



УДК 547.96:541.69

ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ СТРОЕНИЕМ И СВОЙСТВАМИ
ЦИКЛОДЕПСИПЕПТИДОВ ВАЛИНОМИЦИНОВОГО РЯДА
VII*. АНАЛОГИ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ СЛОЖНОЭФИРНЫМИ ГРУППАМИ

Иванов В. Т., Фомина Л. А., Сенявина Л. В.,
Овчинников Ю. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шенякина Академии наук СССР, Москва

Червин И. И., Яковлев Г. И.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Академии наук СССР, Пушкино

Спектральными и теоретическими методами изучены конформационные состояния 8 аналогов валиномицина, в которых сложноэфирные группы заменены на амидные и N-метиламидные. Соединения, в которых 1 или 3 оксикислоты заменены на аминокислоты и N-метиламинокислоты в неполярных средах, сохраняют браслетную конформацию. Введение 2 амидных (N-метиламидных) групп приводит к дестабилизации браслетной конформации у свободных депсипептидов. Комплексы аналогов построены по типу комплексов валиномицина, в них сохраняется браслетная система H-связей, лигандами служат как сложноэфирные, так и амидные или N-метиламидные группы. Показано также, что введение N-метиламидных групп существенно ограничивает конформационную подвижность макроциклов; у свободных соединений и комплексов реализуется *транс*-ориентация третичных амидных групп.

В настоящей работе продолжено исследование аналогов валиномицина с модифицированными группами основной депсипептидной цепи. Рассмотрены ранее синтезированные аналоги [2, 3], в которых оксикислотные остатки частично (1–3 остатка из 6 присутствующих) заменены на остатки аминокислот и N-метиламинокислот той же природы и конфигурации (табл. 1). Известно, что амидная группа хорошо моделирует сложноэфирную группу по геометрическим параметрам и не уступает ей по эффективности взаимодействия металл–карбонил [4]. Поэтому с достаточным основанием можно было ожидать, что такие аналоги будут весьма близки валиномицину как топологически, так и в отношении устойчивости комплексов с ионами щелочных металлов и способности переносить эти ионы через мембраны.

Обоснованность указанных предпосылок подтвердилась в последние годы, когда в ряде лабораторий были синтезированы чисто пептидные аналоги валиномицина (аналоги, в которых все 6 оксикислотных остатков заменены на аминокислотные) [5–8], обнаружившие интересные металл-связывающие [5, 7–10], конформационные [7–11, 13] и мембранные [7, 12, 13] свойства.

Соединения (II)–(VIII) и их комплексы исследовали методами КД-, ИК- и ЯМР-спектроскопии. Спектры КД измеряли в широком диапазоне

* Сообщение VI см. [1]. Принятые сокращения: Lac – молочная кислота, Hui – α -оксизавалериановая кислота, MeAla – N-Me-аланин, MeVal – N-Me-валин.

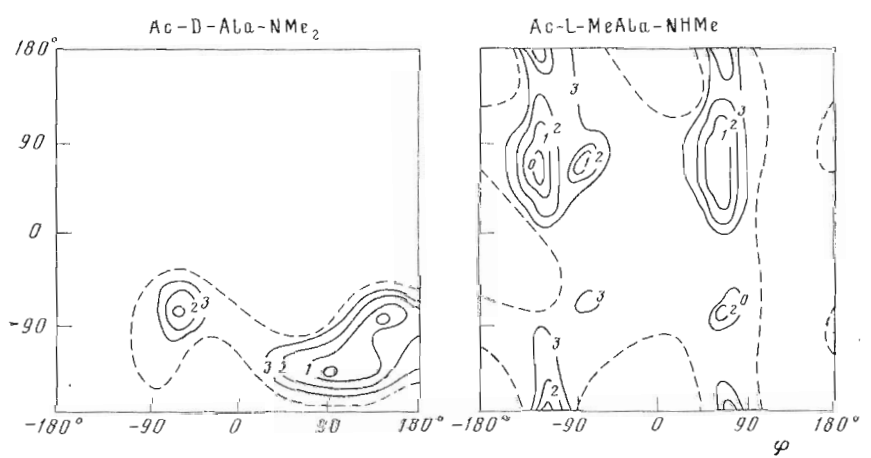
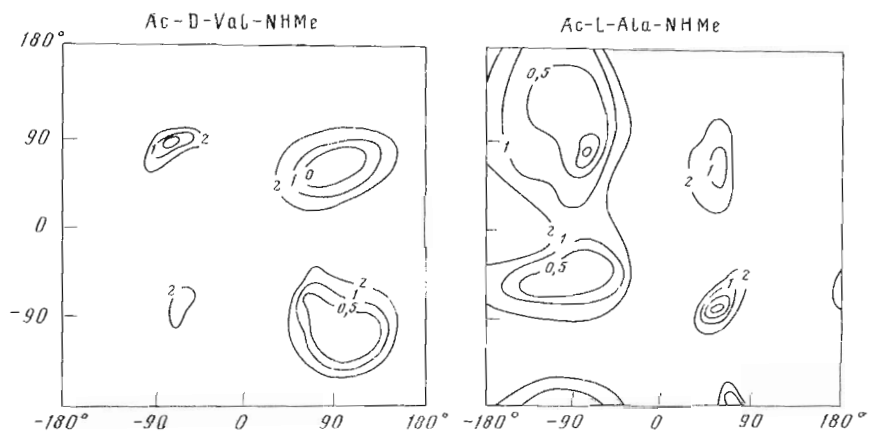
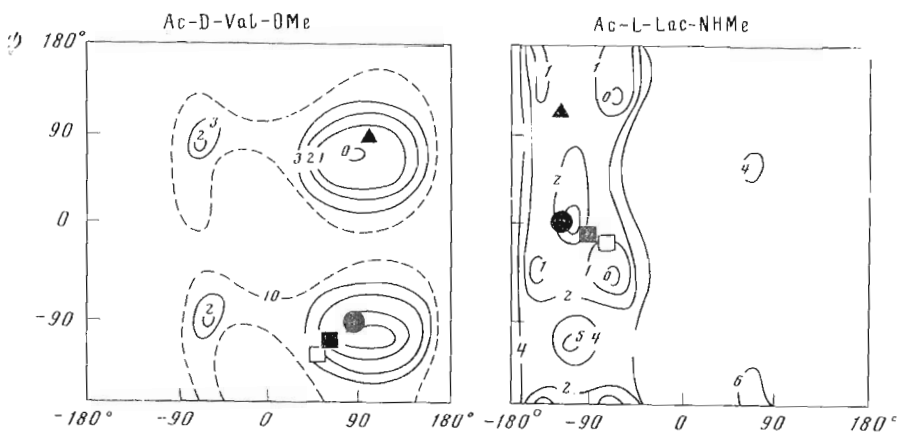
Константы устойчивости комплексов аналогов валиномицина
с катионами щелочных металлов (этанол, 25° С)

№	Соединение	K, л/моль	
		Na+	K+
(I)	<i>cyclo</i> [(D-Val-Lac-Val-D-Hyi) ₃]-A ₃ валиномицин	17	2,2·10 ⁶
(II)	<i>cyclo</i> [(D-Val-Ala-Val-D-Hyi)-A ₂]	100	3,0·10 ⁵
(III)	<i>cyclo</i> [(D-Val-Ala-Val-D-Hyi) ₂ -A]	600	2,2·10 ⁵
(IV)	<i>cyclo</i> [(D-Val-MeAla-Val-D-Hyi)-A ₂]	—	5,5·10 ⁵
(V)	<i>cyclo</i> [(D-Val-MeAla-Val-D-Hyi) ₂ -A]	—	1,5·10 ²
(VI)	<i>cyclo</i> [(D-Val-MeAla-Val-D-Hyi) ₃]	150	>10 ⁷
(VII)	<i>cyclo</i> [(D-Val-Lac-Val-D-MeVal)-A ₂]	—	5,0·10 ⁵
(VIII)	<i>cyclo</i> [(D-Val-Lac-Val-D-MeVal) ₂ -A]	—	3,1·10 ³
(IX)	<i>cyclo</i> [(D-Val-Lac-Val-D-MeVal) ₃]*	—	1,4·10 ⁴

* Константу устойчивости измеряли в смеси C₂H₅OH—C₂H₅OH (объемные соотношения 1 : 2).

