из сопоставления рис. 6г и 6е, соединение (II) образует с NaSCN в CDCl_3 два типа комплексов. Не исключено, что форма, образующаяся сразу после добавления соли (рис. 6г), представляет собой «сэндвич», который при постепенном переходе соли в раствор превращается в комплекс 1 : 1 (рис. 6е). Столь выраженная зависимость стехиометрии комплексообразования от природы растворителя ранее не наблюдалась у макроциклов валиномицинового ряда.

Гипотетическая структура комплекса $(\text{II})_2-\text{K}^+$ представлена на рис. 8. При ее построении мы учитывали участие сложноэфирных CO^- -групп в ион-дипольном взаимодействии, вытекающее из приведенных на рис. 7 значений $\Delta\delta$ сигналов ${}^{13}\text{C}$ остатков *D*-Val (4,31 м.д.), а также малые значения температурных зависимостей сигналов NH ($\Delta\delta/\Delta T$ $2,0 \cdot 10^{-3}$ и $2,3 \cdot 10^{-3}$ м.д./град), указывающие на участие всех N-протонов в образовании ВМВС, и значения констант ${}^3J_{\text{HN}-\text{C}^\alpha\text{H}}$, равные 4,7 (*L*-Val) и 5,8 (*D*-Val) Гц (табл. 1; $\varphi -68$ и 74° соответственно), характерные для браслетной конформации.

В свете изложенных данных следует ожидать, что в промежуточных по полярности между хлороформом и метанолом растворителях будут образовываться как комплексы 1 : 1, так и 2 : 1. В целом согласующиеся с изложенными данными были получены при кондуктометрическом исследовании комплексов соединений (I) и (II) с K^+ , Rb^+ и Cs^+ в 96% водном этаноле. Во всех случаях добавление депептида к раствору соли сопровождается значительным снижением электропроводности растворов

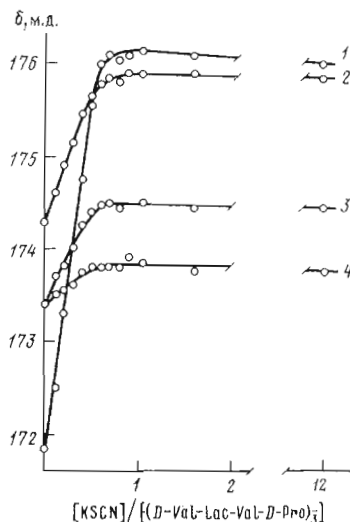


Рис. 7

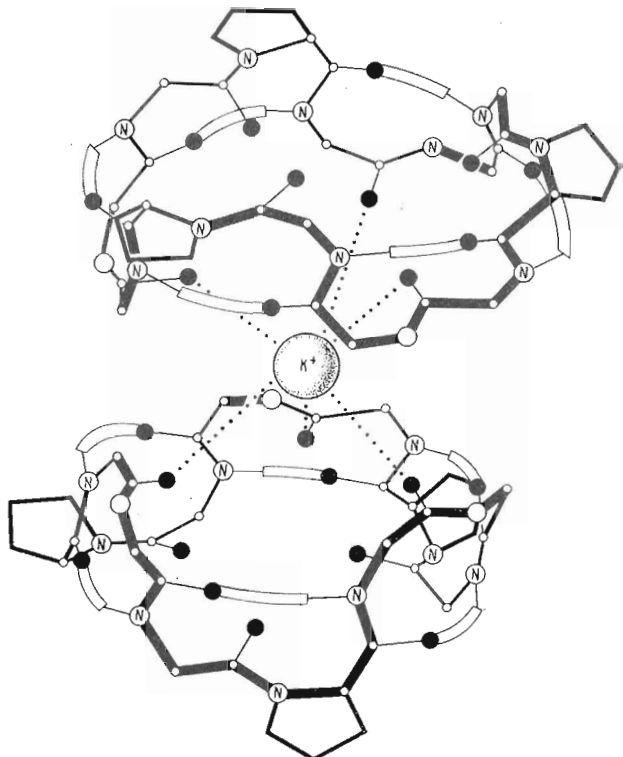


Рис. 8

Рис. 7. Изменение химических сдвигов (δ , м.д.) ^{13}C -ЯМР сигналов группы CO остатков *D*-Val (1), *D*-Pro (2), *L*-Lac (3), *L*-Val (4) при титровании депептида (II) ($6 \cdot 10^{-2}$ М, 35°C) KSCN в CD_3OH

