



УДК 577.112.6:541.69

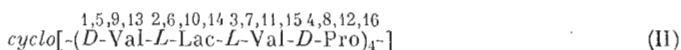
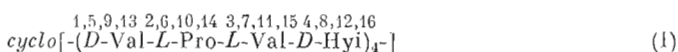
ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ СТРОЕНИЕМ И СВОЙСТВАМИ
ЦИКЛОДЕПСИПЕПТИДОВ ВАЛИНОМИЦИНОВОГО РЯДАXI. * [L-Pro², L-Pro⁶, L-Pro¹⁰, L-Pro¹⁴]- И [D-Pro⁴, D-Pro⁸, D-Pro¹², D-Pro¹⁶]
ГЕКСАДЕКАВАЛИНОМИЦИНЫБалашова Т. А., Фомина Л. А., Сенявина Л. Б.,
Старовойтова Н. В., Авотинь Г. Я., Иванов В. Т.,
Овчинников Ю. А.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Спектральными и экстракционными методами изучены конформационные особенности и ионофорные свойства гексадекааналогов валиномицина *cyclo[-(D-Val-L-Pro-L-Val-D-Hyi)₄-]* и *cyclo[-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Pro)₄-]*. В исследованных гексадекадепси-пептидах наблюдается сложное конформационное равновесие свободных форм, в котором принимают участие формы как с *транс*-, так и с *цис*-конфигурацией связи Val-Pro. Замена остатков D-Hyi в гексадекавалиномицине на остатки D-Pro приводит к предпочтительности *цис*-конфигурации третичной амидной связи в полярной среде, а аналогичная замена молочной кислоты — к предпочтительности этой конфигурации в средах любой полярности и к появлению в связи с этим конформаций, не реализующихся в валиномицине и его гексадекааналоге. Предложены конформации основных форм исследованных соединений.

Оба пролинсодержащих гексадекааналога валиномицина являются достаточно эффективными комплексонами с выраженной склонностью к образованию с ионами щелочных металлов комплексов состава макроцикл — катион, 2 : 1.

Оба аналога образуют эквимольные комплексы с органическими катионами, такими, как тетраметиламмоний, ацетилхолин, гуанидиний. При экстракции исследованными депсипептидами этих катионов из водной среды в органическую проявляется высокая избирательность по отношению ко всем щелочным катионам.

Ранее было показано, что аналоги валиномицина, имеющие больший размер цикла (четыре тетрадепсипептидных звена вместо трех у валиномицина), в целом подобны природному антибиотику по своим конформационным возможностям, но вследствие большего размера молекулярной полости существенно отличаются от него избирательностью комплексообразования. Например, гексадекавалиномицин обнаруживает в растворах щелочных солей избирательность к ионам цезия [2], а в бислойных мембранах он в отличие от валиномицина оказался эффективным переносчиком таких больших органических катионов, как тетраметиламмоний и ацетилхолин [3]. Выраженную склонность к связыванию и переносу в органическую фазу объемных катионов обнаружил в опытах по экстракции гексадекаанизолейциномицин [4], отличающийся от соответствующего производного валиномицина большей липофобностью. В свете изложенного представляло интерес изучить конформационные, металлсвязывающие и ионофорные свойства пролинсодержащих гексадекааналогов валиномицина (I) и (II), синтез которых приведен в работе [5]:



* Сообщение X см. [1]. Hyi — α-оксиэвалериановая кислота, AcCh — ацетилхолин, Gu — гуанидин.

Как и в предыдущих сообщениях, для решения поставленных задач использовался комплекс физико-химических методов: КД, ИК- и ЯМР-спектроскопия, кондуктометрия и солевая экстракция в двухфазных системах.

Конформационные свойства свободных циклодекапептидов (I) и (II)

Область Амид А ИК-спектров соединений (I) и (II) в CCl_4 и CHCl_3 содержит интенсивные полосы с ν_{NH} 3321 и 3324 cm^{-1} (рис. 1а) и 3316 и 3320 cm^{-1} (рис. 1б) соответственно, указывающие на участие протонов групп NH во внутримолекулярных водородных связях (ВМВС). В области полос валентных колебаний СО-групп присутствуют нерасщепленные полосы сложноэфирных карбониллов 1751 (CCl_4) и 1747 cm^{-1} (CHCl_3) депсипептида (I) и 1752 (CCl_4) и 1746 cm^{-1} (CHCl_3) депсипептида (II), положение которых говорит о неучастии СОО-групп в образовании водородных связей [6]. В области 1667–1650 cm^{-1} (соединение (I)) и ~ 1662 cm^{-1} (соединение (II)) наблюдаются перекрывающиеся полосы валентных колебаний, отвечающие группам NCO вторичных и третичных амидов. Указанный интервал частот согласуется с участием NCO-групп вторичных амидов в образовании ВМВС [1, 2, 4, 6]. Вместе с тем у соединения (I) в CCl_4 и CHCl_3 , а у соединения (II) при переходе от CCl_4 к CHCl_3 в области Амид А ИК-спектра появляется слабо выраженная более коротковолновая полоса с $\nu_{\text{NH}} > 3400$ cm^{-1} . Наличие в спектре коротковолновых полос Амид А указывает на ослабление системы водородных связей по сравнению с гексадекавалиномицином [2] и на появление в молекуле наряду с участвующими в образовании водородных связей свободных NH-групп.

Кривые КД для соединения (I) слабее зависят от природы растворителя, чем для соединения (II) (кривые 1–3 на рис. 2а, б). Если в спектре КД депсипептида (I) при переходе от неполярного (гексан – диоксан, 2,5:1) растворителя к полярному (EtOH, EtOH – H_2O , 3:1) (рис. 2а, 1→2→3) наблюдается небольшое изменение величины эффекта Коттона и его положения, то в КД-спектрах депсипептида (II) в этом случае резко изменяются как положение, так и величина регистрируемого эффекта

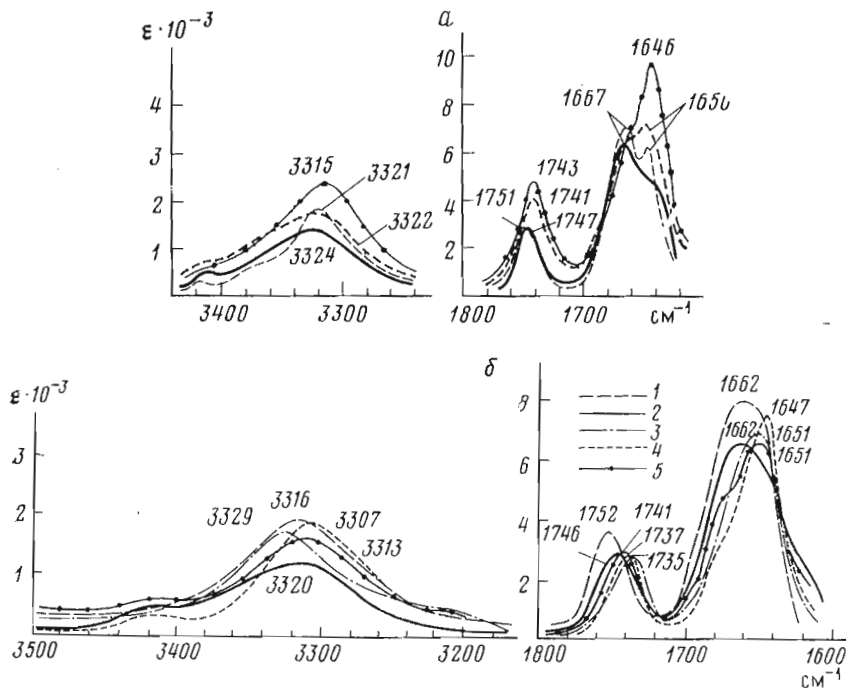


Рис. 1. ИК-спектры соединений (I) (а) и (II) (б) в CCl_4 (1), CHCl_3 (2), их Na^+ - (3), K^+ - (4) и Cs^+ -комплексов (5) в CHCl_3

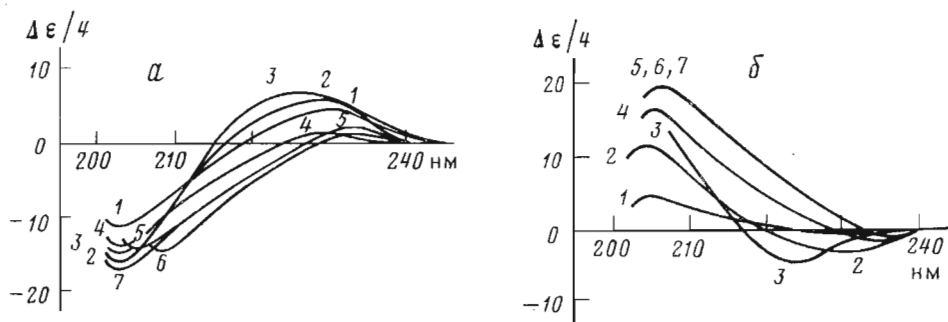


Рис. 2. Спектры КД соединений (I) (а) и (II) (б): 1 — гептан — диоксан, 2,5 : 1; 2 — EtOH; 3 — EtOH — H₂O, 3 : 1 (а) и 1 : 5 (б); 4 — 1 М NaClO₄; 5 — 0,7 · 10⁻² М KCl; 6 — ~2 · 10⁻² М CsCl; 7 — 0,6 · 10⁻² М RbCl

Коттона (рис. 2б, 1 → 2 → 3). Подобный ход изменения кривых для депсипептида (II) указывает на его значительные конформационные перестройки при изменении полярности среды.

Анализ спектров ЯМР также показывает, что циклодепсипептиды претерпевают конформационные перестройки при смене растворителя в разной степени. Так, общий вид ¹H-ЯМР-спектра соединения (II) в CDCl₃ отвечает присутствию ~90% основной формы и ~10% минорных форм, отделенных от нее высоким (в шкале ЯМР-частот) энергетическим барьером (табл. 1, 2). Наличие в спектрах ¹H- и ¹³C-ЯМР депсипептида (II) в слабополярной среде сигналов основной формы, отвечающих сигналам одного его тетрапептидного фрагмента (табл. 2, 3), свидетельствует о том, что основная форма этого депсипептида имеет C₄-симметричную структуру. Спектры ¹³C-ЯМР позволяют решить вопрос о конфигурации третичной амидной связи L-Val-D-Pro. Положение сигнала ¹³C^γ остатка D-Pro (24,23 м.д., табл. 3) и значение Δδ_{свст} этого же остатка (5,17 м.д., табл. 4) говорят о реализации в основной форме депсипептида (II) *транс*-конфигурации третичной амидной связи [7—9]. Для оценки степени структурного экранирования NH-групп был использован дифференциальный релаксационный эффект, вызываемый иминоксильным радикалом для экранированных и экспонированных NH [10]. Наблюдаемое при добавлении 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксида в раствор депсипептида (II) в CDCl₃ незначительное уширение сигналов NH (30 (D-Val) и 27 Гц/моль (L-Val)) демонстрирует достаточно эффективное экранирование этих протонов от растворителя. Об этом же свидетельствует и то, что изменение концентрации раствора депсипептида (II) в CDCl₃ от 8,0 · 10⁻² до 2,5 · 10⁻³ М практически не влияет на химические сдвиги сигналов NH (табл. 2). Вывод об экранировании всех NH-протонов от растворителя согласуется с данными, полученными из ИК-спектров, об участии NH в образовании ВМВС. При анализе значений температурных коэффициентов химических сдвигов сигналов NH основной формы не найдено корреляции полученных значений Δδ/ΔT (табл. 2) и факта участия всех NH основной формы в ВМВС. Оценку значений полученных Δδ/ΔT с точки зрения экранированности NH от растворителя затрудняет существование в растворе депсипептида (II) равновесия нескольких конформационных форм. Однако можно предположить, что большее значение Δδ/ΔT N-протонов связано с меньшей устойчивостью ВМВС, образованных NH этих остатков. При этом NH-протоны остатков D-Val образуют ВМВС типа 4 → 4, стабилизируя β-изгибы во фрагментах L-Lac-L-Val-D-Pro-D-Val*. С образованием β-изгибов в указанных фрагментах связан аномальный сдвиг одного из протонов группы C^δH₂ остатков D-Pro (~4,2 м.д., табл. 2) [12], аналогичный наблюдаемому как в пролинсодержащих октааналогах валиномицина [13], так и в D-пролинсодержащем додекааналоге валиномицина [1] и

* В депсипептиде (II) не образуются γ-изгибы с D-Pro-остатком в *i*+1-м положении, стабилизированные ВМВС типа 3 → 1 L-Val(CO...HN)D-Val, на что указывает значение химического сдвига ¹³C^β остатка D-Pro (29, 40 м.д., табл. 3), не характерное для таких структур [11].