полярности растворителя (от гептана до водно-спиртовых смесей). ИК-спектры измеряли главным образом в хлороформе; соединение (VI), кроме того, изучали в гептане и четыреххлористом углероде для более подробного сравнения с валиномицином. Спектры ЯМР измеряли также преимущественно в хлороформе; в отдельных случаях использовали и более полярные растворители (хлороформ — диметилформамид, хлороформ — метанол). Соединение (IX) практически нерастворимо в большинстве нейтральных органических растворителей и в воде. Концентраций, достаточных для физико-химических измерений, удалось достичь только в трифторэтаноле и трифторэтанолсодержащих смесях. Константа устойчивости K⁺-комплекса этого соединения по ранее описанному методу [14] была измерена также в смеси этанол — трифторэтанол (2 : 1).

При анализе спектральных данных мы основывались на результатах последних ЯМР-исследований валиномицина [15], в ходе которых подтвердились выводы предыдущих работ о структуре комплексов валиномицина в растворе, но была отчасти пересмотрена сложившаяся точка зрения о структуре свободного валиномицина и его аналогов [1, 16—22] в неполярных средах и средах средней полярности (так называемых форм А и В). Кроме того, для интерпретации полученных результатов привлекались конформационные карты производных аминокислот, моделирующих соответствующие фрагменты валиномицина и его аналогов (рис. 1). Например, конформационная энергия фрагментов валиномицина моделируется картами Ac-D-Val-OMe, Ac-Lac-NHMe, Ac-Val-OMe и Ac-D-Hyi-NHMe. При заменах Lac→Ala (соединения II и III) вновь появившимся фрагментам отвечают карты Ac-Ala-NHMe, а ему предшествующим — Ac-D-Val-NHMe. При заменах Lac→MeAla (соединения IV—VI) таковыми будут карты Ac-MeAla-NHMe и Ac-D-Val-NMe₂, а при заменах D-Hyi→D-MeVal (соединения VII—IX) — карты Ac-D-MeVal-NHMe и Ac-Val-NMe₂. Три последние карты в литературе не описаны. Вместо них использовали карты производных аланина. Из экспериментальных данных [23, 24] следует, что в конформационном отношении производные аланина и валина вполне подобны, за исключением несколько большей стабильности конформации L (форма, отвечающая минимуму энергии в верхнем правом квадрате карты) у L-изомеров и конформации R (форма, отвечающая минимуму энергии в нижнем левом квадрате карты) у D-изомеров.



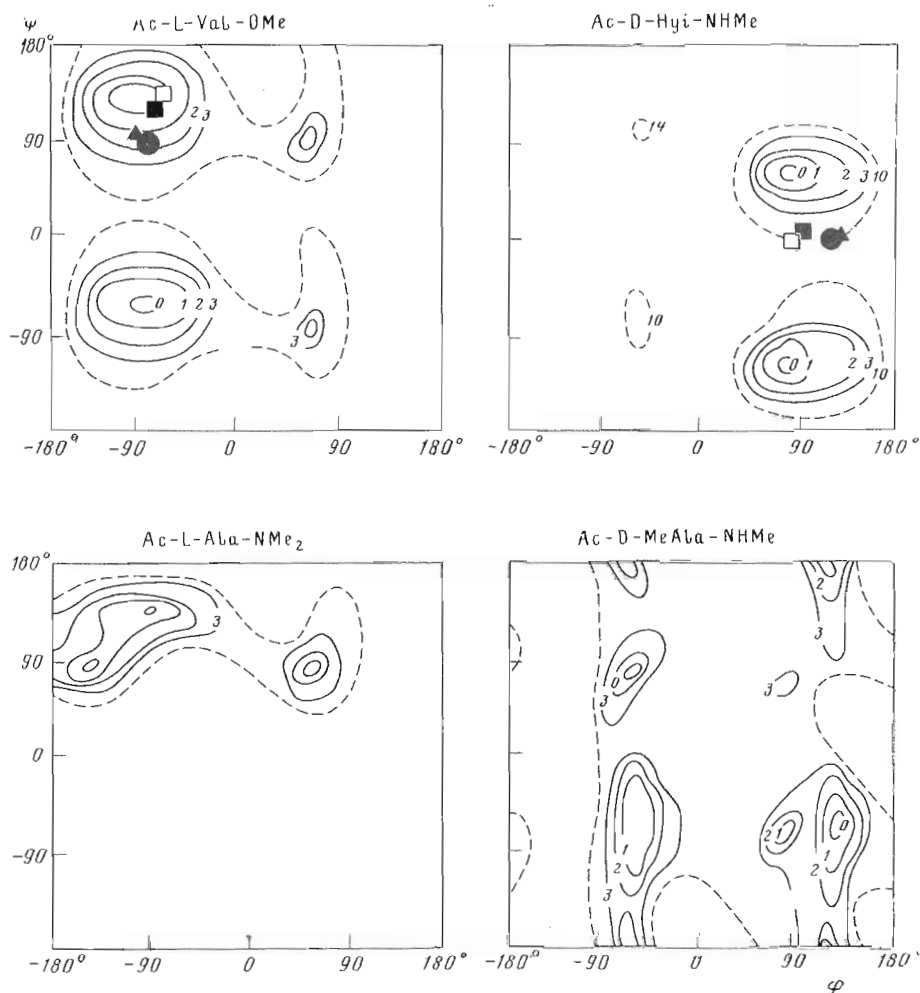


Рис. 1. Конформационные карты соединений, моделирующих фрагменты валиномицина, а также модифицированные участки соединений (II), (III), (IV–VI) и (VII–IX). Черными кружками показаны координаты формы А, треугольниками – формы В, квадратами – K^+ -комплекса в растворах. Светлыми квадратами обозначены координаты K^+ -комплекса в кристалле

Рассмотрим вначале соединения (II) и (III). Анализ конформационных карт фрагментов, отвечающих модифицированным участкам этих аналогов и соответствующим участкам валиномицина, показал, что положение основных энергетических минимумов на конформационных картах совпадает, т. е. с точки зрения энергии невалентных взаимодействий замена остатков молочной кислоты на остатки аланина не должна приводить к значительному изменению конформационных свойств молекулы. Действительно, кривые КД свободного аналога (II) в различных растворителях сходны с соответствующими кривыми валиномицина (рис. 2), что указывает на однотипность конформационного равновесия обоих соединений. ИК-спектр соединения (II) в $CHCl_3$ близко воспроизводит спектр валиномицина (рис. 3), так же как и измеренные из спектров ПМР (табл. 2) константы $^3J_{NH-SH}$ 6,1–9,3 Гц валиновых остатков (у валиномицина 6,6 и 8,6 Гц [14]). Согласно соответствующей стереохимической зависимости [25], константа $^3J_{NH-SH}$ аланинового остатка (8,0 Гц) отвечает $\varphi = -85 \pm 5$, что несколько отличается от значения, найденного для остатка Lac формы А валиномицина (-120°) [25], но согласуется с сохранением общего типа конформации.