Рис. 8. Предполагаемая структура «сэндвичевого» комплекса депептида (II)

(рис. 9), что свидетельствует об образовании достаточно устойчивых комплексов. Выход на плато кривой титрования соединения (I) раствором KCl при соотношении соль — макроцикл 1 : 1 (рис. 9) свидетельствует об образовании в этом случае эквимольных комплексов; рассчитанная из кривых титрования подвижность комплексных катионов равна $20,5 \text{ Ом}^{-1}$, а усредненная константа устойчивости комплексов $\sim 10^4$ моль \cdot л $^{-1}$ [19]. При титровании депептида (I) солями Rb^+ и Cs^+ кривые титрования имеют перегиб. Для Rb^+ этот перегиб выражен более четко и кривая выходит на плато при соотношении макроцикл — катион 2 : 1, что указывает на наличие сэндвичевых комплексов. Подвижность таких комплексов равна 17 Ом^{-1} , что хорошо согласуется с предполагаемой подвижностью сэндвичевых комплексов, которая может составлять 50–85% подвижности комплексов состава 1 : 1 [19]. (Подвижность комплексов (I)– Rb^+ равна 21 Ом^{-1}). Для Cs^+ -комплексов пептида (I) типа 1 : 1 подвижность близка соответствующим значениям для комплексов с K^+ и Rb^+ , подвижность сэндвичевых комплексов определить не удалось.

Кривые титрования соединения (II) солями K, Rb и Cs практически идентичны (на рис. 9 приведена кривая лишь для CsCl). Малая подвижность комплексных катионов ($14,1$ – $14,7 \text{ Ом}^{-1}$) свидетельствует о том, что в этих случаях образуются в основном сэндвичевые комплексы. Отсутствие перегибов на кривых титрования указывает на то, что устойчивость сэндвичевых комплексов достаточно высока и значительно превышает устойчивость комплексов типа 1 : 1. Возможно, что комплексы такого типа вообще не образуются в условиях кондуктометрического титрования, как и в условиях титрования, регистрируемого методом ЯМР.

Образование комплексов сопровождается изменением спектров КД (рис. 1). Однако попытка использовать этот метод для количественного

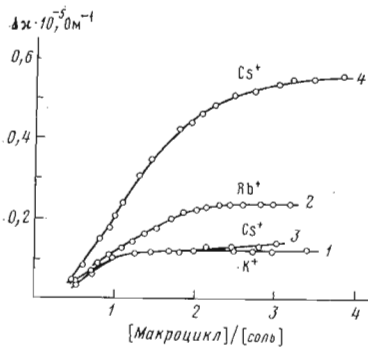


Рис. 9

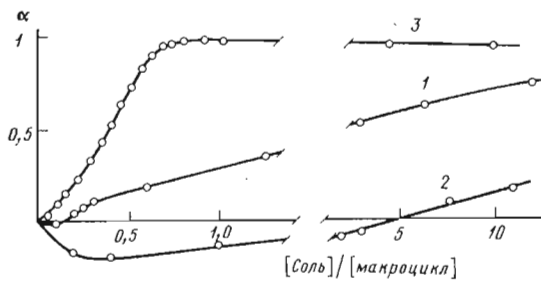


Рис. 10

Рис. 9. Кривые титрования соединений (I) (1-3) и (II) (4) $4,8 \cdot 10^{-4}$ М КСl (1), $4,58 \cdot 10^{-4}$ М RbCl (2) и $4,28 \cdot 10^{-4}$ М CsCl (3, 4) (25°C , 96% водный этанол). $\Delta\kappa$ — изменение удельной электропроводности