Химические сдвиги (м.д.) и константы спин-спинового взаимодействия (Гц, в скобках) * протонов соединения (I) и его комплексов ($t \sim 30^\circ \text{C}$)
 В квадратных скобках приведены значения $(\Delta\delta/\Delta T) \cdot 10^3$ м.д./град

Растворитель	Концентрация, 10 ⁻³ М	Фрагмент												Содержание форм, %
		С ^α H остатков				NH остатков				L-Val	7,15			
		D-Val	L-Val	L-Pro	D-Hu1	D-Val	D-Hu1	D-Val	L-Val					
		6,14	2,10	3,11	7,15	2,10	6,14	4,12	8,16	1,9	5,13	3,11		
CCl ₄ - CDCl ₃ (9 : 1)	0,5	3,15 3,29	3,52 4,14	4,77 (4,0)	4,01 (9,2)	4,55 (7,0)	4,07 (8,0)	4,44 (5,5)	5,68 (~4,0)	7,91 (5,8)	6,36 (10,7)	7,26 (10,0)	7,48 (7,1)	~85 (B)**
	2,0	3,26 3,40 3,57	3,57 4,08	4,83 (4,3)	4,07 (10,4)	4,62 (7,9)	4,17 (9,0)	4,48 (5,5)	5,74 (1,8)	7,51 (6,0)	6,18 (10,7)	7,40 (10,5)	7,54 (7,3)	~5 60 (B)
CD ₃ C ₆ D ₁₁	1,3	3,14 3,33	3,53 4,19	5,07 (3,0)	4,00 (10,1)	4,62 (7,5)	4,18 (7,9)	4,38 (7,0)	5,87 (2,0)	8,15 (3,3)	7,67 (14,0)	7,37 (14,8)	7,54 (2,0)	95 (B)**
	1,5	3,03 3,75	3,61 3,86	5,10 (4,2)	4,24 (10,0)	4,65 (7,7)	4,51 (9,2)	4,58 (6,6)	5,98 (2,0)	8,30 (5,6)	7,27 (14,0)	7,60 (14,5)	7,86 (4,0)	80 (B)**
C ₂ D ₅ OH	1,7	3,14 3,40	~3,6 4,22	5,09 (2,4)	4,07 (10,0)	4,58 (7,2)	4,30 (8,0)	4,42 (7,0)	5,86 (2,0)	8,08 (5,0)	7,96 (10,2)	7,54 (10,4)	7,64 (6,8)	60 (B)
	2,7	—	—	—	—	—	—	—	—	8,08 (6,5)	8,22 (10,0)	7,65 (10,2)	7,83 (6,8)	40 40 (B)
CDCl ₃ + K+	5,9	3,65	4,07	3,97 (7,9)	—	4,77 (~7)	—	4,79 (3,5)	—	8,08 (3,2)	—	7,55 (14,6)	—	60
	0,6	3,63	4,06	3,93 (7,5)	—	4,66 (~7)	—	5,02 (3,5)	—	8,14 (6,1)	—	7,74 (2,7)	—	—
CDCl ₃ + Tl+ CDCl ₃ + (CH ₃) ₄ N+ CDCl ₃ + Gu+	0,5	3,65	4,11	3,97	—	4,68	—	5,07	—	8,17	—	7,81	—	—
	0,1	3,60	4,04	3,82 (9,0)	—	4,63 (6,2)	—	4,95	—	8,50 (2,5)	—	8,07 (1,7)	—	—
CDCl ₃ + AcCh+ C ₂ D ₅ OH + K+ C ₂ D ₅ OH + AcCh+	0,11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1,6	3,77	4,16	4,15	—	4,41 (10,4)	—	5,0	—	8,50 (2,0)	—	8,06 (1,7)	—	—
		—	—	—	—	—	—	5,0 (~4)	—	8,21 (4,5)	—	7,88 (1,7)	—	—
		—	—	—	—	—	—	—	—	8,59 (4,0)	—	8,12 (1,8)	—	—

* $\delta^J_{\text{HN-C}^{\alpha}\text{H}}$ = 1,09- $\delta^J_{\text{HN-C}^{\alpha}\text{H}}$ эл сперт; $\Sigma \delta^J_{\text{HC}^{\alpha}\text{-C}^{\beta}\text{H}}$ (L-Pro). ** Имеются формы минорной населенности. ** Время 50% обмена NH → ND ($\tau_{1/2}$) измерено при добавлении ~0,05 мМ CD₃OD.

Химические сдвиги (м.д.) и константы спин-спинового взаимодействия (Гц, в скобках) * прогинов соединения (II) и его комплексов ($t \sim 30^\circ \text{C}$)
 В квадратных скобках приведены значения $(\Delta\delta/\Delta T) \cdot 10^3$ м.д./град

Растворитель	Концентра- ция, 10 ⁻² М	Фрагмент										Содержание Формы, %	
		С α Н остатков		NH остатков				NH остатков					
		С α Н, D-Pro 4, 8, 12, 16	D-Val 1, 5, 9, 13	L-Val 3, 7, 11, 15	L-Lac 2, 6, 10, 14	D-Pro 4, 8, 12, 16	D-Val 1, 5, 9, 13	L-Val 3, 7, 11, 15	L-Val 3, 7, 11, 15	D-Val 1, 5, 9, 13	L-Val 3, 7, 11, 15		
CCl ₄ ; CDCl ₃ (5 : 1)	0,2	3,55; 4,23	4,30 (8,0)	3,99 (8,9)	5,30 (7,2)	4,57 (7,4)	7,27 [0,3] (9,6)	8,12 [8,0] (6,4)	7,32	8,03	8,08	8,12 [8,0] (6,4)	90**
CDCl ₃	0,25	—	—	—	—	—	—	—	7,30 [-2,1] (9,7)	8,05 [15,2] (6,7)	8,05 [15,2] (6,7)	—	10
CDCl ₃ + Cs+	8,0	3,57; 4,20	4,43 (7,5)	4,14 (9,9)	5,32 (6,9)	4,64 (7,0)	7,75 [4,0] (8,7)	8,45 [7,6] (7,2)	7,54 [1,2] (10,4); 7,69 [0,6] (7,2);	8,09 (7,0); 8,11 (8,4); 8,12 (5,8); 8,34 [10,0] (11,0)	8,09 (7,0); 8,11 (8,4); 8,12 (5,8); 8,34 [10,0] (11,0)	—	90
C ₂ D ₃ OH	1,8	—	—	—	—	—	—	—	7,76 [4,0] (6,5); 7,91 [3,9] (9,3);	8,09 (7,0); 8,11 (8,4); 8,12 (5,8); 8,34 [10,0] (11,0)	8,09 (7,0); 8,11 (8,4); 8,12 (5,8); 8,34 [10,0] (11,0)	—	10
CD ₃ OH	2,0	—	—	—	—	—	—	—	7,83 [4,3] (8,6)	8,17 [7,0] (6,9)	8,17 [7,0] (6,9)	—	90
CDCl ₃ + Na+	0,2	3,64; 4,19	4,01 (9,0)	3,93 (10,5)	5,23 (7,0)	4,43 (11,2)	7,31 [~0] (8,1)	8,08 [2,4] (4,7)	7,69 [4,8] (9,8); 7,88 [3,9] (9,5); 7,93 [3,3] (8,8);	8,08 [2,4] (4,7)	8,08 [2,4] (4,7)	—	90
CDCl ₃ + K+	1,8	3,64; 4,22	4,08 (8,2)	3,98 (10,0)	5,33 (6,8)	4,49 (9,8)	7,39 [2,4] (7,8)	8,06 [2,7] (4,7)	7,49 [4,0] (7,4)	8,06 [5,0] (4,6)	8,06 [5,0] (4,6)	—	10
CDCl ₃ + Cs+	0,1	3,65; 4,14	4,08 (8,0)	4,02 (9,6)	5,27 (7,0)	4,55 (9,3)	7,43 [1,7] (8,0)	7,89 [4,2] (4,8)	7,43 [1,7] (8,0)	7,89 [4,2] (4,8)	7,89 [4,2] (4,8)	—	90
CDCl ₃ + Tl+	0,2	3,67; 4,16	4,25	4,08 (10,3)	5,19	4,61	—	—	—	—	—	—	90
CDCl ₃ + (CH ₃) ₄ N+	0,1	3,61; 4,06	3,75 (9,2)	3,92 (9,5)	5,27	4,57	7,98 [2,3] (4,8)	8,35 [3,3] (3,6)	7,98 [2,3] (4,8)	8,35 [3,3] (3,6)	8,35 [3,3] (3,6)	—	90
CDCl ₃ + Gu+	0,1	3,63; 4,12	3,84	4,01 (9,2)	5,41 (7,0)	4,54 (7,3)	7,70 [3,6] (4,8)	7,99 [2,5] (3,5)	7,70 [3,6] (4,8)	7,99 [2,5] (3,5)	7,99 [2,5] (3,5)	—	90
CDCl ₃ + AcCh+	0,1	—	—	3,90 (10,0)	5,25	—	7,99 [2,0] (4,9)	8,35 [2,3] (3,6)	7,99 [2,0] (4,9)	8,35 [2,3] (3,6)	8,35 [2,3] (3,6)	—	90
C ₂ D ₃ OH + K+	1,8	3,75; ~4,2	4,18 (7,8)	4,09 (10,0)	—	—	7,53 [2,7] (8,0)	8,15 [3,5] (5,2)	7,53 [2,7] (8,0)	8,15 [3,5] (5,2)	8,15 [3,5] (5,2)	—	90
CD ₃ OH + K+	1,8	3,74; ~4,2	4,22 (8,2)	4,19 (10,2)	—	—	7,64 [4,2] (7,9)	8,06 [5,4] (5,8)	7,64 [4,2] (7,9)	8,06 [5,4] (5,8)	8,06 [5,4] (5,8)	—	90
C ₂ D ₃ OH + Tl+	—	3,6; 4,15	4,24 (7,6)	4,16 (9,5)	4,57	—	7,66 [2,0] (8,4)	8,09 [3,4] (5,7)	7,66 [2,0] (8,4)	8,09 [3,4] (5,7)	8,09 [3,4] (5,7)	—	90
C ₂ D ₃ OH + Gu+	0,3	—	—	—	—	—	7,84 [4,8] (7,6)	8,11 [6,0] (5,6)	7,84 [4,8] (7,6)	8,11 [6,0] (5,6)	8,11 [6,0] (5,6)	—	90
C ₂ D ₃ OH; CDCl ₃ (9 : 1) + Gu+	0,3	—	—	—	—	—	7,82	8,11 (5,5)	7,82	8,11 (5,5)	8,11 (5,5)	—	90
C ₂ D ₃ OH; CDCl ₃ (7 : 3) + Gu+	0,3	—	—	—	—	—	7,79	8,11 (4,6)	7,79	8,11 (4,6)	8,11 (4,6)	—	90
C ₂ D ₃ OH; CDCl ₃ (1 : 1) + Gu+	0,3	—	3,95 (8,8)	4,07 (9,3)	5,41	—	7,79 [3,7] (6,4)	8,09 [4,3] (3,8)	7,79 [3,7] (6,4)	8,09 [4,3] (3,8)	8,09 [4,3] (3,8)	—	90

*—** См. примечания к табл. 1.

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

Соединение	Растворитель	Концентрация, 10^{-2} М	Фрагмент			
			C_β L-(D)-Prto	C_γ L-(D)-Prto	СО остатков 3, 7, 11, 15	4, 8, 12, 16
(I)	CDCl_3	7,2	29,85	24,26	170,00; 171,35; 171,53; 172,86; 174,21	170,00; 171,35; 171,53; 172,86; 174,21
			32,05	22,55		
			28,18 *	24,56 *		
	$\text{CD}_3\text{C}_6\text{D}_5$	6,0	30,07	24,30	169,89 **; 171,76 **; 171,86 **	169,89; 171,49; 171,97; 174,95
			32,50	23,08	168,96; 174,35; 174,67; 173,52	
			30,14-33,25	25,15	171,05; 174,57; 174,97; 172,31; 172,61; 172,70; 174,21; 174,75; 175,26	
	CD_3OH	4,4	25,69	25,69		
			23,40	23,40		
			24,26	24,26	172,34	173,85
(II)	$\text{CDCl}_3 + \text{K}^+$	4,6	30,23 или 29,41	24,25	172,45; 172,45; 173,23; 170,93	
			30,38	24,96	172,84; 174,42	171,48; 173,33
			29,40	24,23	169,81	171,96
	$\text{C}_2\text{D}_5\text{OH} + \text{K}^+$	6,8	30,08	24,27	173,39; 172,44	171,79; 173,39
			30,08	24,27		
			30,91 или 29,73	24,27		
	$\text{CDCl}_3 + \text{Ti}^+$	3,4	30,67	25,01	174,5-173,1	172,66; 174,89
			30,24 или 30,55	30,24 или 30,55	172,84; 173,26	172,93; 174,20

* Сигналы формы А.