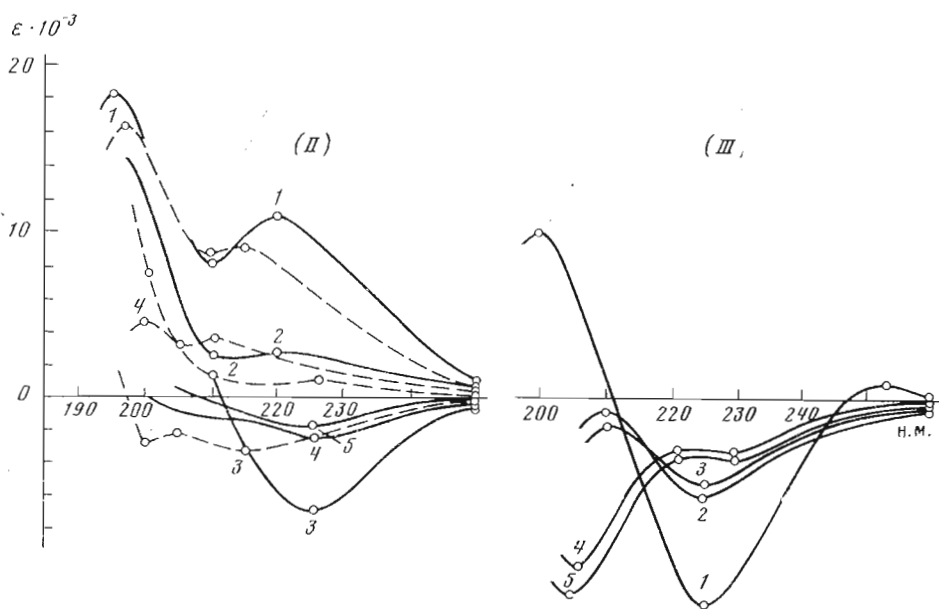


Рис. 2. Кривые КД соединений (II) и (III). Растворители: 1 — гептан, 2 — этанол, 3 — этанол — вода, 1:1 у (II) и 3:1 у (III), 4 — $0,7 \cdot 10^{-2}$ М КСl в этаноле, 5 — 1 М NaClO₄ в этаноле. Пунктиром даны кривые валиномицина в тех же растворителях

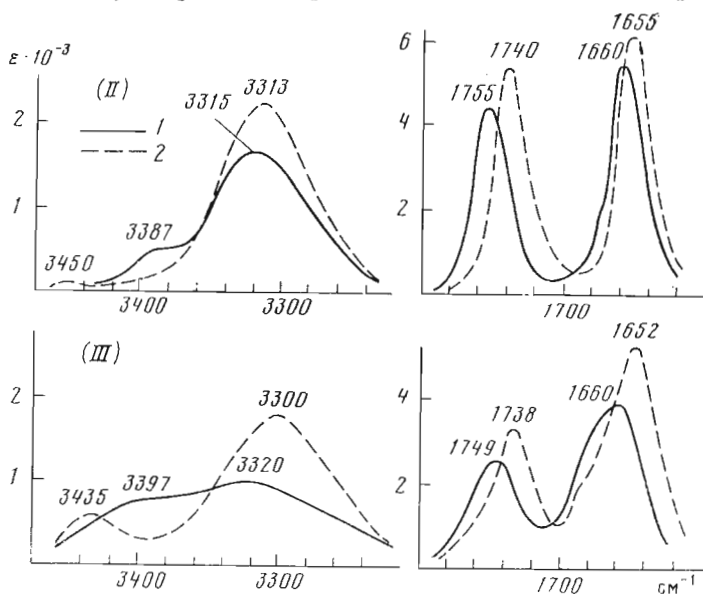


Рис. 3. ИК-спектры соединений (II) и (III) (1) и их K^+ -комплексов (2) в $CHCl_3$

У соединения (III) NH-группы аланина в неполярных средах, по-видимому, начинают принимать участие в образовании водородных связей, дестабилизируя браслетную конформацию. Это предположение основано на отсутствии полос свободных групп NH (ν_{NH} 3400 cm^{-1}) в ИК-спектре и падении интенсивности полосы с ν_{NH} 3320 cm^{-1} , характерной для браслетной системы водородных связей. Кривая КД соединения (III) в гептане (рис. 2) также сильно отличается от валиномициновой, однако этот эффект может быть связан и с существенным изменением соотношения амидных и сложноэфирных хромофорных групп (8:4) у аналога (III) по сравнению с соотношением этих групп (6:6) у аналога (I), причем в браслетной

Химические сдвиги (δ , м. д.) и вицинальные константы спин-спинового взаимодействия протонов (в скобках, Гц) соединений (II) и (III) и их комплексов с ионами калия
 В квадратных скобках приведены значения $(\Delta\delta/\Delta T) \cdot 10^3$ (м. д./град)

Соединение	Среды	Фрагмент												
		$(\text{CH}_3)_\text{C}$	CH_2C		C^αH	C^βH			NH^*					
			Lac	Ala		Lac	Hyl	Ala	Val	Ala	Val			
(II)	CDCl_3	0,97	1,39	1,39	2,28	5,26(7,0)	4,97(3,5)	4,88	3,91(11,0)	7,73(6,1)	7,74(8,0)	7,73(6,1)		
			1,39			5,18(7,0)	4,93(3,5)		4,05(8,0)	7,83(6,1)		7,83(9,3)	7,83(9,3)	
(III)	$\text{CDCl}_3 + \text{K}^+$	1,05	1,51	1,51	2,20	4,85(7,0)	4,52(3,6)	4,23	3,76(11,0)	8,32(6,5)	8,14(5,5)	8,32(6,5)		
			1,51			4,90(7,0)	4,52(3,6)		3,76(11,0)	8,28(6,5)		8,28(6,5)	8,22(6,5)	
(III)	CCl_4	0,98	1,35-1,40		2,23	5,12-4,76			3,81(11,0)	8,11(6,5)	7,84(8,7)	8,11(6,5)		
									3,81(11,0)	8,11(6,5)		7,64(6,5)	7,50(7,6)	7,40(6,5)

Таблица 2 (окончание)

Соединение	Среды	Фрагмент									
		(CH ₃)C	CH ₃ C		Lac	CαH			NH*		
			Lac	Ala		Hγ1	Ala	Val	Ala	Val	
											Lac
(III)	CDCl ₃	0,98	1,40	1,35	2,22	5,0(7,0)	4,97(3,2) 4,85(5,3) 4,93(3,5)	3,64-4,22	7,82(8,2) 7,66(5,4) 7,40(6,6) 7,34(6,5) 7,20(~7,0) 7,07(7,6) 6,96(6,5) 6,57(6,8)		
		0,96	1,40	1,39 1,39	2,41	4,95(7,0)	4,53(3,0) 4,53(3,0) 4,47(3,0)	4,18 4,18	7,87(~7,0) 7,87(~7,0) 9,0-8,5		
									8,58(7,8) [9,6] 8,58(7,8) [9,6]	8,39(5,4) [3,0] 8,39(5,4) [3,0] 8,39(5,4) [3,0] 8,39(5,4) [3,0] 8,17(5,4) [3,0] 8,05(5,4) [4,0]	
	CDCl ₃ -MeOH(2:1)+K+										

* Константы HN—CαH приведены с поправкой на электроотрицательность (³J_{испр} ⇒ ³J_{насл}-1,09).

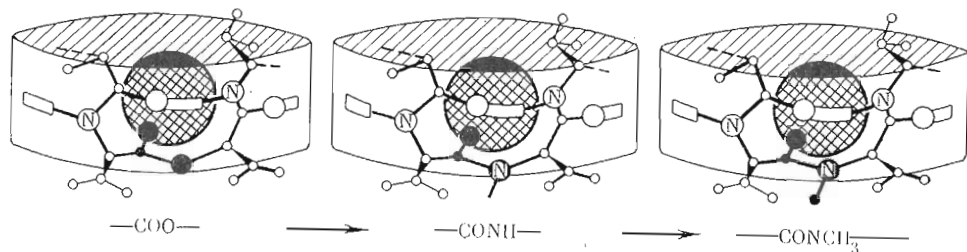


Рис. 4. Схематическое изображение замены сложноэфирных групп на амидные и N-метиламидные в K^+ -комплексе валиномицина

конформации последнего они образуют внутренне скомпенсированную *мезо*-структуру.