Рис. 10. Кривые титрования соединения (I) КСl (1) и CsCl (2) и соединения (II) КСl (3) в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. $\alpha = \Delta(\Delta\epsilon) / \Delta(\Delta\epsilon_{\text{макс}})$

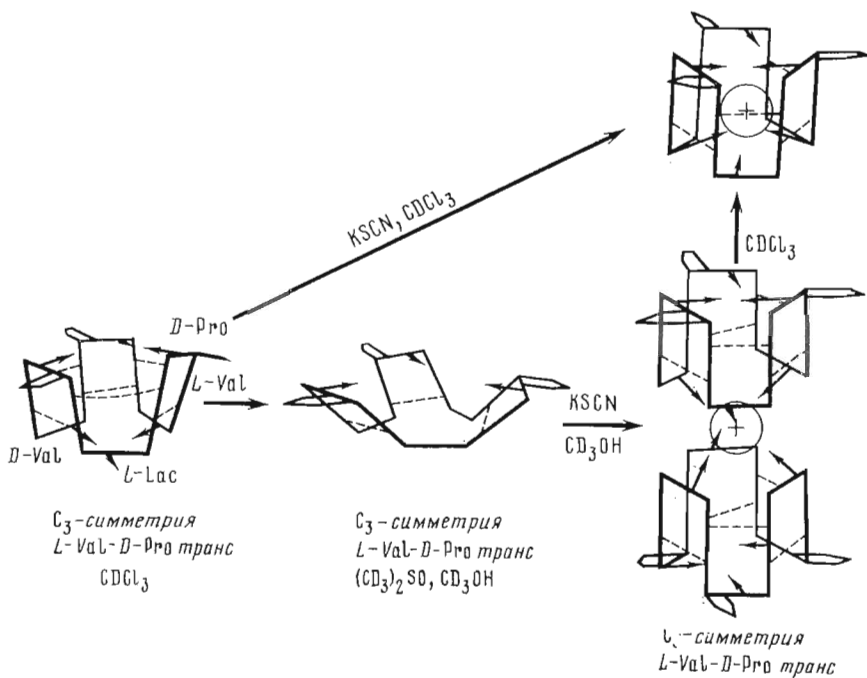


Рис. 11. Конформационные изменения схематически представленной основной цепи предпочтительной формы депептида (II) при смене растворителя и при комплексообразовании. Стрелками обозначены кислороды карбонильных групп, пунктиром — ВМВС

исследования комплексообразования оказалась весьма затруднительной. Кривые титрования соединения (I) солями калия (рис. 10, 1) и цезия (рис. 10, 2) носят немонотонный характер, причем ход кривых имеет обратное направление уже в самом начале титрования ($[\text{соль}]/[\text{макроцикл}] = 0,1-0,4$). При этом наблюдаемый ход кривых не удается воспроизвести подбором констант K_1 и K_2 . Мы считаем, что изменения кривых КД в начале титрования обусловлены главным образом конформационными перестройками циклопептида, связанными с изменением структуры, а следовательно, и сольватирующей способности растворителя в присутствии солей. Последующие изменения кривых обусловлены в основном непосредственным взаимодействием катиона с макроциклом.

Экстракция щелочных металлов из воды в хлористый метилен в присутствии соединений (I) и (II) *

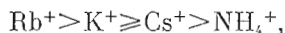
Катион	Концентрация катиона, 10^{-4} М	Степень экстракции, % для	
		(I)	(II)
K ⁺	2	10	44
	4	15	52
	8	18	61
Rb ⁺	2	14	55
	4	17	64
	8	22	73
Cs ⁺	2	15	40
	4	20	49
	8	24	56

* В виде пикратов для опыта с депсипептидом (I) и в виде динитрофенолятов — для (II). Концентрация депсипептидов $\sim 10^{-4}$ М. Степень экстракции = $(C_{\text{компл.}}/C_{\text{исх. макроцикла}}) \cdot 100\%$.