** Сигналы минорных форм.

Разница химических сдвигов сигналов $^{13}\text{C}^\beta$ и $^{13}\text{C}^\gamma$ ($\Delta\delta_{\text{C}^\beta, \text{C}^\gamma}$, м.д.) и значения торсионных углов ψ (град) остатков пролина

Соединение	Растворитель	Форма	$\Delta\delta^*$	ψ^{**}
(I)	CDCl_3	A	3,62	140 или -20
		B	{ 5,59 9,50	{ -175 147 -27
	$\text{CD}_3\text{C}_6\text{D}_5$	B	{ 5,77 9,42	{ -160 146 -26
			5,46	-169 -71
	$\text{CDCl}_3 + \text{K}^+$		5,98 или 5,16	-154(-177) -86(-63)
	$\text{CDCl}_3 + \text{TI}^+$		5,42	180 -70
$\text{C}_2\text{D}_5\text{OH} + \text{K}^+$		5,17	177 63	
(II)	CDCl_3		5,81	159 81
		$\text{CDCl}_3 + \text{K}^+$	5,81	159 81
	$\text{CDCl}_3 + \text{TI}^+$	5,64 или 5,45	164(169) 76(71)	
	$\text{C}_2\text{D}_5\text{OH} + \text{K}^+$	5,66	173 77	
	$\text{C}_2\text{D}_5\text{OH} + \text{TI}^+$	5,46 или 5,77	169(160) 71(80)	

* Погрешность измерения $\pm 0,05$ м.д.** Значения угла ψ рассчитаны согласно работе [7] с точностью $\pm 10^\circ$.

обусловленный анизотропным влиянием карбонильных групп остатков *L*-Лас, участвующих в образовании ВМВС.

Образование β -изгибов фрагментами *L*-Лас-*L*-Вал-*D*-Про-*D*-Вал подтверждается наблюдаемым ядерным эффектом Оверхаузера (ЯЭО) (табл. 5), свидетельствующим о наличии диполь-дипольного взаимодействия между пространственно сближенными до 2–5 Å протонами [14]. (ЯЭО регистрировали в образце депептида (II) в смеси $\text{CCl}_4 - \text{CDCl}_3$, 5 : 1, при -30°C .) Так, при насыщении C^{13}H -сигнала остатка *D*-Про при 3,55 м.д. наблюдается сигнал ЯЭО на C^αH остатка *L*-Вал ($\sim 10\%$, табл. 5), что согласуется с положением остатков *L*-Вал и *D*-Про соответственно в $i+1$ - и $i+2$ -м положениях β -изгиба типа II [15, 16].

Наблюдаемые значения $^3J_{\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}}$ остатков *L*-Вал (6,4–6,7 Гц, табл. 2) также согласуются с найденным этих остатков в $i+1$ -м положении β -изгиба ($\varphi \sim -80^\circ$).

ЯЭО наблюдается также между C^{13}H остатка *D*-Про, сигнал которого находится в слабом поле (4,23 м.д.), и NH остатков *D*-Вал, участвующих в образовании ВМВС типа 4→1 этих изгибов.

Так как карбонилы сложноэфирных групп не участвуют в образовании водородных связей, в депептиде (II) не образуются ВМВС типа 3→1 между NH остатков *L*-Вал и CO остатков *D*-Вал, и для NH-групп *L*-Вал-остатков возможно образование ВМВС типа 4→1 или 5→1. Большая величина ЯЭО на сигнале C^αH *L*-Лас-остатков при насыщении NH остатков *L*-Вал ($\sim 10\%$, табл. 5) не согласуется с образованием β -изгибов фрагментов *D*-Про-*D*-Вал-*L*-Лас-*L*-Вал, стабилизированных ВМВС типа 4→1 [17]; возможно, NH-группы *L*-Вал-остатков образуют ВМВС типа 5→1 с CO-группами остатков *L*-Вал. Образующиеся ВМВС очень неустойчивы, и при нагревании образца до $\sim 60^\circ\text{C}$ конформация дестабилизируется (в ^1H -ЯМР-спектре происходит уширение всех сигналов). При охлаждении раствора депептида (II) в CDCl_3 в ^1H -ЯМР-спектре наблюдается уширение сигналов (рис. 3), которое начинается с сигнала NH-протонов *L*-Вал-остатков (при $\sim -25^\circ\text{C}$), при понижении температуры до $-50 \div -55^\circ\text{C}$ уширяются сигналы как NH- (*D*-Вал), так и C^αH -протонов депептидной цепи. Вероятно, это связано с возможностью реализации в растворе ряда других конформационных форм, образование которых вызвано конкуренцией CO-групп остатков *L*-Вал, *D*-Про за участие в образовании ВМВС типа 5→1 или 4→1 с NH-группами *L*-Вал-остатков. Отсутствие уширения сигналов в ^1H -ЯМР-спектре депептида (II) в смеси $\text{CCl}_4 - \text{CDCl}_3$, 5 : 1, при охлаждении до -30°C объясняется более высокой, чем в CDCl_3 , скоростью миграции этой водородной связи по циклу.

**Ядерный эффект Оверхаузера, наблюдаемый между
протонами аминокислотных остатков депептида (II)**

Насыщаемый сигнал		Наблюдаемый сигнал		ЯЭО, %
NH	<i>D</i> -Val	C ^α H	<i>D</i> -Val	6,5 *
		C ^β H	<i>D</i> -Val	3 **
		C ^{δ2} H	<i>D</i> -Pro	6,5 *
NH	<i>L</i> -Val	C ^α H	<i>D</i> -Pro	2,5
		C ^α H	<i>L</i> -Val	3
		C ^β H	<i>L</i> -Val	8
		C ^α H	<i>L</i> -Lac	8
C ^{δ1} H	<i>D</i> -Pro	C ^{δ2} H	<i>D</i> -Pro	30
		C ^γ H ₂	<i>D</i> -Pro	15
		C ^α H	<i>L</i> -Val	8

* Сигнал ЯЭО, общий для C^αH остатка *D*-Val и C^{δ2}H остатка *D*-Pro из-за их перекрывания.

** Сигнал ЯЭО, общий для C^βH остатков *D*-Val и *D*-Pro.

Наблюдаемое значение $^3J_{\text{NH-C}^\alpha\text{H}}$ остатков *D*-Val, равное 9,7 Гц, представляет собой усредненное значение $^3J_{\text{NH-C}^\alpha\text{H}}$, характерной для *D*-Val-остатков, включенных в $i+1$ -е положение β -изгиба фрагментов *D*-Pro-*D*-Val-*L*-Lac-*L*-Val и для *trans*-ориентации NH-C^αH-фрагмента остатков *D*-Val, реализующейся в молекуле при образовании ВМВС типа 5→1, между NH ($i+4$)-го остатка *L*-Val и CO i -го остатка *L*-Val.

Таким образом, депептид (II) в слабополярных растворителях не представляет собой жестко фиксированной конформации, а существует в виде быстро обменивающихся конформеров, в каждом из которых сохраняются β -изгибы типа II фрагментов *L*-Lac-*L*-Val-*D*-Pro-*D*-Val, стабилизированные ВМВС, а различие реализующихся конформеров связано с изменением торсионных углов фрагментов *D*-Val - *L*-Lac.

При увеличении полярности растворителя гексадепептид (II) претерпевает сильные конформационные изменения. В CD₃OH и C₂D₅OH

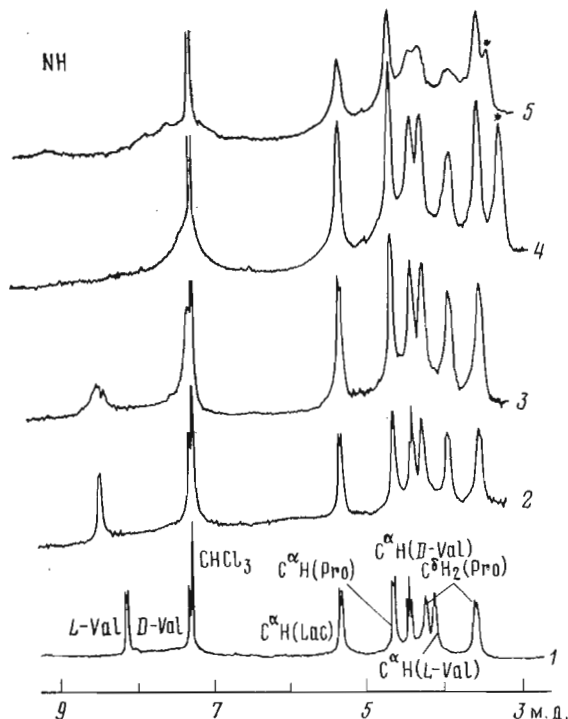


Рис. 3. Спектры ¹H-ЯМР (300 МГц) депептида (II) в CDCl₃ при 22 (1), -22 (2), -41 (3), -54 (4) и -64° С (5) (область сигналов NH и C^αH, * - примесь)

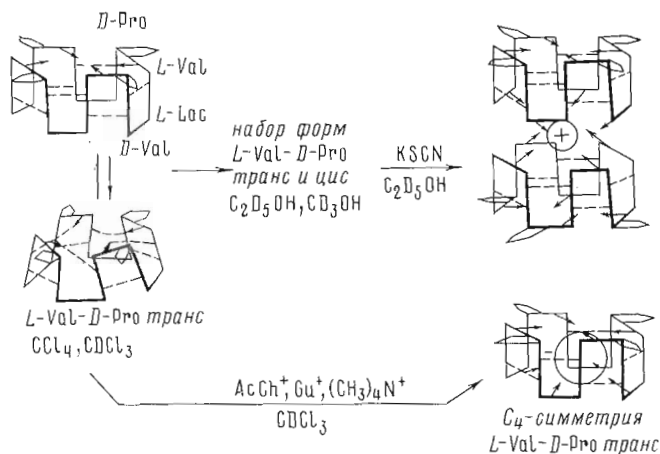
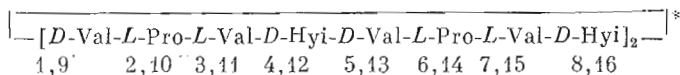


Рис. 4. Схематически представленные конформационные изменения основной цепи дипептида (II) при изменении растворителя и комплексообразовании. Стрелками обозначены кислороды CO-групп, пунктиром — ВМВС

соединение (II) существует в виде равновесия нескольких (≥ 6) симметричных и/или асимметричных конформаций различной населенности. Температурные коэффициенты ($\Delta\delta/\Delta T$) сигналов NH наблюдаемых форм очень различны (варьируют в интервале $(0,6-10,0) \cdot 10^{-3}$ м.д./град, табл. 2). Скорее всего, имеются как экспонированные, так и участвующие в образовании ВМВС NH-группы. Значения ${}^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$ меняются от 5,8 до ~ 10 Гц. Коалесценции сигналов наблюдаемых форм не удается достичь при нагревании раствора дипептида (II) в спирте до 70°C . Очевидно, резко увеличенное число форм связано с увеличением выгодности *цис*-конфигурации третичной амидной связи в полярной среде. На рис. 4 в схематическом виде представлен характер конформационных перестроек циклодипептида (II) при смене растворителя.

Отсутствие серьезных изменений в КД-спектрах дипептида (I) (рис. 2а, 1 \rightarrow 2 \rightarrow 3) объясняется достаточной конформационной стабильностью исследуемого соединения. Действительно, как видно из ${}^1\text{H}$ -ЯМР-спектров, дипептид (I) в слабополярных растворителях ($\text{CCl}_4 - \text{CDCl}_3$, 9:1; CDCl_3 , $\text{CD}_3\text{C}_6\text{D}_{11}$, $\text{CD}_3\text{C}_6\text{D}_5$) представляет собой набор форм с ярко выраженной предпочтительной населенностью одной из них (табл. 1). В ${}^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах основной формы наблюдаются близкие величины значений ${}^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$ и ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{-C}\beta\text{H}}$ как аминокислотных, так и *D*- α -оксизавалеарианового остатков, а также $\Delta\delta/\Delta T$ сигналов NH остатков *D*-Val^{1,9}, *L*-Val^{3,11} и *L*-Val^{7,15} (табл. 1). Эти данные позволяют предложить для наиболее населенной формы дипептида (I) в этом наборе растворителей одинаковую конформацию.

В спектрах ${}^1\text{H}$ - и ${}^{13}\text{C}$ -ЯМР наиболее населенной формы дипептида (I) в слабополярных растворителях наблюдаются сигналы октадипептидного фрагмента. Следовательно, основная форма дипептида (I) (форма В) имеет C_2 -симметричную структуру, т. е. конформацию, в которой эквивалентны октадипептидные (а не тетрадипептидные) сегменты



Конфигурация третичной амидной связи *D*-Val-*L*-Pro основной формы дипептида (I) была определена при помощи ${}^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров. Значения $\delta_{\text{C}\beta}$ (*L*-Pro), равные 22,56 и 24,26 м.д. (табл. 3), а также величины $\Delta\delta_{\text{C}\beta, \text{C}\gamma}$ остатков *L*-Pro (9,50 и 5,59 м.д., табл. 4) указывают на то, что в

* Остатком *D*-Val¹ обозначается один из остатков *D*-Val, амидная связь между которыми и *L*-Pro имеет *транс*-конфигурацию.