Как и следовало ожидать, в ИК-спектрах K^+ -комплексов соединений (II) и (III) присутствуют полосы группы NH, участвующих в образовании водородных связей (ν_{NH} 3313 и 3300 cm^{-1}) валиновых остатков, и полосы свободных групп NH — слабая полоса от одного аланинового остатка при 3450 cm^{-1} у соединения (II) и более интенсивная полоса от двух аланиновых остатков при 3435 cm^{-1} у соединения (III) (рис. 3). Из сопоставления приведенных значений с частотами свободных групп NH в пептидах [26, 27] видно, что участие карбонилв амидных групп в ион-диольном взаимодействии не сказывается существенно на частотах ν_{NH} этих групп. Поскольку лигандными группами в комплексе служат и амидные и сложноэфирные карбонилы, при комплексообразовании наблюдаются изменения во всей области карбонильных частот. Судя по константам $^3J_{NH-CO}$ остатков валина (6,5 Гц у соединения (II) и 5,4 Гц у соединения (III), табл. 2), замена $COO \rightarrow CONH$ не влияет на конформацию депептидной цепи в комплексе (у валиномицина соответствующие значения составляют 5,2–5,6 Гц).

Введение аланиновых остатков позволяет по константам $^3J_{NH-CO}$ определить значения углов ϕ_{Ala} и сопоставить их со значениями углов ϕ_{Val} , определенных для валиномицина в растворе по гетероядерным константам $^3J_{^{13}CO-C^{\alpha}H}$ (-94°) [15] и рентгеноструктурным анализом в кристалле (от -66 до -76°) [28]. Константа $^3J_{NH-CO}$ 5,5 Гц у соединения (II) отвечает углу ϕ $-68 \pm 3^\circ$, а 7,8 Гц у соединения (III) — углу ϕ $-81 \pm 5^\circ$. Таким образом, во всех случаях были получены близкие значения двугранных углов.

Как следует из структуры комплекса (III) $\cdot K^+$ (рис. 4), его валиновые группы NH участвуют в образовании H-связей, а аланиновые группы NH расположены на молекулярной поверхности и должны взаимодействовать с растворителем. Это различие четко проявляется при измерении температурной зависимости химических сдвигов в $CH_3OH-CDCl_3$ (1 : 2): $\Delta\delta/\Delta T$ $(1-3) \cdot 10^{-3}$ м.д./град для NH_{Val} и $9,6 \cdot 10^{-3}$ м.д./град для NH_{Ala} и скоростей обмена $NH \rightarrow ND$ в $CD_3OD-CDCl_3$ (1 : 2) (рис. 5).

Наконец, аналоги (II) и (III) образуют более устойчивые Na^+ -комплексы, чем валиномицин (табл. 1). Это обстоятельство, по-видимому, связано с особенностями электронного строения амидных групп (большая поляризуемость и/или большой точечный заряд на карбонильных O-атомах), более эффективно, чем сложноэфирные, связывающих в растворе малые ионы. Из кривых КД видно, что по своей пространственной структуре Na^+ -комплексы (II) и (III) не отличаются от кальевых. Закономерное изменение формы кривых при переходе от K^+ -комплекса (I) к K^+ -комплексам (II) и (III), вероятнее всего, связано с обсуждавшимися выше изменениями природы хромофорных групп, а не с конформационными пере-стройками.

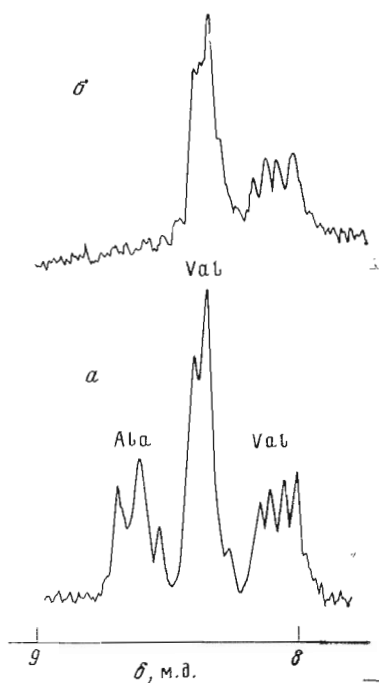
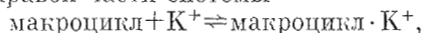


Рис. 5. Область сигналов NH спектров ЯМР соединения (III) в $\text{CD}_3\text{OH}-\text{CDCl}_3$ (2 : 1): *a* — непосредственно после растворения, *b* — через 24 ч

Высокая устойчивость комплексов соединений (II) и (III) и их интересные биологические свойства (они обнаружили более широкий спектр антимикробного действия, чем сам валиномицин [29]) побудили нас синтезировать и исследовать новую группу аналогов, содержащих остатки MeAla вместо Lac (соединения IV—VI) и MeVal вместо HuI (соединения VII—IX). Из приведенных на рис. 1 конформационных карт видно, что введение N-метиламидных групп приводит к уменьшению площади низкоэнергетических областей, что должно сопровождаться ограничением конформационной подвижности как свободных циклодекапептидов, так и их комплексов. Поэтому для соединений (IV—IX) по сравнению с валиномицином можно ожидать повышения энергии как левой, так и правой части системы



и в зависимости от относительной величины этого повышения устойчивость комплексов этих соединений с K^+ может быть выше или ниже, чем у природного циклодекапептида.

Действительно, как видно из данных табл. 1, последовательное введение остатков MeAla в ряду (IV)—(VI) и *D*-MeVal в ряду (VII)—(IX) сопровождается вначале падением, а затем ростом константы устойчивости комплексов. Не исключено, что повышение устойчивости комплексов соединений (VI) и (IX) связано также с более высокой симметрией их внутренней координационной сферы.

Анализ ИК-, КД- и ЯМР-спектров показывает, что соединения (IV) и (VII), содержащие одну N-метиламидную группу, близки по своим конформационным параметрам валиномицину. Так, присутствие интенсивных полос при 3317 и 3334 см^{-1} в ИК-спектрах (рис. 6) свидетельствует о реализации в CHCl_3 браслетных структур, однако наличие полос при 3388 см^{-1} у соединения (IV) и 3415 см^{-1} у соединения (VII) указывает на ослабление части внутримолекулярных водородных связей. Подобная картина хорошо согласуется с данными ЯМР-спектроскопии, где наряду с обычными для браслетных конформаций значениями констант $^3J_{\text{NH}-\text{CH}}$ $7,1-8,9 \text{ Гц}$ имеются значения $9,8-9,9 \text{ Гц}$ (табл. 3), которые, по-видимому, и относятся к группам NH, участвующим в образовании ослабленных внутримолекулярных водородных связей. Изменение кривых КД при переходе от гексана к водному этанолу свидетельствует о конформационной подвижности соединений (IV) и (VII), хотя и не столь ярко выраженной, как у валиномицина (ср. кривые на рис. 7).

Введение второй N-метиламидной группы (соединения V и VIII) вызывает полное разрушение браслетной конформации (в ИК-спектрах этих соединений отсутствуют полосы при $3300-3350 \text{ см}^{-1}$). Вероятнее всего, в растворах при этом наблюдается равновесие нескольких достаточно подвижных структур, относительное содержание которых, судя по постоянству кривых КД, слабо зависит от растворителя.