При комплексообразовании соединения (II) с солями калия (рис. 10, 3), рубидия и цезия (KCl, RbCl и CsCl) кривые титрования проходят значительно выше теоретической кривой титрования для получения эквимольного комплекса с бесконечно большой константой устойчивости. Можно лишь отметить, что во всех случаях (KCl, RbCl и CsCl) спектральные изменения заканчиваются уже при соотношении [соль]/[макроцикл] $\leq 0,8$, что в совокупности с ЯМР- и кондуктометрическими данными указывает на образование устойчивых комплексов состава 2 : 1.

В схематическом виде характер конформационных перестроек соединения (II) при смене растворителя и при комплексообразовании представлен на рис. 11.

В заключение рассмотрим результаты экстракционных экспериментов, характеризующих способность соединений (I) и (II) переносить ионы щелочных металлов в органическую фазу. Низкая степень экстракции катионов в виде пикратов в присутствии соединения (I) (<25% даже при больших избытках соли) свидетельствует о низком «ионофорном потенциале» этого аналога (табл. 6). Соответствующий ряд ионной селективности — $\text{Cs}^+ \geq \text{Rb}^+ \geq \text{K}^+$. В этих же условиях депсипептид (II) способствовал экстракции, близкой к количественной и, начиная с эквимольного количества соли, практически не зависящей от ее концентрации (данные в табл. 6 не приведены). С одной стороны, это говорит о высокой ионофорной активности аналога, а с другой — о том, что перенос в органическую фазу осуществляется в форме эквимольных комплексов. Последний факт согласуется с рассмотренными выше данными по структуре комплексов (II) в хлороформе. Замена пикрата на менее липофильный динитрофенолят позволила снизить степень экстракции катионов, измерить зависимость степени экстракции от концентрации соли и определить ряд ионной селективности



совпадающий с аналогичным рядом для валиномицина.

Причину столь значительной разницы в ионофорной активности аналогов валиномицина (I) и (II) в экстракционных экспериментах следует искать в пространственной структуре комплексов: если у соединения (II) периферия комплекса, как и у валиномицина [10, 11], полностью гидрофобная, то комплексы депсипептида (I), лишенные элементов симметрии, по-видимому, менее совершенны в этом отношении.

В начале статьи отмечалось, что по первичной структуре аналоги (I) и (II) занимают промежуточное положение между валиномицином и пролиномицином — эффективными комплексонами и ионофорами. Однако выполненное исследование выявило ряд своеобразных, зачастую неожиданных

данных свойств этих соединений. Так, они значительно уступают обоим прототипам как по устойчивости комплексов с ионами щелочных металлов, так и по способности переносить эти ионы в органическую фазу. Хотя свободный пролиномицин в растворе и образует асимметричную структуру, выраженная склонность соединения (I) и его комплексов к образованию разнообразных несимметричных пространственных структур не имеет аналогий в ряду аналогов валиномицина.

Наконец, уникальной в валиномициновом ряду является способность соединения (II) образовывать «сандвичевые» комплексы с ионами щелочных металлов. Образование таких комплексов следует принимать во внимание при анализе возможных механизмов трансмембранного переноса ионов [20].

Экспериментальная часть

Синтез соединений (I) и (II) описан в работе [21].

Условия снятия спектров ИК, кривых КД и методика экстракции приведены в работе [12]. Кондуктометрические измерения и расчеты стоксовых радиусов комплексов осуществлены так, как описано в работе [19].

Спектры ^1H -ЯМР были получены на спектрометрах фирмы Varian SC-300 (США) с рабочей частотой 300 МГц в импульсном режиме. Спектры ^{13}C -ЯМР получены на спектрометрах XL-100/15 и CFT-20 с рабочей частотой 25,16 и 20 МГц соответственно. Химические сдвиги измерены относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана. Температура образца в датчике поддерживалась температурными приставками с точностью $\pm 1^\circ\text{C}$. Используемые дейтерорастворители получены от фирмы «Изотоп» (СССР) и Stholer Isotope Chemicals (США).