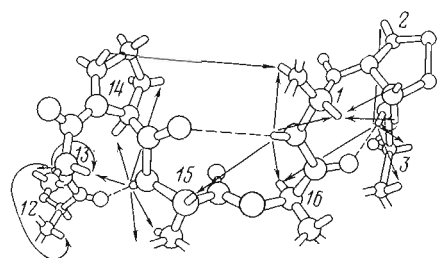


Рис. 5

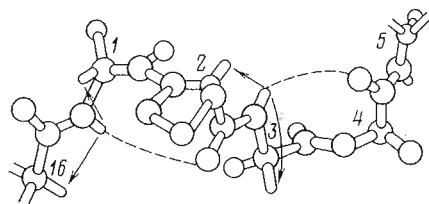


Рис. 6

Рис. 5. Предполагаемая конформация формы В депептида (I) (фрагмент). Стрелками показаны наблюдаемые ЯЭО между соответствующими протонами. Цифры обозначают C^α -атом соответствующего остатка

Рис. 6. Фрагмент гипотетической конформации формы А депептида (I). Стрелками показаны наблюдаемые ЯЭО

молекуле две связи $D\text{-Val-L-Pro}$ имеют *цис*-, а две другие — *транс*-конфигурацию [7–9]. Так как молекула обладает C_2 -симметрией, то конфигурация третичных амидных связей основной формы депептида (I) представляет собой 1,2-*транс*–5,6-*цис*–9,10-*транс*–13,14-*цис*. При добавлении 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксида к раствору депептида (I) в $CDCl_3$, NH-группы остатков $D\text{-Val}$ (5,13) оказываются доступными иминоксильному радикалу, сигнал их NH-протонов (δ 6,18 м.д.) уширяется на 335 Гц/моль; следовательно, эти протоны экспонированы в растворитель ($CDCl_3$) [10]. Остальные сигналы NH ($D\text{-Val}^{1,9}$, $L\text{-Val}^{3,11}$, $L\text{-Val}^{7,15}$) уширяются в гораздо меньшей степени (на 45–55 Гц/моль), значит, эти NH-протоны экранированы от растворителя, участвуя в образовании ВМВС, что согласуется с данными ИК-спектров (рис. 1а), т. е. в образовании ВМВС участвуют NH-протоны остатков $D\text{-Val}^{1,9}$, $L\text{-Val}^{3,11}$ и $L\text{-Val}^{7,15}$. NH-Протоны остатков $D\text{-Val}^{5,13}$ экспонированы в растворитель.

Как видно из спектров ИК (рис. 1а), сложноэфирные СО-группы не участвуют в ВМВС и, следовательно, в депептиде (I) нет ВМВС типа 3→1 для NH-протонов остатков $D\text{-Val}$ и типа 5→1 для NH-протонов остатков $L\text{-Val}$. Значение химического сдвига $^{13}C^\beta$ *транс*- $L\text{-Pro}$ -остатков (2,10) (29,85 м.д., табл. 3) позволяет также исключить образование γ -изгибов фрагментов $D\text{-Val}^{1,9}\text{-L-Pro}^{2,10}\text{-L-Val}^{3,11}$ с пролиновым остатком в $i+1$ -м положении [9], стабилизированных ВМВС типа 3→1.

В спектрах 1H -ЯМР депептида (I) наблюдается аномально смещенный в слабое поле сигнал $C^\delta H$ пролинового остатка ($\sim 4,1$ м.д.), как в 1H -ЯМР-спектрах пролинсодержащих октааналогов валиномицина [13] и D -пролинсодержащего додеканалога валиномицина [1], что позволяет предположить для фрагментов $D\text{-Hyl}^{16,8}\text{-D-Val}^{1,9}\text{-L-Pro}^{2,10}\text{-L-Val}^{3,11}$ образование аналогичных β -изгибов.

Наблюдаемые в спектре ЯЭО также согласуются с образованием β -изгиба фрагментам $D\text{-Hyl}^{16,8}\text{-D-Val}^{1,9}\text{-L-Pro}^{2,10}\text{-L-Val}^{3,11}$. Так, при насыщении сигналов $C^\delta H_2$ -протонов $L\text{-Pro}^{2,10}$ -остатков имеется ЯЭО на $C^\alpha H$ остатков $D\text{-Val}^{1,9}$ ($\sim 4\text{--}4,5\%$), что согласуется с нахождением остатков $D\text{-Val}^{1,9}$ и $L\text{-Pro}^{2,10}$ в $i+1$ - и $i+2$ -м положениях β -изгиба типа II. ЯЭО ($\sim 1\%$, табл. 5), фиксируемый при насыщении NH-протона ($L\text{-Val}^{3,11}$) на сигналах $C^\alpha H$, $C^{\delta 2} H$, $C^\beta H_2$, $C^\gamma H_2$ остатков $L\text{-Pro}^{2,10}$, а также на $C^\alpha H$ остатков $D\text{-Hyl}^{16,8}$, подтверждает образование фрагмента $D\text{-Hyl}^{16,8}\text{-D-Val}^{1,9}\text{-L-Pro}^{2,10}\text{-L-Val}^{3,11}$ β -изгибов типа II [15–17], стабилизированных ВМВС 4→1 между NH остатков $L\text{-Val}^{3,11}$ и СО остатков $D\text{-Hyl}^{16,8}$ (рис. 5).

В ВМВС включены NH-группы остатков $L\text{-Val}^{7,15}$. Протоны этих групп могут участвовать в образовании ВМВС только типа 4→1, стабилизируя β -изгиб фрагмента $D\text{-Hyl}^{4,12}\text{-D-Val}^{5,13}\text{-L-Pro}^{6,14}\text{-L-Val}^{7,15}$ с *цис*-конфигурацией третичной амидной связи $D\text{-Val}^{5,13}\text{-L-Pro}^{6,14}$ и с ориентацией пролинового цикла остатков $Pro^{6,14}$ внутрь полости молекулы (рис. 5). Подтверждением этой структуры служит ЯЭО между NH остатков $L\text{-Val}^{7,15}$ и $C^\alpha H$ остатков $L\text{-Pro}^{6,14}$, $C^\alpha H$ остатков $D\text{-Val}^{5,13}$ и одним из $C^\beta H$ -протонов

Ядерный эффект Оверхаузера, наблюдаемый между протонами аминокислотных остатков формы В депептида (I)

Насыщаемый сигнал		Наблюдаемый сигнал		ЯЭО, %
NH	<i>D</i> -Val ^{1,9}	C ^α H	<i>D</i> -Val ^{1,9}	3
		C ^β H	<i>D</i> -Val ^{1,9}	3,5
		C ^α H	<i>D</i> -Hyl ^{8,16}	1,5
NH	<i>L</i> -Val ^{3,11}	C ^α H	<i>L</i> -Val ^{7,15}	1
		C ^α H	<i>L</i> -Val ^{3,11}	5
		C ^β H	<i>L</i> -Val ^{3,11}	0,5
		C ^α H	<i>L</i> -Pro ^{2,10}	0,7
		C ^β H ₂	<i>L</i> -Pro ^{2,10}	0,5
		C ^γ H ₂	<i>L</i> -Pro ^{2,10}	1
		C ^α H	<i>D</i> -Hyl ^{8,16}	0,5
		C ^β H	<i>L</i> -Pro ^{2,10}	0,7
		C ^α H	<i>D</i> -Val ^{5,13}	4
NH	<i>D</i> -Val ^{5,13}	C ^β H	<i>D</i> -Val ^{5,13}	4
		C ^β H	<i>D</i> -Hyl ^{4,12}	
		C ^α H	<i>L</i> -Val ^{3,11}	
		C ^α H	<i>D</i> -Hyl ^{4,12}	0,5
		C ^α H	<i>L</i> -Pro ^{6,14}	0,5
		C ^α H	<i>L</i> -Val ^{7,15}	3,5 *
		C ^β H	<i>L</i> -Val ^{7,15}	3
		C ^α H	<i>L</i> -Pro ^{6,14}	5,5
		C ^β H	<i>L</i> -Pro ^{6,14}	1
C ^α H	<i>L</i> -Val ^{3,11}	C ^α H	<i>D</i> -Val ^{5,13}	3,5 *
		C ^α H	<i>D</i> -Hyl ^{8,16}	0,5
		C ^β H	<i>L</i> -Val ^{3,11}	6
		NH	<i>L</i> -Val ^{3,11}	7
		C ^β H	<i>L</i> -Pro ^{2,10}	13,5
		C ^γ H ₂	<i>L</i> -Pro ^{2,10}	5
		C ^α H	<i>L</i> -Pro ^{2,10}	0,7
		C ^α H	<i>D</i> -Val ^{1,9}	4
		C ^α H	<i>D</i> -Hyl ^{8,16}	0,7
C ^β H	<i>L</i> -Pro ^{2,10}	C ^β H	<i>L</i> -Pro ^{2,10}	13,5
		C ^γ H ₂	<i>L</i> -Pro ^{2,10}	4
		C ^α H	<i>D</i> -Val ^{1,9}	4,5
		NH	<i>L</i> -Val ^{3,11}	1
		C ^α H	<i>L</i> -Val ^{3,11}	<1
		C ^β H	<i>L</i> -Pro ^{6,14}	25
C ^δ H	<i>L</i> -Pro ^{6,14}	C ^γ H ₂	<i>L</i> -Pro ^{6,14}	2,5
		C ^δ H	<i>L</i> -Pro ^{6,14}	15
		C ^β H	<i>D</i> -Val ^{1,9}	~2
C ^δ H	<i>L</i> -Pro ^{6,14}	C ^γ H ₂	<i>L</i> -Pro ^{6,14}	1,5

* Сигнал ЯЭО, общий для C^αH-протонов *L*-Val^{7,15} и *D*-Val^{5,13} из-за перекрытия их сигналов.

остатков *L*-Pro^{6,14} (при 1,58 м.д.), а также между C^δH (*L*-Pro^{6,14}) и C^βH (*D*-Val^{1,9}).

ЯЭО, наблюдаемый на сигнале C^αH остатков *L*-Pro^{6,14} при насыщении NH остатков *L*-Val^{7,15} (~5,5%), позволяет говорить о сближенности этих протонов и об их «син»-ориентации (рис. 5). Из-за сильного перекрытия сигналов C^αH остатков *D*-Val^{5,13} и *L*-Val^{7,15} (табл. 1) невозможно разделить ЯЭО на этих сигналах при насыщении сигнала NH остатков *L*-Val^{7,15}.

Группы NH (*D*-Val^{1,9}) также участвуют в образовании ВМВС типа 4→1. ЯЭО (~1,5%) между протонами NH (*D*-Val^{1,9}) и C^αH остатков *D*-Hyl^{16,8} (рис. 5) согласуется с образованием β-изгибов во фрагментах *L*-Pro^{14,9}-*L*-Val^{15,7}-*D*-Hyl^{16,8}-*D*-Val^{1,9} с участием NH-протонов *D*-Val^{1,9}-остатков в ВМВС типа 4→1. Но увеличение значений температурных коэффициентов сигнала NH остатков *D*-Val^{1,9} (3,3–4,5·10⁻³ м.д./град) по сравнению со значениями для сигнала NH остатков *L*-Val^{3,11} (0–1,8·10⁻³ м.д./град) говорит о меньшей устойчивости ВМВС (*D*-Val^{1,9})NH...CO(*L*-Pro^{14,9}).

Группы NH остатков *D*-Val^{5,13} экспонированы в растворитель. ЯЭО наблюдается между протонами этих групп и протонами C^αH и C^βH (*D*-Val^{5,13}), а также C^βH (*D*-Hyl^{4,12}) (табл. 6).

Таким образом, форма В представляет собой молекулу, обладающую C_2 -симметрией с *транс-цис-транс-цис*-конфигурацией третичных амидных связей $D\text{-Val}^1 - L\text{-Pro}^2$, $D\text{-Val}^5 - L\text{-Pro}^6$, $D\text{-Val}^9 - L\text{-Pro}^{10}$ и $D\text{-Val}^{13} - L\text{-Pro}^{14}$. NH-Протоны остатков $D\text{-Val}^{5,13}$ экспонированы в растворитель, а NH-протоны остатков $D\text{-Val}^{1,9}$, $L\text{-Val}^{3,11}$ и $L\text{-Val}^{7,15}$ участвуют в образовании ВМВС типа 4→1, стабилизируя реализующиеся в молекуле шесть β-изгибов во фрагментах $L\text{-Pro}^{14,6} - L\text{-Val}^{15,7} - D\text{-Hyl}^{16,8} - D\text{-Val}^{1,9}$; $D\text{-Hyl}^{16,8} - D\text{-Val}^{1,9} - L\text{-Pro}^{2,10} - L\text{-Val}^{3,11}$ с *транс*-конфигурацией связи $D\text{-Val}^{1,9} - L\text{-Pro}^{2,10}$ и $D\text{-Hyl}^{1,12} - D\text{-Val}^{3,13} - L\text{-Pro}^{6,14} - L\text{-Val}^{7,15}$ с *цис*-конфигурацией связи $D\text{-Val}^{5,13} - L\text{-Pro}^{6,14}$ (рис. 5).