Образование комплексов соединений (IV—IX) сопровождается изменением формы кривых КД и, следовательно, существенными конформационными перестройками. В отличие от валиномицина соединения иссле-

Химические сдвиги (δ , м.д.) и вицинальные константы спин-спинового взаимодействия протонов (в скобках, Гц) соединений (IV) и (VII) и их комплексов с ионами калия

Соединение	Среда	Фрагмент										
		NCH_3	$(\text{CH}_3)_2\text{C}$	CH_2C		C^αH	Lac	Hvi	MeAla	Val, MeVal	NH	
				Lac	MeAla							
(IV)	CDCl_3	3,02	1,02	Lac	1,46	1,33	2,32	5,35(7,0) 5,87(7,0)	4,82(3,4) 4,89(3,2) 5,02(3,4)	5,22(7,0)	4,03(9,3) 4,15(9,0) 4,03(9,3) 4,49(9,2) 4,23(9,2) 3,85(9,2)	7,84(8,3) 7,72(7,6) 7,72(7,6) 7,53(9,8) 7,42(9,9) 7,23(7,1)
				MeAla	1,54							
		3,26	1,02	Lac	1,54	1,43	2,22	4,99(7,0) 4,99(7,0)	4,63(3,9) 4,59(3,5) 4,59(3,5)	5,02(7,0)	3,89(11,0) 3,89(11,0) 3,86(11,0) 3,86(11,0) 3,83(11,0) 3,83(11,0)	8,44(6,4) 8,39(5,4) 8,29(6,1) 8,24(5,6) 8,18(8,2) 8,07(6,1)
				MeAla	1,54							
		(VII)	CDCl_3	3,13	1,00	Lac	1,48	2,31	5,24(7,0) 5,18(7,0) 5,11(7,0)	4,99(3,6) 4,99(3,6)	4,19(7,0) 4,16(7,0)	7,48(8,0) 7,46(8,0)
						MeAla	1,48					
MeAla	1,48											
$\text{CDCl}_3 + \text{K}^+$		3,42	1,08	Lac	1,55	2,24	4,98(7,0) 4,98(7,0) 4,96(7,0)	4,62(3,9) 4,62(3,9)	3,88(11,0) 3,88(11,0) 3,88(11,0)	8,42(5,8) 8,30(5,6) 8,30(5,5)		
				MeAla	1,55							
				MeAla	1,55							

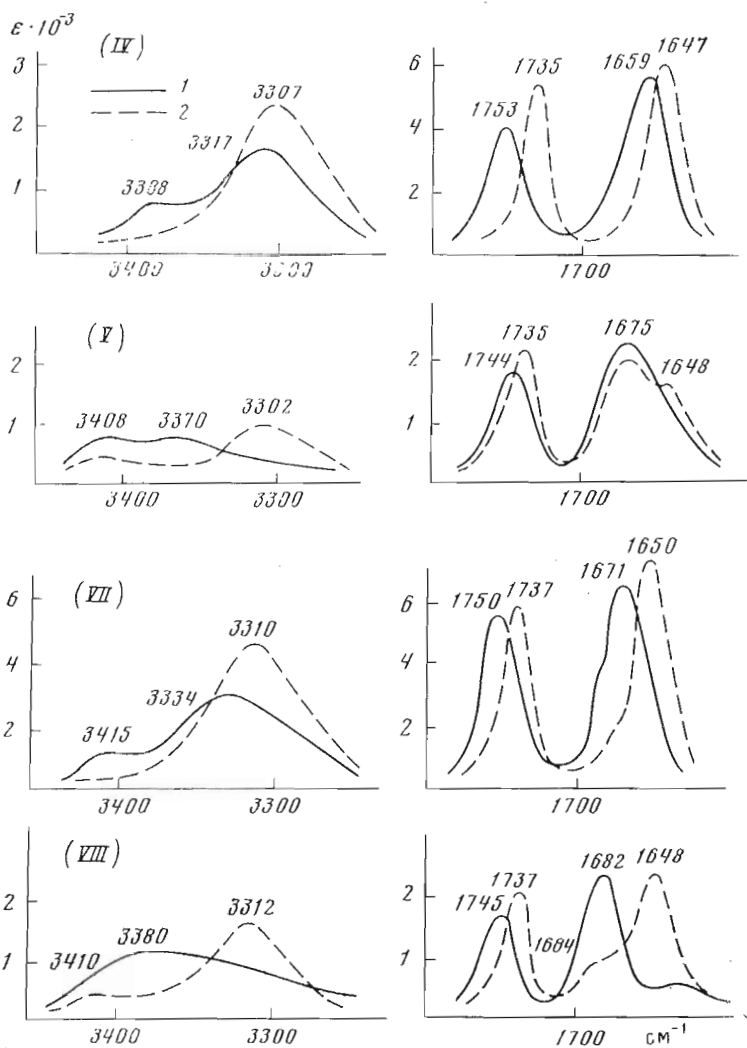


Рис. 6. ИК-спектры соединений (IV), (V), (VII) и (VIII) (1) и их K⁺-комплексов (2) в CHCl₃

двумя рядами дают интенсивные хиротические эффекты, что связано с появлением новых (N-метиламидных) групп. В соответствии с противоположной конфигурацией N-метилаланиновых и N-метилвалиновых остатков соединений (IV)–(VI) и (VII)–(IX) обе указанные группы дают приблизительно энантимерные кривые (рис. 7), что указывает на общие принципы формирования их пространственной структуры; этот вывод справедлив и для свободных циклодекапептидов (за исключением аналога (VI) в трифторэтаноле, см. ниже), и для их комплексов.

ИК- и ЯМР-спектры K⁺-комплексов соединений (IV), (V), (VII) и (VIII) обнаруживают все обычные признаки валцномициновых комплексов: 1) сужение полосы ν_{COO} и ее смещение к 1735–1737 см⁻¹; 2) появление интенсивных полос с ν_{NH} 3302–3312 см⁻¹ (присутствие полосы с ν_{NH} 3410 см⁻¹ в ИК-спектрах комплексов соединений (V) и (VIII) объясняется присутствием в смеси свободной формы); 3) константы ³J_{NH-CH} 5,4–6,4 Гц и ³J_{C^αH-C^βH} 10,3–11,0 Гц. Интересно, что фрагмент C^αH–C^βH остатка MeVal соединения (VII) в CDCl₃ и в K⁺-комплексе принимает предпочтительную *транс*-ориентацию (³J_{C^αH-C^βH} равны

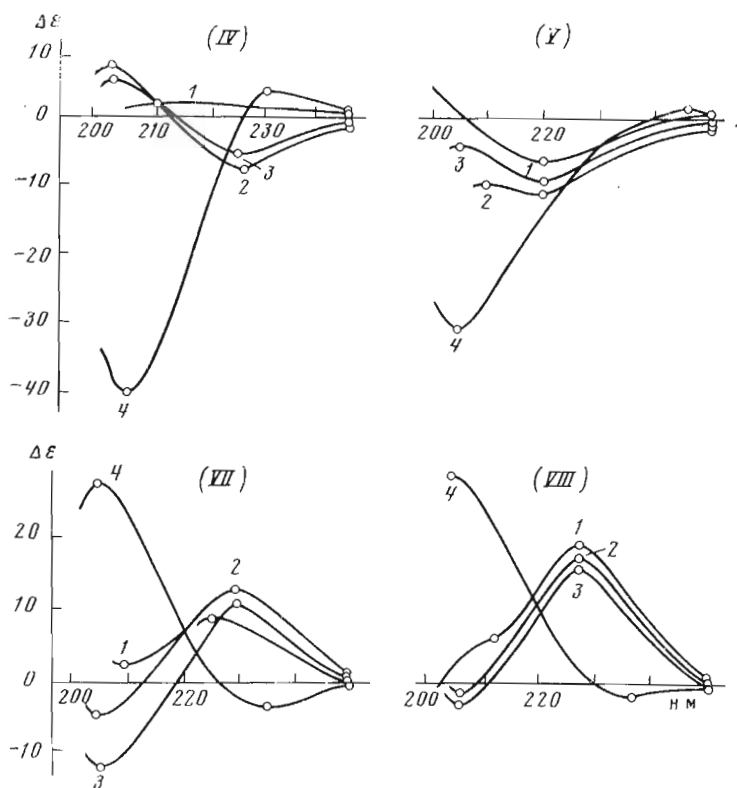


Рис. 7. Кривые КД соединений (IV), (V), (VII) и (VIII). Растворители: 1 - гептан, 2 - этанол, 3 - этанол - вода, 3:1 для (IV), 2:1 для (V), 1:1 для (VII) и (VIII), 4 - $0,7 \cdot 10^{-2}$ М КСl в этаноле