Двойной ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ - и тройной ^{13}C - $\{^1\text{H}, ^1\text{H}\}$ -резонансы осуществлялись путем селективного облучения протонов с помощью балансной модуляции напряжения несущей частоты генератора V-4421 «Гирокод» напряжением низкой частоты, получаемой от синтезатора частот ГЗ-49 (СССР). Интенсивность облучающего поля $\gamma\text{H}_2/2\pi$ составляла 12–19 Гц.

Растворы каппевых комплексов депсипептидов получены в CD_3OH при добавлении 10–20-кратного избытка (в мольном соотношении) роданида калия (KSCN). После полного растворения соли полученный комплекс лиофилизовали и экстрагировали хлороформом (CDCl_3).

Уширение сигналов N-протонов (Гц/моль) при добавлении раствора импиксильного радикала (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил) рассчитывали на линейном участке уширения при изменении концентрации стабильного радикала от 0 до $\sim 5 \cdot 10^{-3}$ М.

Отнесение сигналов к типу остатков в спектрах ^1H -ЯМР проводили методом двойного резонанса, отнесение сигналов к L- и D-валиновым остаткам для депсипептида (II) — с помощью регистрации ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Регистрировалось изменение интенсивности сигнала одного из C^αH -протонов при облучении C^δ -протонов остатков D-Pro (при 3,59 м.д.). Это облучение проводили во время задержки между импульсами (2 с) с амплитудой γH_2 25 Гц; время выборки 2 с.

Для получения разностных спектров использовали стандартную программу DIFFD, входящую в математическое обеспечение ЭВМ 620/L (Varian). При записи обычного спектра частота облучающего генератора (поле H_2) смещалась на 100 Гц в сторону сильного поля. Сигнал C^αH остатка Val (3,99 м.д.), у которого наблюдался положительный ЯЭО, отвечает C^α -протонам остатка L-Val [22].

Отнесение $^{13}\text{C}^\beta$ -сигналов к валиновым или пролиновому остаткам было осуществлено при помощи внерезонансного облучения (SFORD — single frequency off-resonance decoupling [23]), отнесение карбонильных сигналов в спектрах ^{13}C -ЯМР к амидным, третичным амидным и сложнэфирным — при помощи изотопного сдвига регистрируемых сигналов при 50% обмене $\text{NH} \rightarrow \text{ND}$, отнесение карбонильных сигналов к определенному типу остатка — с помощью селективного двойного резонанса ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$, как в работе [10].