Значения $^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$, $\Delta\delta_{\text{C}\beta, \text{C}\gamma}(L\text{-Pro})$, $^3J_{\text{HC}\alpha\text{-C}\beta\text{H}}$ и ограничения, вносимые наблюдаемым ЯЭО и образующимися ВМВС, а также рассмотрение молекулярных моделей позволили предложить для конформации депсипептида (I) (форма В) следующие значения торсионных углов:

	φ	ψ	χ^1	ω
$D\text{-Val}^{1,9}$	75	~ -120	180	180
$L\text{-Pro}^{2,10}$	-60	-75	30	
$L\text{-Val}^{3,11}$	-100	-	±60	
$D\text{-Hyl}^{4,12}$	-	-	-	
$D\text{-Val}^{5,13}$	120	-60	180	0
$L\text{-Pro}^{8,14}$	-60	147	30	
$L\text{-Val}^{7,15}$	-80	~120	180	
$D\text{-Hyl}^{8,16}$	-	60	±90	

Наблюдаемая ориентация боковых цепей валиновых и $D\text{-}\alpha$ -оксиизовалериановых остатков способствует лучшему экранированию водородных связей от растворителя.

В CDCl_3 у аналога (I) также обнаруживается C_2 -симметричная форма (табл. 1, форма А) с населенностью ~30% и *транс*-конфигурацией третичной амидной связи ($\delta_{\text{C}\gamma}(L\text{-Pro})$ 24,56 м.д., табл. 3). При добавлении в раствор иминоксильного радикала сигналы от протонов NH конформера А уширяются на 85–90 Гц/моль, что свидетельствует об экранированности их от растворителя [10]. В области Амид А ИК-спектра депсипептида (I) при переходе от CCl_4 к CHCl_3 (где появляется форма А) не наблюдается увеличения интенсивности полосы при $\nu_{\text{NH}} \sim 3420 \text{ см}^{-1}$, отвечающей свободным NH. Это позволяет говорить об участии NH-групп формы А в ВМВС. Однако эти NH в меньшей степени экранированы от растворителя, чем NH-группы формы В соединения (II) и D -пролинсодержащего додеканалога валиномицина [1]. В ^1H -ЯМР-спектре оба сигнала $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2(L\text{-Pro})$ формы А депсипептида (I) находятся при 3,57 м.д., что отвечает положению сигналов этих протонов в защищенном L -пролине [12]. Отсутствие anomalно смещенного сигнала протона $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2(L\text{-Pro})$ связано, очевидно, с тем, что в наблюдаемой форме А фрагменты $D\text{-Hyl} - D\text{-Val} - L\text{-Pro} - L\text{-Val}$ не образуют β-изгибов с ВМВС типа 4→1. В симметричной форме с *транс*-ориентацией всех четырех третичных амидных связей и с восемью ВМВС исключается и возможность образования γ-изгибов с остатком $L\text{-Pro}$ в $i+1$ -м положении ($\delta_{\text{C}\beta}(L\text{-Pro})$ 28,2 м.д., табл. 3). Включение в ВМВС NH-протонов как L -, так и D -валиновых остатков, а также инертность к образованию водородных связей карбониллов сложноэфирных групп оставляют возможность существования ВМВС только одного типа 1→2 с образованием системы конденсированных восьмичленников (рис. 6) с углами $\varphi \sim \pm 150^\circ$ (для D - и $L\text{-Val}$ соответственно) и $\psi \sim 140^\circ$ (для $L\text{-Pro}$).

При переходе от слабополярных растворителей к спиртам населенность основной формы депсипептида (I) составляет 60 и 40% для $\text{C}_2\text{D}_5\text{OH}$ и CD_3OH соответственно. Сигналы отдельных минорных форм в этих растворителях не удается выделить из-за их уширения уже при 25°C . Следовательно, переход между этими формами не сопровождается изменением конфигурации третичной амидной связи. Незначительность изменения химических сдвигов сигналов основной формы, участвующих в образовании водородных связей при переходе в спиртовой раствор, а также небольшие температурные градиенты этих сигналов (табл. 1) свидетельствуют о сохранении системы ВМВС в молекуле при изменении растворителя. Неиз-

Форма А, C_4 -симметрия

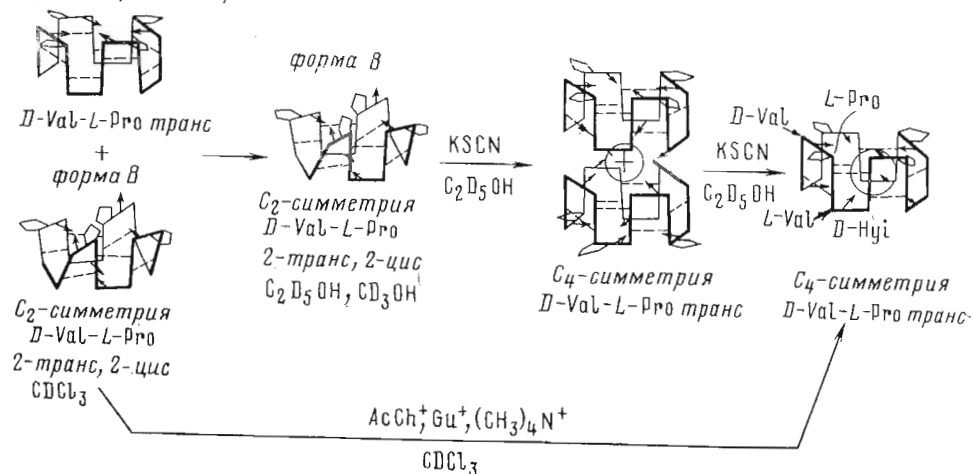


Рис. 7. Схематически представленные конформационные изменения основной цепи депептида (I) (наиболее населенных форм) при смене растворителя и комплексообразовании. Стрелками обозначены кислороды CO-групп, пунктиром — ВМВС

меньность величины $^3J_{HN-C\alpha H}$ и $^3J_{NC\alpha-C\beta H}$ всех остатков в основной форме подтверждает конформационную стабильность наблюдаемой формы.

Характер конформационных перестроек основной формы соединения (I) при смене растворителей представлен на рис. 7.

Комплексообразование в гексадекадепептидах

Рассмотрим данные по комплексообразованию соединений (I) и (II). ИК-спектры комплексов соединений (I) (рис. 1а) и (II) (рис. 1б) с K^+ , Cs^+ и Na^+ в $CHCl_3$ свидетельствуют о сохранении в комплексах системы ВМВС (ν_{NH} 3307–3322 cm^{-1} , ν_{CO} 1665–1645 cm^{-1}). Образование комплексов с K^+ , Cs^+ и Na^+ сопровождается смещением ν_{COO} соответственно на 6 и 4 cm^{-1} у депептида (I) и на 8, 4 и 10 cm^{-1} у депептида (II). Следовательно, карбонилы сложнэфирных групп депептидов (I) и (II) участвуют в ион-дипольном взаимодействии с катионом при образовании комплексов с щелочными металлами в $CHCl_3$. Перекрывание полос валентных колебаний вторичных и третичных амидных карбонил в области Амид I затрудняет, как отмечено в работе [1], возможность определения участия в ион-дипольном взаимодействии CO-групп третичных амидных связей.

Спектры ЯМР как 1H , так и ^{13}C комплексов соединения (I) с K^+ и Cs^+ и комплексов соединения (II) с Na^+ , K^+ и Cs^+ в $CDCl_3$ очень близки друг другу по химическим сдвигам регистрируемых сигналов и по значениям констант спин-спинового взаимодействия (табл. 1, 2). Очевидно, конформация образующихся комплексов депептидов со всеми использованными катионами одинакова. Спектры 1H - и ^{13}C -ЯМР комплексов соединений (I) и (II) указывают на то, что эти комплексы существуют в растворе в виде одной формы с осью симметрии C_4 вне зависимости от полярности растворителя. Спектры ^{13}C -ЯМР позволяют установить конфигурацию третичной амидной связи. Значения $\delta_{C\gamma}$ (~24 м.д., табл. 3) и $\Delta\delta_{C\beta, C\gamma}$ пролиновых остатков (табл. 4) говорят о транс-конфигурации третичных амидных связей в полученных комплексах.

В области Амид А ИК-спектров комплексов депептидов (I) и (II) с щелочными металлами наблюдаются интенсивные полосы с ν_{NH} 3307–3329 cm^{-1} (рис. 1а, б), указывающие на участие NH в образовании водородных связей. Тип образующихся ВМВС мы попробовали установить при помощи 1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии.

Наблюдаемые значения химических сдвигов сигналов $^{13}C\beta$ пролиновых остатков (~30 м.д., табл. 3) исключают образование γ -изгибов во фраг-

Ядерный эффект Оверхаузера, наблюдаемый между протонами аминокислотных остатков комплексов депсипептида (I) и (II)

Комплекс	Насыщаемый сигнал		Наблюдаемый сигнал		ЯЭО, %
(I) · K ⁺	C ^{δ1} H	<i>L</i> -Pro	C ^α H	<i>D</i> -Val	3,5
			C ^{δ2} H	<i>L</i> -Pro	>10
			C ^α H	<i>L</i> -Pro	~1
	C ^α H	<i>D</i> -H _γ i + <i>L</i> -Pro	C ^α H	<i>D</i> -H _γ i	<0,5
			C ^α H	<i>D</i> -Val	<0,5
(I) · Gu	NH	<i>D</i> -Val	C ^α H	<i>L</i> -Val	<0,5
			C ^α H	<i>D</i> -Val	5
			C ^β H	<i>D</i> -Val	10
			C ^{δ2} H	<i>L</i> -Pro	~0,5
			C ^α H	<i>D</i> -H _γ i	2,5
	NH	<i>L</i> -Val	C ^α H	<i>L</i> -Val	3,5
			C ^β H	<i>L</i> -Val	4
			C ^α H	<i>L</i> -Pro	1,5
			C ^{δ2} H	<i>L</i> -Pro	1,5
			C ^α H	<i>D</i> -H _γ i	0,5
(II) · K ⁺	NH	<i>D</i> -Val	C ^α H	<i>D</i> -Val	5
			C ^β H	<i>D</i> -Val	7
			C ^α H	<i>D</i> -Pro	1,5
			C ^{δ2} H	<i>D</i> -Pro	3
			C ^α H	<i>L</i> -Val	2,5
	NH	<i>L</i> -Val	C ^β H	<i>L</i> -Val	7
			C ^α H	<i>L</i> -Lac	5
			C ^α H	<i>L</i> -Val	7
			C ^{δ2} H	<i>D</i> -Pro	22
			C ^β H ₂ + C ^γ H ₂	<i>D</i> -Pro	7

ментах *D*-Val-*L*-Pro-*L*-Val и *L*-Val-*D*-Pro-*D*-Val депсипептидов (I) и (II) соответственно с *L*-Pro (или *D*-Pro) остатком в *i*+1-м положении, стабилизированных ВМВС типа 3→1 [1, 11].

В ¹H-ЯМР-спектрах комплексов депсипептидов (I) и (II) с щелочными металлами наблюдается аномальный сдвиг в слабое поле (~4,1 м.д., табл. 1, 2) сигнала одного из протонов групп C^δH₂ пролиновых остатков, как и в спектрах свободных депсипептидов, а также окта- и додекапролин-содержащих аналогов валиномицина [1, 13]. Этот аномальный сдвиг, как и в предыдущих случаях, вызван анизотропным влиянием карбонильной группы, которая участвует в образовании ВМВС 4→1 в β-изгибе типа II, включающем пролиновый остаток в *i*+2-м положении, т. е. фрагменты *D*-H_γi-*D*-Val-*L*-Pro-*L*-Val для комплексов соединения (I) и *L*-Lac-*L*-Val-*D*-Pro-*D*-Val для комплексов соединения (II) образуют β-изгибы. С образованием такого типа β-изгибов согласуется ЯЭО (табл. 7) между протоном C^{δ2}H пролинового остатка (~4 м.д., табл. 1) и NH-протоном, участвующим в водородных связях типа 4→1, стабилизирующих эти β-изгибы, и ЯЭО между протонами C^δH₂-группы *i*-го пролинового остатка и C^αH *i*-1-го валинового остатка в аминокислотной последовательности-(табл. 7). Угол φ пролиновых остатков в комплексах депсипептида (I) составляет ~-70° (*L*-Pro), а в комплексах депсипептида (II) ~80° (*D*-Pro) (табл. 4), что согласуется с нахождением пролиновых остатков в *i*+2-м положении β-изгиба, для которых характерны значения φ от -70 до +80° [18].

Так как карбонилы сложноэфирных групп не участвуют в образовании ВМВС, NH-группы остатков *D*-Val (соединение (I)) и *L*-Val (соединение (II)) могут образовывать ВМВС типа 4→1 *L*-Pro(CO...NH)*D*-Val и *D*-Pro(CO...NH)*L*-Val (для соединений (I) и (II) соответственно) или ВМВС типа 5→1 с CO-группами *D*- или *L*-Val для обоих депсипептидов.