соответственно 10,0 и 8,7 Гц), в то время как соответствующий фрагмент остатков Nu_1 валиномицина принимает *gosh*-ориентацию [16]. Этот факт указывает на относительную свободу внутреннего вращения боковых цепей остатков оксикислот брашлетных конформаций валиномицина и его комплексов; в районе же аминокислотных остатков комплекса, как показано в предыдущем сообщении [1], возможна только *trans*-ориентация протонов $C^{\alpha}H-C^{\beta}H$.

Аналог (VI) исследовался особенно подробно в связи с его выдающимися металлсвязывающими свойствами и высокой биологической активностью [30]. В области валентных колебаний групп NH ИК-спектров соединения (VI) в *n*-гептане, CCl_4 и $CHCl_3$ (рис. 8) присутствуют по две полосы, каждая из которых на основании интенсивности отнесена к трем одноименным группам NH (о методе оценки числа групп NH по интенсивности полос в ИК-спектрах см. [27]). При этом положение одной из них почти не изменяется (ν_{NH} 3321–3325 cm^{-1}), а вторая располагается в более широком диапазоне частот (ν_{NH} 3365–3396 cm^{-1}). Судя по указанным значениям частот, все группы NH образуют внутримолекулярные водородные связи, откуда следует, что аналог (VI) в неполярных средах принимает брашлетную конформацию; три группы NH образуют в ней сравнительно устойчивые H-связи, а три — ослабленные. Константы $^3J_{NH-CH}$ соединения (VI) в $CDCl_3$ имеют обычные для брашлетных структур значения: 7,5 и 9,3 Гц (табл. 4). Число и мультиплетность сигналов спектра ЯМР (см. рис. 9a) указывают на симметричность его пространственной структуры (по крайней мере в шкале частот метода ЯМР), а также на отсутствие форм с *cis*-связями третичных амидных групп, часто встречающихся у N-метилированных циклопептидов и циклодекапептидов [31–

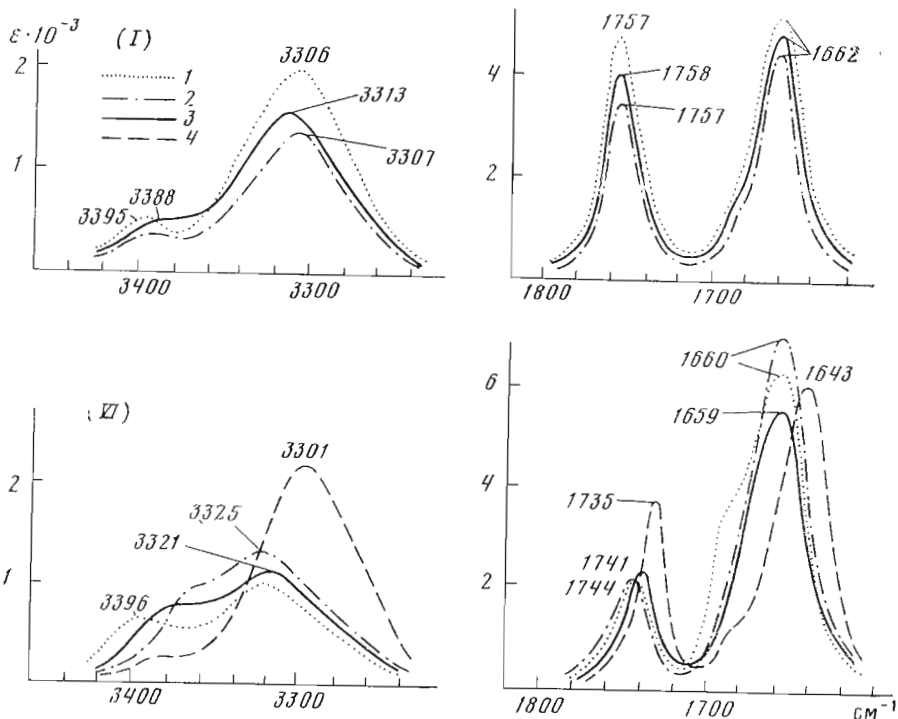


Рис. 8. ИК-спектры валиномицина и соединения (VI) в гексане (1), CCl_4 (2), CHCl_3 (3); K^+ -комплекс в CHCl_3 (4)

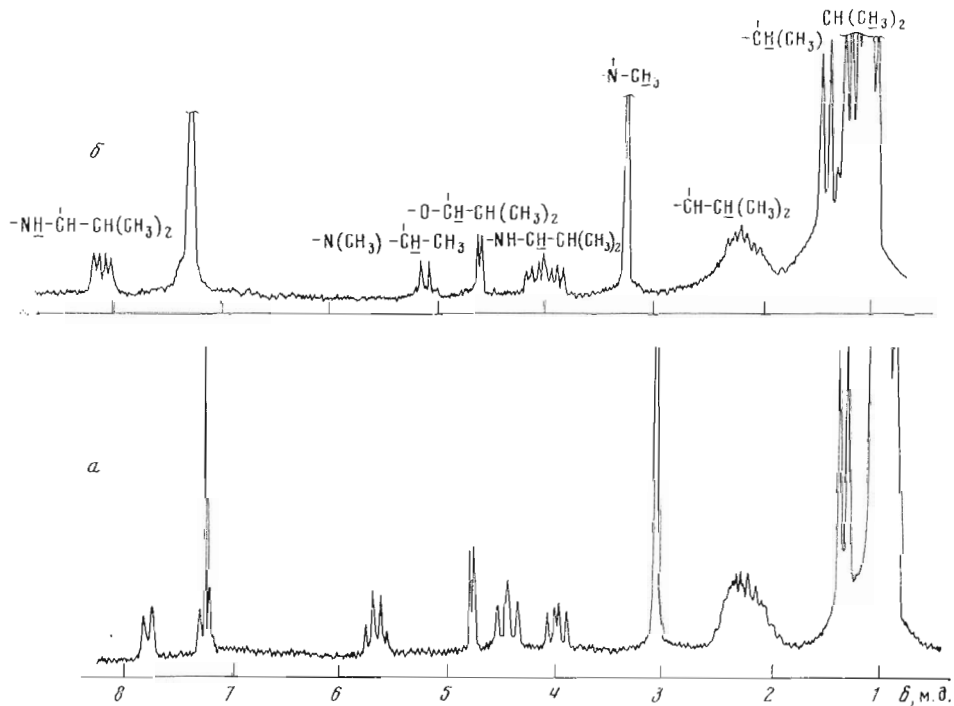


Рис. 9. Спектр ПМР соединения (VI) (a) и его K^+ -комплекса (б) в CDCl_3

Химические сдвиги (δ , м.д.) и видяльные константы спин-спинового взаимодействия протонов (в скобках, Гц) соединения (VI) и его комплексов с ионами щелочных металлов
В квадратных скобках приведены значения $(\Delta\delta/\Delta T) \cdot 10^3$ (м.д./град)