1. Балашова Т. А., Фомина Л. А., Гуревич А. З., Старовойтова Н. В., Сенявина Л. Б., Авотинь Г. Я., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1462—1473.
2. Davis D. G., Gisin B. F., Tosteson D. C. Biochemistry, 1976, v. 15, № 4, p. 768—774.
3. Benz R., Gisin B. F., Ting-Beall H. P., Tosteson D. C., Langer P. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 455, № 3, p. 665—684.
4. Gisin B. F., Ting-Beall H. P., Davis D. G., Grell E., Tosteson D. C. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 50, № 2, p. 201—217.
5. Иванов В. Т., Фомина Л. А., Сенявина Л. Б., Овчинников Ю. А., Червин П. И., Яковлев Г. И. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 1008—1025.
6. Dorman D. E., Bovey F. A. J. Org. Chem., 1973, v. 38, № 13, p. 2379—2383.
7. Voelter W., Oster O. Org. Mag. Res., 1973, v. 5, p. 547—548.
8. Siemion I. Z., Wieland Th., Pook K.-H. Angew. Chem., 1975, v. 87, № 19, p. 712—713.
9. Kopple K. D., Go A. J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, № 23, p. 7698—7704.
10. Иванов В. Т., Лайне П. А., Абдуллаев Н. Д., Плегнев В. З., Липкинд Е. М., Архипова С. Ф., Сенявина Л. Б., Мещерякова Е. Н., Попов Е. М., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. Химия природн. соедин., 1971, № 3, с. 221—246.
11. Bystrov V. F., Gavrilov Yu. D., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Eur. J. Biochem., 1977, v. 78, № 1, p. 63—82.
12. Фомина Л. А., Авотинь Г. Я., Балашова Т. А., Старовойтова Н. В., Сенявина Л. Б., Сивелов Н. С., Быстров В. Ф., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1285—1302.
13. Smith J. A., Pease L. G. CRC Critical Reviews in Biochemistry, 1980, v. 8, p. 315—400.
14. Pogliani L., Ellenberger M., Valat J., Bellocq A. M. Int. J. Pept. Protein Res., 1975, v. 7, p. 345—360.
15. Chandrasekaran R., Lakshminarayanan A. V., Pandye U. V., Ramachandran G. N. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 303, № 1, p. 14—27.
16. Gierasch L. M., Deber Ch. M., Madison V., Niu Ch.-H., Blout E. R. Biochemistry, 1981, v. 20, p. 4730—4738.
17. Bystrov V. F., Portnova S. L., Balashova T. A., Koz'min S. A., Gavrilov Yu. D., Afanas'ev V. A. Pure and Appl. Chem., 1973, v. 36, p. 19—34.
18. Гуревич А. З. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 2, с. 197—204.
19. Андреев Н. М., Маленков Г. Г., Шкроб А. М., Шелякин М. М. Молекулярн. биология, 1971, т. 193, с. 1402—1414.
20. Tosteson D. C. Acta physiol. scand., Suppl., 1980, v. 481, p. 7—14.
21. Авотинь Г. Я., Фомина Л. А., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. Биорган. химия, 1978, т. 4, № 5, с. 581—589.
22. Jones C. R., Srikakana C. T., Kio M.-Ch., Gibbons W. A. J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, № 18, p. 5960—5961.
23. Ernst R. R. J. Chem. Phys., 1966, v. 45, p. 3845—3851.

Поступила в редакцию
30.XII.1982

**STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP FOR CYCLIC DEPSIPEPTIDES
OF VALINOMYCIN SERIES. X. [*L*-Pro², *L*-Pro⁶, *L*-Pro¹⁰]VALINOMYCIN
AND [*D*-Pro¹, *D*-Pro⁸, *D*-Pro¹²]VALINOMYCIN**

BALASHOVA T. A., FONINA L. A., GUREVICH A. Z., STAROVOITOVA N. V.,
SENYAVINA L. B., AVOTINA G. Ya., IVANOV V. T., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

Conformational and ionophoric properties of two valinomycin analogs cyclo[-(*D*-Val-*L*-Pro-*L*-Val-*D*-Hyi)₃-] (I) and cyclo[-(*D*-Val-*L*-Lac-*L*-Val-*D*-Pro)₃-] (II) were studied by spectral and extraction methods. It was shown that the replacement of all three *L*-Lac by *L*-Pro residues leads to complete destabilization of the spatial structure intrinsic in valinomycin: analog (I) exists in nonpolar and polar solutions as a mixture of numerous distorted and slowly interconverting conformers with *trans*- and *cis*-tertiary peptide bonds. Dominant spatial structures of (II) are analogous to those of valinomycin («bracelet» in nonpolar and «propeller» conformations in polar media). Analog (I) is as a weak complexone, its complexes with alkali metals being devoid of the symmetry elements. The proposed conformation of the analog II complexes is similar to the valinomycin complex. The macrocycle-cation complexes of the 2:1 stoichiometry were detected in the ethanol and methanol solutions. A good correlation is observed for analogs under study between their ion-binding capacity in homogeneous media and the capacity for transferring these ions from the aqueous into organic phase.