Значение ³J_{NH-C^αH} остатков *L*-Val K⁺-комплекса депсипептида (I), равное 4,9 Гц, позволяет предложить для фрагментов *L*-Pro-*L*-Val-*D*-H_γi-*D*-Val также образование β-изгибов, стабилизированных ВМВС типа 4→1 *L*-Pro(CO...NH)*D*-Val.

Таким образом, депсипептидную цепь K⁺-комплекса соединения (I) можно представить в виде восьми конденсированных β-изгибов. Населен-

ность транс-ротамера $C^\alpha H-C^\beta H$ -фрагмента боковых цепей валиновых остатков $\geq 50\%$, изопропильная группа D -Ну1-остатка имеет предпочтительность *gаш*-ориентации фрагмента $C^\alpha H-C^\beta H$. Величины ${}^3J_{HN-C^\alpha H}$ для комплексов депсипептида (I) с щелочными металлами, равные 4,1–4,9 Гц (табл. 1), позволяют оценить значения угла φ L -(D)-Val ($\sim \pm 70^\circ$).

Повышенное значение ${}^3J_{HN-C^\alpha H}$ остатков D -Val (7,4–7,8 Гц) в комплексах депсипептида (II) (табл. 2) указывает на искажение анологичной валиномициновой [2, 4, 6, 19] «браслетной» структуры комплекса (φ D -Val $\sim 90^\circ$). Это искажение, возможно, обусловлено образованием комплекса состава макроцикл – катион, 2:1.

Достаточно большая величина ЯЭО на сигнале протона $C^\alpha H$ остатка L -Lac при насыщении сигнала NH L -Val-остатков (5%, табл. 7) не согласуется с образованием β -изгиба с ВМВС типа 4→1 фрагментами D -Pro- D -Val- L -Lac- L -Val K^+ -комплекса депсипептида (II). Возможно, как и в случае свободного депсипептида (II), в комплексе депсипептида (II) с щелочными металлами NH-протоны L -Val-остатков образуют ВМВС с карбонилами как D -Pro-, так и L -Val-остатков. Спектр K^+ -комплекса в $CDCl_3$ свидетельствует о быстром обмене между двумя образующимися конформациями. Однако величины $\Delta\delta/\Delta T$ сигналов обоих NH-протонов ($2,4 \cdot 10^{-3}$ (D -Val) и $2,7 \cdot 10^{-3}$ м.д./град (L -Val)), свидетельствующие об увеличении устойчивости ВМВС, а также значения ${}^3J_{HN-C^\alpha H}$, уменьшенные по сравнению с величинами, характерными для свободного депсипептида (II), позволяют говорить об увеличении в комплексе депсипептида (II) с щелочными металлами доли конформера с ВМВС типа 4→1 D -Pro(CO...HN) L -Val.

Вопрос о стехиометрии образующихся комплексов депсипептидов (I) и (II) с щелочными металлами в $CDCl_3$ мы попытались разрешить с помощью исследования таллиевых комплексов. Близость параметров ЯМР-спектров этих комплексов и комплексов с щелочными металлами говорит о подобии их конформаций. В спектре ${}^{13}C$ -ЯМР комплекса депсипептида (I) с Tl^+ в $CDCl_3$ наблюдаются четыре синглета ${}^{13}CO$ -групп: 170,93; 172,45; 172,45 и 173,23 м. д. Константу спин-спинового взаимодействия ${}^{13}C'$ с ионами ${}^{203}, {}^{205}Tl^+$ не удается зарегистрировать, очевидно, из-за быстрой скорости обмена Tl^+ между комплексом и средой. В спектре ${}^{13}C$ -ЯМР комплекса депсипептида (II) с Tl^+ в $CDCl_3$ в области сигналов ${}^{13}C$ карбонильных групп вообще не удалось выделить отдельных сигналов. В спектре наблюдаются широкие перекрывающиеся сигналы в области 171,5–173,1 м. д. (табл. 3). Отсутствие данных о том, какие именно карбонилы участвуют в пон-дипольном взаимодействии с катионом, затрудняет вывод о стехиометрии образующихся комплексов в $CDCl_3$.

Пролинсодержащие гексадекааноги валиномицина, как и гексадекаизолейциномицины [4], образуют устойчивые комплексы с объемными органическими катионами – тетраметиламмонием $(NH_3)_4N^+$, гуанидинхлоридом Gu^+ и ацетилхолином $AcCh^+$. Эти комплексы, как и комплексы с катионами щелочных металлов, в растворе существуют в виде одной формы с осью симметрии C_4 (табл. 1, 2). Малые значения температурных градиентов сигналов NH-протонов ($1,7$ – $4,2 \cdot 10^{-3}$ м. д./град), близкие полученным для комплексов с щелочными металлами, и сохраняющийся аномальный сдвиг в слабое поле одного из протонов $C^\beta H_2$ -группы пролиновых остатков (4,1 м. д., табл. 1, 2) позволяют предположить в конформации молекулы депсипептида в комплексе существование четырех β -изгибов с пролиновым остатком в $i+2$ -м положении, стабилизированных ВМВС типа 4→1 (рис. 4, 7). Значения ${}^3J_{HN-C^\alpha H}$ уменьшаются при переходе от комплексов с щелочными металлами к комплексам с органическими катионами. Однако если для комплексов депсипептида (I) константы ${}^3J_{HN-C^\alpha H}$ изменяются незначительно (на 0,5–0,9 Гц), то для комплексов соединения (II) эти изменения более существенны: на 2,5–3,3 Гц для D -Val и на 1,0–1,2 Гц для L -Val.

Значения ${}^3J_{HN-C^\alpha H}$ остатков L -Val (4,2–4,8 Гц) комплексов депсипептида (I) и D -Val (4,8–4,9 Гц) комплексов депсипептида (II) позволяют предположить образование β -изгибов с ВМВС типа 4→1 также и во фраг-

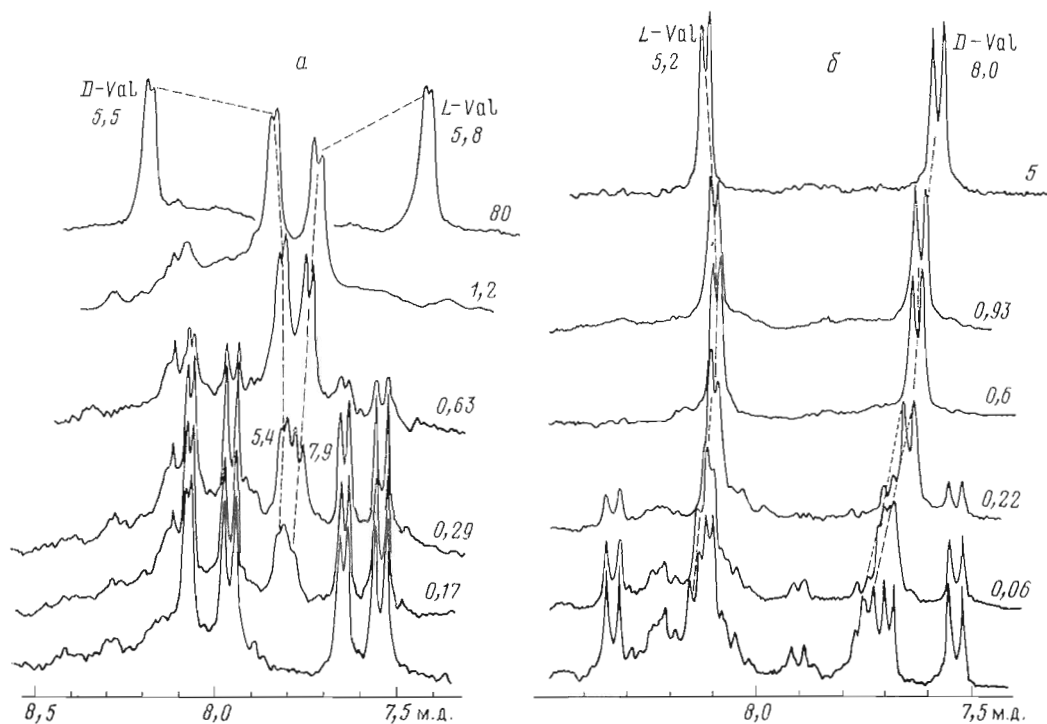


Рис. 8. Спектры ^1H -ЯМР депептида (I) (а) и (II) (б) (область сигналов NH-про-
тонов) в $\text{C}_2\text{D}_5\text{OH}$ в присутствии KSCN в разных концентрациях ($c_{\text{KSCN}}/c_{\text{депепт}}$ указано у
кривых). Концентрация (I) — 18, (II) — 16 мМ. Цифры у пиков — значения $^3J_{\text{HN-C}\alpha\text{H}}$
в герцах

ментах *L-Pro-L-Val-D-Hyi-D-Val* и *D-Pro-D-Val-L-Lac-L-Val* для комплексов депептидов (I) и (II) соответственно. Конформация молекулы депептидов (I) и (II) в комплексе с органическими катионами представляет собой восемь конденсированных β -изгибов, стабилизированных ВМВС типа $4 \rightarrow 1$, с углами ϕ валиновых остатков $\pm (60-70^\circ)$. Таким образом, если повышенное значение $^3J_{\text{HN-C}\alpha\text{H}}$ в комплексах депептида (II) с щелочными металлами действительно обусловлено стехиометрией образующегося комплекса депептид — катион, 2 : 1, то уменьшение $^3J_{\text{HN-C}\alpha\text{H}}$ для комплексов с органическими катионами свидетельствует об эквимольности компонентов. При этом депептид (I) в CDCl_3 образует эквимольный комплекс как с катионами щелочных металлов, так и с органическими катионами.

Комплексообразование гексадепептидов (I) и (II) исследовалось в $\text{C}_2\text{D}_5\text{OH}$ методом ^1H -ЯМР-спектроскопии. На рис. 8 приведены спектры депептидов (I) (а) и (II) (б) при различной концентрации KSCN. В спектре ^1H -ЯМР депептида (I) (рис. 8а) при добавлении 3 мМ KSCN появляются сигналы, отвечающие образующемуся комплексу с $^3J_{\text{HN-C}\alpha\text{H}}$ 7,9 (*L-Val*) и 5,4 Гц (*D-Val*). При увеличении концентрации KSCN происходит изменение как химических сдвигов сигналов NH, так и констант $^3J_{\text{HN-C}\alpha\text{H}}$. При ~ 80 -кратном избытке KSCN константа $^3J_{\text{HN-C}\alpha\text{H}}$ (*L-Val*) от 7,9 Гц уменьшилась до 5,8 Гц (δ 7,38 м.д.), а $^3J_{\text{HN-C}\alpha\text{H}}$ (*D-Val*) (5,5 Гц) практически не изменилась (δ 8,21 м.д.). Ход изменения значений химических сдвигов и интегральных интенсивностей сигналов NH, а также констант $^3J_{\text{HN-C}\alpha\text{H}}$ сигналов для образующегося комплекса при увеличении концентрации соли (рис. 8а) свидетельствует об изменении конформации молекулы депептида в комплексе, которое связано с изменением стехиометрии комплекса. При большом избытке макроцикла образуется комплекс с соотношением макроцикл — катион 2 : 1, который переходит в эквимольный при увеличении концентрации соли. То, что даже при избытке KSCN в спектре K^+ -комплекса соединения (I) наблюдаются сигналы

свободного депсипептида, говорит о малой константе устойчивости образующегося комплекса.

Ход изменения значений химических сдвигов сигналов NH депсипептида (II) при образовании им комплекса с K^+ , а также тот факт, что уже при соотношении $KSCN$ — макроцикл, равном 0,6 : 1, в спектре 1H -ЯМР (рис. 8б) не наблюдается сигналов свободных форм депсипептида (II) и при дальнейшем увеличении концентрации $KSCN$ в растворе не происходит изменения характеристических параметров спектра, доказывают, что депсипептид (II) в C_2D_5OH образует с $KSCN$ комплекс с соотношением макроцикл — катион 2 : 1. Аналогичный процесс комплексообразования соединения (II) наблюдается и в CD_3OH .

Спектры 1H - и ^{13}C -ЯМР калиевых комплексов депсипептидов (I) и (II) в C_2D_5OH (табл. 1—3) указывают на то, что эти комплексы аналогично комплексам депсипептидов (I) и (II) с щелочными металлами в $CDCl_3$ представляют собой одну форму с осью симметрии C_4 и с *транс*-конфигурацией третичных амидных связей.