Среды	Фрагмент										
	$(\text{CH}_3)_2\text{C}$	CH_3C	C^αH	CH_2N	C^αH			NH			
					H _{vi}	Me Δ la	D-Val	L-Val	D-Val	L-Val	
CDCl_3	0,96	1,30	2,28	3,05	4,77 (3,6)	5,65 (7,0)	3,98 (10,9); 4,44 (10,9)	7,26 (9,3); 7,78 (7,5)			
$\text{CDCl}_3, \text{Na}^+$	1,10	1,38	2,20	3,18	4,92 (3,5)	5,49 (7,5)	4,13 (10); 3,95 (10)	7,57 (6,8); 7,85 (4,4)			
$\text{CDCl}_3, \text{K}^+$	1,06	1,39	2,20	3,22	4,61 (3,7)	5,12 (7,6)	5,00 (10,9); 3,92 (11,6)	8,05 (6,3); 8,17 (4,7)			
$\text{CDCl}_3, \text{Cs}^+$	1,12	1,43	2,19	3,24	4,69 (3,6)	5,21 (7,1)	4,03 (10,7); 3,88 (10,5)	7,73 (5,8); 7,81 (4,9)			
$\text{CDCl}_3 - (\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (93 : 7)	1,01	1,32	2,28	3,07	4,78 (3,6)	5,63 (7,0)	3,99 (10,5); 4,45 (11)	7,27 (9,3); 7,81 (8,0) [2,5] [7,6]			
$\text{CDCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ (1 : 1)	-	-	-	-	-	-	-	7,45 (9,11); 7,57 (8,5) [3,3] [8,0]			
$\text{CDCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ (1 : 1), K^+	-	-	-	-	-	-	-	8,07 (6,5); 8,15 (4,7) [3,4] [3,1]			
$\text{CDCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ (1 : 1), Cs^+	-	-	-	-	-	-	-	7,73 (6,0); 7,89 (4,6) [2,4] [2,3]			

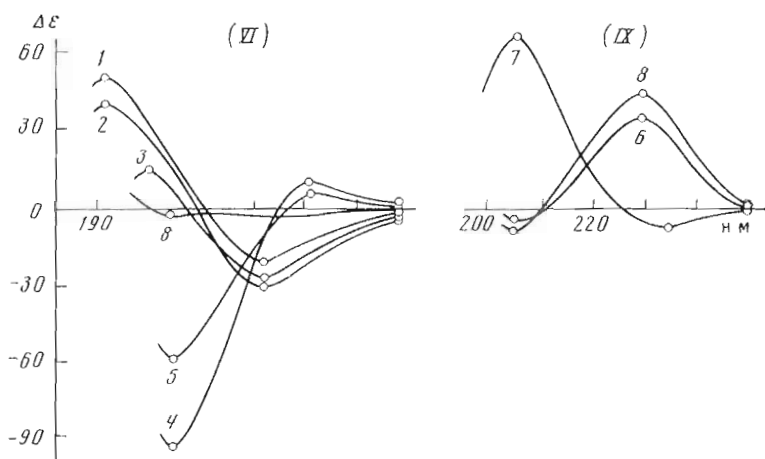


Рис. 10. Кривые КД соединений (VI) и (IX) в гектане (1), этаноле (2), этаноле – воде, 2 : 1 (3), $0,7 \cdot 10^{-2}$ М КСl в этаноле (4), 1 М NaClO₄ в этаноле (5), трифторэтанол – этаноле, 1 : 2 (6), $0,7 \cdot 10^{-2}$ М КСl в смеси трифторэтанола – этанола, 1 : 2 (7), трифторэтанол (8)

35]. Последний вывод справедлив и для свободных соединений (IV) – (IX), и для их комплексов (см., например, рис. 9б).

Известно, что присутствие N-метиламидных групп в циклопептидах дестабилизирует внутримолекулярные водородные связи типа 4→1 β-изгибов [32]. Отсюда следует, что в системе H-связей аналога (VI) ослабленные связи должны образовывать D-валиновые NH-группы, поскольку именно они замыкают 10-членные циклы, включающие N-метиламидную группу. Интересно, что увеличение сольватирующей способности растворителя (переход от $n\text{-C}_7\text{H}_{16}$ к CCl_4 и CHCl_3) приводит к усилению H-связей (смещение ν_{NH} от 3395 к 3365 см^{-1}). Высокочастотная полоса «амид А» имеется и в ИК-спектрах валиномицина, причем, как показано в настоящей работе, ее значения ν_{NH} также смещаются в область низких частот при переходе от гектана к CHCl_3 . В работе [16] эта полоса была отнесена к свободным группам NH проциклической конформации; в последней же работе [1] было высказано предположение, что ее следует отнести к группам NH, участвующим в образовании ослабленных H-связей. Результаты настоящей работы подтверждают это предположение.

Переход от неполярных сред к растворителям средней полярности слабо меняет конформацию соединения (VI), как следует из близости кривых КД в гектане и этаноле (рис. 10) и слабых изменений параметров спектров ЯМР при переходе от CDCl_3 к смесям $\text{CDCl}_3\text{--}(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (93 : 7) и $\text{CDCl}_3\text{--CH}_2\text{OH}$ (1 : 1) (табл. 4). Вместе с тем такие растворители сольватируют три группы NH, на что указывают высокие значения $\Delta\delta/\Delta T$ одного из сигналов NH. Несколько более существенные изменения кривых КД наблюдаются при переходе к водному этанолу и весьма значительные — при переходе к трифторэтанолу. Характер протекающих при этом конформационных перестроек остается неясным.

Видциальные константы спин-спинового взаимодействия протонов $\text{NH--C}^{\alpha}\text{H}$ и $\text{C}^{\alpha}\text{H--C}^{\beta}\text{H}$ в комплексах соединения (VI) с Na^+ , K^+ и Cs^+ весьма близки друг другу (табл. 4) и соответствующим параметрам спектров ЯМР комплексов валиномицина, что указывает на присутствие во всех случаях однотипной браслетной структуры с ориентированными внутрь полости карбоксильными группами (рис. 11). Как и следовало ожидать, в области «амид А» ИК-спектров K^+ -комплекса (рис. 8) имеется интенсивная полоса H-связанных групп NH (ν_{NH} 3304 см^{-1}), а образование комплекса сопровождается длинноволновым смещением полос валентных колебаний сложнэфирных и амидных групп CO; химические сдвиги сигнала

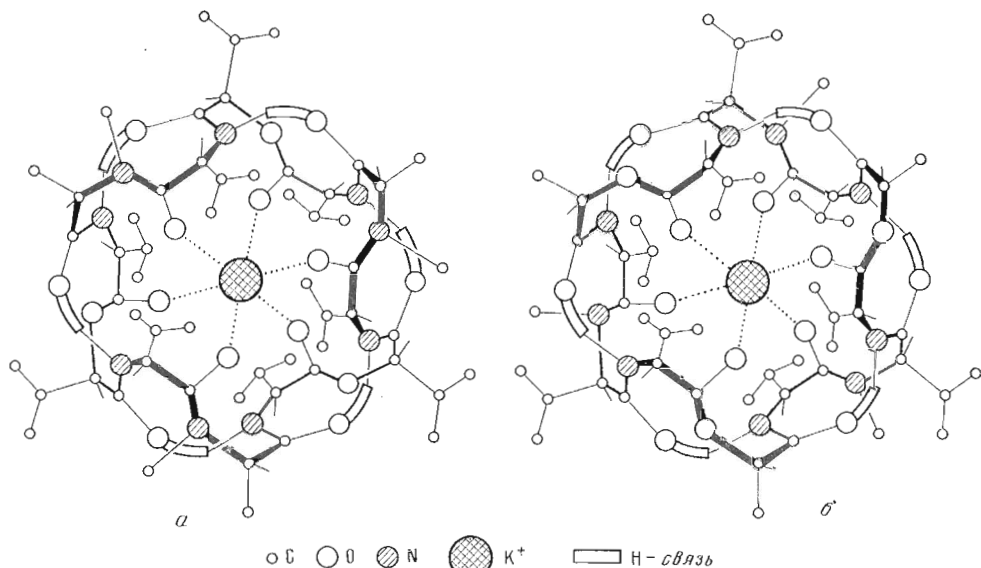


Рис. 11. Конформация K^+ -комплексов соединений (VI) (а) и (IX) (б)

лов NH комплексов с K^+ и Cs^+ в смеси $CDCl_3-CH_3OH$ (1 : 1) сравнительно слабо зависят от температуры [$(\Delta\delta/\Delta T) \cdot 10^3$ 2,3–3,4 м.д./град, табл. 4].