Сохранение в спектре 1H -ЯМР аномально сдвинутого в слабое поле ($\sim 4,2$ м.д.) сигнала $C^{\alpha}H$ пролиновых остатков позволяет говорить о том, что в калиевых комплексах депсипептидов (I) и (II) в C_2D_5OH во фрагментах *D*-Hyl-*D*-Val-*L*-Pro-*L*-Val (I) и *L*-Lac-*L*-Val-*D*-Pro-*D*-Val (II) реализуются β -изгибы с остатком *L*-Pro (или *D*-Pro) (для депсипептидов (I) и (II) соответственно) в положении *i*+2, стабилизированные ВМВС типа 4→1. Низкие температурные коэффициенты, наблюдаемые для сигналов NH ($1,7 \cdot 10^{-3}$ и $2,7 \cdot 10^{-3}$ м.д./град для *L*-Val K^+ -комплекса депсипептида (I) и *D*-Val K^+ -комплекса депсипептида (II) соответственно) согласуются с выводом об образовании такого типа ВМВС. Невысокие значения температурных коэффициентов сигналов NH-протонов остатков *D*-Val ($4,5 \cdot 10^{-3}$ м.д./град, депсипептид (I)) и остатков *L*-Val ($3,5 \cdot 10^{-3}$ м.д./град, депсипептид (II)) указывают на тенденцию и этих протонов к участию в ВМВС.

Величины $^3J_{HC^{\alpha}-C^{\beta}H}$ (табл. 1, 2) свидетельствуют о предпочтительности *транс*-ориентации боковых цепей остатков *D*-Val (соединение (I)) и *L*-Val (соединение (II)), тогда как в ориентацию фрагмента $C^{\alpha}H-C^{\beta}H$ остатков *L*-Val (I) и *D*-Val (II) достаточно большой вклад вносит *гош*-ротамер ($^3J_{HC^{\alpha}-C^{\beta}H} \sim 8$ Гц).

Таким образом, конформация основной цепи K^+ -комплексов депсипептидов (I) и (II) в C_2D_5OH и комплексов этих соединений с щелочными металлами в $CDCl_3$ аналогичны. Небольшая разница в величине $^3J_{HN-C^{\alpha}H}$ для K^+ -комплекса депсипептида (I) в C_2D_5OH (5,8 и 5,5 Гц для *L*- и *D*-Val) и в $CDCl_3$ (4,9 и 4,2 Гц для *L*- и *D*-Val, табл. 1) объясняется тем, что в C_2D_5OH даже при больших избытках $KSCN$ наряду с эквимольным имеется «сандвичевый» комплекс, находящийся в быстром обмене с эквимольным и вносящий свой вклад в величины $^3J_{HN-C}$ и, тогда как в $CDCl_3$ реализуется только эквимольный комплекс.

Для комплекса депсипептида (II) с хлоридратом гуанидина в C_2D_5OH $^3J_{HN-C^{\alpha}H}$ равны 7,6 (*D*-Val) и 5,6 Гц (*L*-Val), однако при переходе от C_2D_5OH к $CDCl_3$ они уменьшаются до 4,8 и 3,6 Гц (табл. 2). Это изменение величин $^3J_{HN-C^{\alpha}H}$ при переходе от полярного (C_2D_5OH) к слабополярному ($CDCl_3$) растворителю связано, очевидно, с изменением стехиометрии образующегося комплекса (от соотношения макроцикл — катион 2 : 1 к эквимольному), как это наблюдалось для комплексов депсипептида (II) в $CDCl_3$ при переходе от ионов щелочных металлов к органическим катионам.

Таким образом, циклодепсипептид (I) как с катионами щелочных металлов, так и с органическими объемными катионами образует в $CDCl_3$ эквимольные комплексы. В C_2D_5OH с катионами щелочных металлов наблюдается образование «сандвичевого» комплекса при большом избытке макроцикла по отношению к соли и переход этого комплекса в эквимольный при увеличении концентрации соли.

Циклодепсипептид (II) с ионами щелочных металлов образует комплексы типа 2 : 1 как в C_2D_5OH , так и в $CDCl_3$. Вероятно, в образовании

Экстракция пикратов щелочных металлов и органических катионов из воды в хлористый метилен в присутствии соединений (I) и (II)

Катион	Концентрация катиона · 10 ⁴ , М	Степень экстракции *, %		Катион	Концентрация катиона · 10 ⁴ , М	Степень экстракции *, %	
		(I)	(II)			(I)	(II)
K ⁺	2	19	19	(CH ₃) ₄ N ⁺	2	57	43
	4	24	23		4	60	48
	8	31	29		8	65	53
	40	48	40		40	77	66
Rb ⁺	2	27	20	Gu ⁺	2	61	68
	4	33	26		4	66	72
	8	41	31		8	71	80
	40	55	45		40	82	83
Cs ⁺	2	31	24	AcCh ⁺	2	67	51
	4	38	29		4	71	56
	8	45	35		8	75	61
	40	60	48		40	88	80.
NH ₄ ⁺	2	45	—				
	4	50	—				
	8	56	—				
	40	70	—				

$$* \text{ Степень экстракции} = \frac{i C_{\text{компл. в CH}_2\text{Cl}_2}}{C_{\text{макроцикла}}} \cdot 100.$$

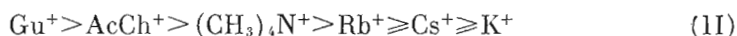
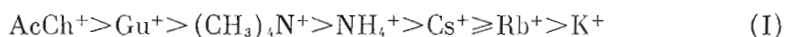
комплексов участвуют сольватированные катионы. При переходе к объемным органическим катионам, таким, как (CH₃)₄N⁺, гуанидиний, ацетилхолин, в CDCl₃ депептид (II) образует эквимольные комплексы. В схематическом виде характер конформационных перестроек соединений (I) и (II) при комплексообразовании представлен на рис. 7 и 4 соответственно.

Кривые КД соединений (I) и (II) в 96% C₂H₅OH существенно изменяются при добавлении солей щелочных металлов (рис. 2а, б). Поэтому мы предприняли попытку получить дополнительные данные о стехиометрии и устойчивости соответствующих комплексов, контролируя титрование депептидов (I) и (II) солями Na, K, Rb и Cs методом КД. Однако выяснилось, что все кривые титрования (за исключением кривой титрования депептида (II) CsCl) имеют немонотонный характер; первоначальный ход кривой обращает знак при соотношении соль — макроцикл, варьирующемся от 0,05 до 0,6, т. е. не отвечающем какой-либо определенной стехиометрии. Аналогичное явление описано в предыдущем сообщении [1] для L-пролинсодержащего додекапроизводного. По-видимому, изменения спектров КД отражают одновременно протекание двух процессов: образование комплекса и его конформационную перестройку, вызванную изменением сольватирующей способности растворителя, при добавлении соли. Изменчивость пространственной структуры депептидов (I) и (II) при смене растворителя отмечалась выше при обсуждении спектров ¹H-ЯМР. Ввиду отсутствия методов оценки вкладов каждого из указанных процессов метод КД не удалось использовать для определения устойчивости комплексов.

Аналогичные трудности встретились при интерпретации данных кондуктометрического исследования соединений (I) и (II). Добавление макроциклов к растворам хлоридов щелочных металлов снижало электропроводность растворов, что свидетельствует об образовании достаточно устойчивых комплексов. Однако полученные данные не позволяют сделать однозначного вывода о стехиометрии образующихся комплексов.

Результаты экстракционных опытов, характеризующих способность депептидов (I) и (II) переносить ионы щелочных металлов и органические катионы в органическую фазу (хлористый метилен), приведены в табл. 8. Депептиды (I) и (II) являются эффективными ионо-

форами и по своей сольбилизирующей способности весьма сходны с гексадекаизолейциномицином [4]. Как и в случае гексадекаизолейциномицина, увеличение размера цикла в случае пролинсодержащих гексадекааналогов валиномицина вызывает смещение ионной селективности в сторону объемных органических катионов. Степень экстракции этих катионов достигает 70–90% (табл. 8). Были получены ряды ионной селективности для депсипептидов (I) и (II):



Степень экстракции пикратов щелочных металлов существенно ниже, чем органических катионов. При этом если для соединения (I) сохраняется ряд ионной селективности, присущий гексадекаизолейциномицину [4], и степень экстракции катионов достигает 50% (K^+), 55 (Rb^+), 60 (Cs^+) и 70% (NH_4^+) (табл. 8), то соединение (II) практически не проявляет селективности и степень экстракции катионов щелочных металлов этим депсипептидом не превышает 50%. Наблюдаемое различие экстракции ионов соединениями (I) и (II) хорошо согласуется с выводами о стехиометрии комплексов, полученными в результате ЯМР-исследования.

Экспериментальная часть

Синтез соединений (I) и (II) описан в работе [5]. Условия измерения спектров ИК, КД и методика проведения экстракции даны в работе [4].

Спектры ^1H -ЯМР получены на спектрометре фирмы Varian SC-300 (США) и WM-500 (Bruker, ФРГ), спектры ^{13}C -ЯМР — на спектрометрах CFT-20 (20 МГц) и XL-100/15 (25, 16 МГц) (Varian, США).

Химические сдвиги сигналов измерены относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана. Температура образца в датчике поддерживалась с точностью $\pm 1^\circ\text{C}$. Используемые растворители получены от фирмы «Изотоп» (СССР) и Stohler Isotope Chemicals (США).

Растворы комплексов депсипептидов получены в $\text{C}_2\text{D}_5\text{OH}$ при добавлении ~ 10 – 20 -кратного избытка солей (в мольном соотношении), с лиофилизацией полученного комплекса и последующим экстрагированием его CDCl_3 , а также при непосредственном добавлении сухих солей в ампулу с раствором депсипептидов в CDCl_3 .

Уширение сигналов NH (Гц/моль) при добавлении раствора иминоксильного радикала (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил) рассчитывалось на линейном участке уширения при изменении концентрации стабильного радикала от 0 до ~ 5 мМ.

Отнесение сигналов в спектрах ^1H -ЯМР к типу остатков осуществлено методом гомоядерного мультирезонанса, отнесение сигналов к определенному остатку — с помощью регистрации ядерного эффекта Оверхаузера, как в работах [13, 14]. Эксперимент по измерению ЯЭО проводили с использованием импульсной последовательности

$$(-t_1(\omega_A) - 90^\circ - t_2 - t_3 - t_1(\omega_{\text{off-res}}) - 90^\circ - t_2 - t_3)_n.$$

Селективное радиочастотное поле ω_A накладывалось на сигнал А во время t_1 , после которого сразу же следовал импульс наблюдения и регистрировался спектр (t_2 — время регистрации спектра). После времени $t_1(\omega_{\text{off-res}})$ регистрировали спектр без ЯЭО ($\omega_{\text{off-res}}$ — селективное радиочастотное поле сдвинуто от сигнала А на величину ~ 2 – 4 м.д.). t_3 — временная пауза для достижения равновесного состояния ядерной намагниченности. Накопление обоих спектров проводили попеременно для минимизации инструментальных дрейфов. Разностный спектр получали вычитанием спада свободной индукции с ЯЭО из спада свободной индукции без ЯЭО.

Отнесение сигналов с помощью ЯЭО

Концентрация исследуемого образца депсипептида (I) ~5 мМ, соотношение CCl_4 — CDCl_3 9 : 1, температура 30° С, отрицательный ЯЭО.

В ^1H -ЯМР-спектре депсипептида (I) наблюдаются четыре сигнала NH при 6,61; 7,26; 7,48 и 7,91 м.д. и сигналы соответствующих им C^αH валиновых остатков при 4,01; 4,77; 4,01 и 3,82 м.д. Два дублета при 4,44 и 5,68 м.д. — сигналы C^βH *D*-Hui-остатков, а сигналы при 4,07 и 4,55 м.д. отвечают сигналам C^αH *L*-Pro-остатков. При 3,52 и 4,14 м.д. и 3,15 и 3,29 м.д. находятся сигналы протонов $\text{C}^\delta\text{H}_2$ -группы *L*-Pro-остатков.

При облучении сигнала $\text{C}^\delta\text{H}_2$ -группы остатков *L*-Pro (3,52 м.д., C^δH) возникает ЯЭО (13,5%) на сигнале при 4,14 м.д. (C^αH *L*-Pro) (табл. 6). Следовательно, сигналы при 3,52 и 4,14 м.д. относятся к одной $\text{C}^\delta\text{H}_2$ -группе остатка *L*-Pro. Кроме того, ЯЭО (4%) наблюдается на C^αH (3,82 м.д.) одного из валиновых остатков, что позволяет отнести сигнал при 3,82 м.д. к сигналу от C^αH соседнего (предыдущего (*i*-1-го)) *D*-Val-остатка и указывает на *транс*-конфигурацию третичной амидной связи между *D*-Val^{1,9} и *L*-Pro^{2,10} *. ЯЭО (5%) на сигнале при 1,95 м.д. позволяет отнести этот сигнал к C^βH_2 остатков *L*-Pro^{2,10}.

Насыщая сигнал C^δH (*L*-Pro^{2,10}) при 4,14 м.д., регистрируем ЯЭО на сигнале C^βH (3,52 м.д.) и на C^βH_2 (1,95 м.д.) *L*-Pro^{2,10}. ЯЭО на C^αH при 3,82 м.д. подтверждает отнесение его к группе C^αH остатка *D*-Val^{1,9}. Кроме этого, наблюдается ЯЭО на сигнале NH при 7,26 м.д. Следовательно, сигнал при 7,26 м.д. является сигналом NH остатка *L*-Val^{3,11}, участвующего в ВМВС типа 4→1, стабилизирующей β-изгиб фрагмента *D*-Hui^{16,8}-*D*-Val^{1,9}-*L*-Pro^{2,10}-*L*-Val^{3,11} с *транс*-конфигурацией третичной амидной связи *D*-Val^{1,9}-*L*-Pro^{2,10}.

При облучении C^βH (*L*-Pro) при 3,15 м.д. появляется ЯЭО на C^βH при 3,29 м.д. и при 1,9 и 2,0 м.д. — сигналы C^βH_2 -группы остатков *L*-Pro^{6,14}. При насыщении сигнала C^βH (*L*-Pro) при 3,29 м.д. наблюдается ЯЭО на сигнале при 3,15 м.д. (группа C^βH_2 остатков *L*-Pro^{6,14}), на сигналах при 1,9 и 2,0 м.д. (C^βH_2 -группа остатков *L*-Pro^{6,14}) и на сигнале при 2,25 м.д. (C^βH остатков *D*-Val^{1,9}). Так как на сигнале C^αH (*D*-Val^{5,13}) ЯЭО нет, можно заключить, что связь *D*-Val^{5,13} — *L*-Pro^{6,14} имеет *цис*-конфигурацию.

Насыщение сигналов NH-протонов. Сигнал NH при 7,91 м.д. относится к *D*-Val^{1,9}. При насыщении этого сигнала наблюдается ЯЭО на собственном C^αH при 3,82 м.д. (*D*-Val^{1,9}) и на C^αH остатка *D*-Hui при 5,68 м.д., что позволяет отнести этот сигнал к C^αH (*D*-Hui^{8,16}). ЯЭО на сигнале при 2,28 м.д. подтверждает отнесение этого сигнала к C^βH остатков *D*-Val^{1,9}.

Сигнал NH при 7,26 м.д. отнесен к *L*-Val^{3,11}. При насыщении этого сигнала регистрируется ЯЭО на собственном C^αH (*L*-Val^{3,11}) при 4,77 м.д., на сигналах при 2,32 м.д. (C^βH *L*-Val^{3,11}) и 1,95 м.д. (C^βH_2 и C^βH_2 *L*-Pro^{2,10}). ЯЭО (~0,7%) наблюдается также на $\text{C}^\delta\text{H}_2$ остатков *L*-Pro^{2,10} при 4,14 м.д., что подтверждает отнесение сигнала NH при 7,26 м.д. к остатку *L*-Val^{3,11}. ЯЭО (~0,5%) появляется на сигнале протона C^αH (*L*-Pro) при 4,55 м.д. (*L*-Pro^{2,10}) и C^βH (*D*-Hui) при 5,68 м.д. (*D*-Hui^{8,16}).

При насыщении сигнала NH при 7,48 м.д. в спектре наблюдается ЯЭО на сигнале C^αH этого же остатка при 4,01 м.д. и на сигнале C^αH (~5,5%) *L*-Pro при 4,07 м.д. ЯЭО на сигнале C^αH остатка *L*-Pro позволяет отнести этот сигнал к C^αH *L*-Pro^{6,14}, а сигнал NH при 7,48 м.д. — к NH остатка *L*-Val^{7,15}.

Насыщая сигнал NH при 6,61 м.д., имеем ЯЭО на C^αH при 4,01 м.д. и на сигнале при 2,13 м.д. Сигналы при 6,61; 4,01; 2,13 м.д. относятся к NH, C^αH и C^βH (*D*-Val^{5,13}).

Отнесение сигналов в форме A депсипептида (I). Концентрация исследуемого образца депсипептида (I) ~5 мМ, растворитель — CDCl_3 , температура — 30° С, отрицательный ЯЭО.

Насыщая сигнал NH при ~7,5 м.д., регистрируем ЯЭО на сигнале при 4,35 м.д. (C^αH этого же остатка) и при 5,23 м.д. (C^αH остатка *D*-Hui). Следовательно, сигнал при 7,5 м.д. относится к NH остатка *D*-Val. При

* См. примечание на с. 445.

насыщении сигнала NH при $\sim 7,8$ м.д. наблюдается ЯЭО при $\sim 4,4$ и $4,7$ м.д. Эти сигналы относятся к группам $C^\alpha H$ остатков *L*-Val и *L*-Pro. Сигнал при $\sim 7,8$ м.д. является сигналом NH-протона остатка *L*-Val.

K^+ -комплекс депсипептида (I). Концентрация исследуемого образца 60 мМ, растворитель — $CDCl_3$, температура $42^\circ C$, положительный ЯЭО (300 МГц). При насыщении $C^\alpha H$ (*L*-Pro) при $3,65$ м.д. появляется ЯЭО ($3,5\%$, табл. 7) на сигнале $C^\alpha H$ валинового остатка при $3,93$ м.д. (этот $C^\alpha H$ относится к *D*-Val-остатку), а также при $4,07$ м.д. ($C^\alpha H$ *L*-Pro) и $4,75$ м.д. ($C^\alpha H$ *L*-Pro).

Отнесение сигналов к определенным остаткам в депсипептиде (II) и его K^+ -комплексе. Концентрация депсипептида (II) 2 мМ, соотношение растворителей CCl_4-CDCl_3 5 : 1, температура $-30^\circ C$, отрицательный ЯЭО.

При насыщении сигнала при $3,55$ м.д. ($C^\alpha H$ *D*-Pro) наблюдается ЯЭО (30% , табл. 5) на сигнале при $4,28$ м.д. ($C^\alpha H$ *D*-Pro) и на сигнале $C^\alpha H$ валинового остатка (8%) при $3,99$ м.д. Следовательно, сигнал $C^\alpha H$ валинового остатка при $3,99$ м.д. относится к остаткам *L*-Val^{3,7,11,15}.

При насыщении сигнала NH остатков *L*-Val при $8,12$ м.д. (сигнал $C^\alpha H$ остатка *L*-Val находится при $3,99$ м.д.) возникает ЯЭО (8%) на $C^\alpha H$ (*L*-Lac) при $5,30$ м.д., что подтверждает отнесение сигнала NH при $8,12$ м.д. к остаткам *L*-Val^{3,7,11,15}.

При насыщении сигнала NH при $7,27$ м.д. наблюдается ЯЭО ($2,5\%$) на сигнале $C^\alpha H$ (*D*-Pro) при $4,57$ м.д., т. е. сигнал при $7,27$ м.д. относится к остаткам *D*-Val^{1,5,9,13}.

Концентрация K^+ -комплекса депсипептида (II) 2 мМ, растворитель — $CDCl_3$, температура $-40^\circ C$, отрицательный ЯЭО.

При насыщении сигнала $C^\alpha H$ *D*-Pro при $3,60$ м.д. появляется ЯЭО (22% , табл. 7) на сигнале при $4,22$ ($C^\alpha H$ *D*-Pro) и $3,89$ м.д. (7%). Таким образом, сигнал $C^\alpha H$ при $3,89$ м.д. можно отнести к *L*-Val-остаткам.

При насыщении сигнала NH остатков *L*-Val при $8,23$ м.д. (сигнал $C^\alpha H$ *L*-Val находится при $3,89$ м.д.) наблюдается ЯЭО (5%) на сигнале $C^\alpha H$ остатков *L*-Lac при $5,37$ м.д., что подтверждает отнесение сигнала при $8,23$ м.д. к NH *L*-Val-остаткам.

При насыщении сигнала NH при $7,48$ м.д. возникает ЯЭО ($\sim 1,5\%$) на сигнале при $4,48$ м.д. — сигнал $C^\alpha H$ *D*-Pro. Это позволяет отнести сигналы при $7,48$ и соответственно при $3,91$ м.д. к протонам NH и $C^\alpha H$ остатков *D*-Val.

Отнесение $^{13}C^\beta$ -сигналов в спектрах ^{13}C -ЯМР к определенному типу остатков осуществлено при помощи внезонного облучения.

Отнесение сигналов ^{13}CO к вторичным, третичным амидным или сложнотренильным группам проведено при помощи изотопного сдвига регистрируемых сигналов при 50% -ном обмене NH \rightarrow ND. Отнесение сигналов ^{13}CO к определенному типу остатка выполнено с помощью селективного мультирезонанса $^{13}C\{^1H\}$, как в работах [1, 13, 19].

ЛИТЕРАТУРА

1. Балашова Т. А., Фомина Л. А., Гуревич А. З., Старовойтова Н. В., Семянина Л. Б., Авотинь Г. Я., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. Биорган. химия, 1983, т. 9, № 7, с. 883—899.
2. Иванов В. Т., Фомина Л. А., Семянина Л. Б., Виноградова Е. И., Овчинников Ю. А., Червин И. И., Яковлев Р. И. Биорган. химия, 1975, т. 1, № 1, с. 5—16.
3. Eisenman G., Krasne S. I. In: MTP International Review of Science/Ed. Fox C. F. London: Butterworths, 1973, v. 2, p. 27—59.
4. Фомина Л. А., Авотинь Г. Я., Балашова Т. А., Старовойтова Н. В., Семянина Л. Б., Савелов И. С., Быстров В. Ф., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1285—1302.
5. Авотинь Г. Я., Фомина Л. А., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. Биорган. химия, 1978, т. 4, № 5, с. 581—589.
6. Иванов В. Т., Лайне И. А., Абдулаев Н. Д., Плетнев В. З., Липкинд Г. М., Архипов С. Ф., Семянина Л. Б., Мещерякова Е. И., Попов Е. М., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. Химия природн. соед., 1971, № 3, с. 221—246.
7. Dorman D. E., Vovey F. A. J. Org. Chem., 1973, v. 38, № 13, p. 2379—2383.
8. Voelter W., Oster O. Org. Mag. Res., 1973, v. 5, p. 547—548.
9. Siemon L. Z., Wieland Th., Pock K.-H. Angew. Chem., 1975, v. 87, № 19, p. 712—713.
10. Kopple K. D., Go A. J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, № 23, p. 7698—7704.

11. Smith J. A., Pease L. G. CRC Critical Reviews in Biochemistry, 1980, v. 8, p. 315-400.
12. Pogliani L., Ellenberger M., Valat J., Bellocq A. M. Int. J. Pert. and Protein Res., 1975, v. 7, p. 345-360.
13. Балашова Т. А., Фони́на Л. А., Гуревич А. З., Старовойтова Н. В., Сенявина Л. Б., Авотинь Г. Я., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. Биоргани́. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1462-1473.
14. Billeter M., Beaun W., Wüthrich K. J. Mol. Biol., 1982, v. 155, № 3, p. 321-346.
15. Leach S. J., Nemethy G., Scheraga H. A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 75, № 1, p. 207-215.
16. Kuo M., Gibbons W. A. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 14, p. 6278-6287.
17. Khaled M. A., Urry D. W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1976, v. 70, № 2, p. 485-491.
18. Chandrasekaran R., Lakshminarayanan A. V., Pandya U. V., Ramachandran G. N. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 303, № 1, p. 14-27.
19. Bystrov V. F., Gavrilow Yu. D., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Eur. J. Biochem., 1977, v. 78, № 1, p. 63-82.

Поступила в редакцию
27.IX.1983

**STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP FOR CYCLIC DEPSIPEPTIDES
OF VALINOMYCIN SERIES. XI. [L-Pro², L-Pro⁶, L-Pro¹⁰, L-Pro¹⁴]-
AND [D-Pro⁴, D-Pro⁸, D-Pro¹², D-Pro¹⁶]HEXADECAVALINOMYCINS**

[BALASHOVA T. A., FONINA L. A., SENYAVINA L. B., STAROVOITOVA N. V.,
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 valinomycin analogues *cyclo*[-(D-Val-L-Pro-L-Val-D-Hyi)₄-] (I) and *cyclo*[-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Pro)₄-] (II) were studied by spectral and extraction methods. A composite conformational equilibrium for the uncomplexed forms, both with trans and *cis* configuration of Val-Pro bond, is observed for these hexadecadepsipeptides. The replacement of all D-Hyi by D-Pro residues in hexadecavalinomycin leads to preference of *cis* configuration for the tertiary peptide bond in polar solvents. Similar replacement of L-Lac by L-Pro makes preferable *cis* configuration of the tertiary peptide bond in any polar media, and gives rise to conformers found neither in valinomycin nor in its hexadeca analogue. The solution conformations for the predominant forms of these depsipeptides are proposed. Both proline-containing hexadeca analogues of valinomycin are fairly effective complexones forming the complexes of 2:1 stoichiometry with alkali ions. The symmetric 1:1 complexes are formed by title compounds with such organic cations as guanidinium, acetylcholine, or tetramethylammonium. A high ionic selectivity for alkali cations was revealed using their extraction from the aqueous into organic phase with the aid of either of two depsipeptide analogues.