Таким образом, конформационные параметры комплексов соединения (VI) и валиномицина весьма близки. Исключительно высокая устойчивость комплексов аналога (VI) в спиртовых и водно-спиртовых растворах (табл. 1) объясняется ограниченной конформационной подвижностью его депептидной цепи в этих условиях, связанной с присутствием объемных N-метиламидных группировок. Смещение максимума устойчивости комплексов в ряду $Na^+-K^+-Rb^+-Cs^+$ от рубидия у валиномицина к калию у соединения (VI) и повышенная устойчивость натриевого комплекса объясняются рассмотренными выше особенностями амидных лигандных групп.

Форма кривых КД соединения (IX) и его K^+ -комплекса в смеси $CF_3CH_2OH-C_2H_5OH$ (1 : 2) (рис. 10), а также данные по устойчивости K^+ -комплекса в этой смеси (табл. 1) позволяют утверждать, что основные положения, высказанные выше относительно соединения (VI), применимы и к этому аналогу (за исключением того, что даже в трифторэтанолe соединение (IX) сохраняет гептано-этанольный тип кривых КД и, следовательно, обладает еще меньшей конформационной подвижностью).

В целом результаты настоящего исследования свидетельствуют о перспективности поиска новых высокоэффективных комплексонов и понофоров в ряду аналогов валиномицина с модифицированными лигандными группами.

Экспериментальная часть

Перед физико-химическими измерениями соединения (II)–(IX) высушивали 5 ч в вакууме над P_2O_5 при $40^\circ C$.

Кривые КД измеряли на спектрополяриметре Cary-60 с приставкой CD 6001 (США). Концентрация растворов $(0,5-2) \cdot 10^{-3}$ М, температура 23–26° С, толщина кювет 0,01–0,5 см.

ИК-спектры регистрировали на приборе UR-10 (ГДР) с призмами из LiF и NaCl. При измерениях в CCl_4 толщина кюветы составляла 10 мм, концентрация растворов $(3-5) \cdot 10^{-4}$ М; в $CHCl_3$ – 20 мм и $1 \cdot 10^{-4}$ М; в CCl_4-CH_3CN (2 : 1) – 2 мм и $(0,5-1) \cdot 10^{-3}$ М. Для получения ИК-спектров комплексов соединений в $CHCl_3$ циклодеципептиды растворяли в

метаноле, содержащем 5–7-кратный избыток роданида калия, спирт упаривали досуха и остаток сушили в вакууме (3 ч при 40° С и остаточном давлении 0,1 мм рт.ст.). Сухой остаток обрабатывали CHCl_3 , отфильтровывали, растворитель отгоняли в вакууме и полученный таким образом комплекс использовали для приготовления растворов с известной концентрацией.

Спектры ПМР измеряли на приборе Varian-NA-100D (США) с рабочей частотой 100 МГц. В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан. Химические сдвиги определяли с точностью $\pm 0,005$ м.д., а константы спин-спинового взаимодействия — с точностью $\pm 0,1$ Гц. Температуру измеряли медь-константановой термопарой с точностью $\pm 2^\circ$ С. Отпеснение сигналов с заметным спин-спиновым взаимодействием проводили методом INDOR. Концентрации растворов $\sim 0,05$ М. Получение растворов комплексов в CDCl_3 проводили как для ИК-спектроскопии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов В. Т., Фомина Л. А., Семянина Л. Б., Виноградова Е. И., Овчинников Ю. А., Червин И. И., Яковлев Г. И. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 869–875.
2. Фомина Л. А., Санасарян А. А., Виноградова Е. И. (1971) *Химия природн. соедин.*, **69**–81.
3. Виноградова Е. И., Фомина Л. А., Рябова И. Д., Иванов В. Т. (1974) *Химия природн. соедин.*, **278**–286.
4. Kostetsky P. V., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A., Shchembelov G. (1973) *FEBS Letters*, **30**, 205–209.
5. Urry D. W., Cunningham W. D., Ohnishi T. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **292**, 853–857.
6. Gisin B. F., Merrifield R. B. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 6165–6170.
7. Gisin B. F., Ting-Beall H. P., Davis D. G., Grell E., Tosteson D. C. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **509**, 201–217.
8. Baron D., Pease L. D., Blout E. R. (1977) *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 8299–8306.
9. Davis D. G., Gisin B. F., Tosteson D. C. (1976) *Biochemistry*, **15**, 768–774.
10. Easwaran K. R. K., Pease L. G., Blout E. R. (1979) *Biochemistry*, **18**, 61–67.
11. Hamilton J. A., Sabesan M. N., Gisin B. F., Steinrauf L. K. (1978) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **80**, 949–954.
12. Benz R., Gisin B. F., Ting-Beall H. P., Tosteson D. C., Lauger P. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **455**, 665–684.
13. Ting-Beall H. P., Tosteson M. T., Gisin B. F., Tosteson D. C. (1974) *J. Gen. Physiol.*, **63**, 492–508.
14. Shemyakin M. M., Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Antonov V. K., Vinogradova E. I., Shkrob A. M., Malenkov G. G., Evstratov A. V., Laine I. A., Melnik E. I., Ryabova I. D. (1969) *J. Membrane Biol.*, **1**, 402–430.
15. Bystrov V. F., Gavrilov Yu. D., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. (1977) *Eur. J. Chem.*, **78**, 63–82.
16. Иванов В. Т., Лайне И. А., Абдуллаев Н. Д., Плетнев В. З., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Семянина Л. Б., Мещерякова Е. Н., Попов Е. М., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. (1971) *Химия природн. соедин.*, **221**–246.
17. Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. (1974) *Мембрано-активные комплексоны*, «Наука», М.
18. Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T. (1974) *Tetrahedron*, **30**, 1871–1890.
19. Иванов В. Т., Санасарян А. А., Червин И. И., Яковлев Г. И., Фомина Л. А., Семянина Л. Б., Сычев С. В., Виноградова Е. И., Овчинников Ю. А. (1974) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, **2310**–2320.
20. Иванов В. Т., Фомина Л. А., Семянина Л. Б., Виноградова Е. И., Овчинников Ю. А., Червин И. И., Яковлев Г. И. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 5–16.
21. Иванов В. Т., Санасарян А. А., Фомина Л. А., Семянина Л. Б., Виноградова Е. И., Овчинников Ю. А., Червин И. И., Яковлев Г. И. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 214–225.
22. Иванов В. Т., Санасарян А. А., Семянина Л. Б., Виноградова Е. И., Овчинников Ю. А., Червин И. И., Яковлев Г. И. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 226–238.
23. Попов Е. М., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф. (1971) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, **2**, 312–319.
24. Иванов В. Т., Костецкий П. В., Мещерякова Е. А., Ефремов Е. С., Попов Е. М., Овчинников Ю. А. (1973) *Химия природн. соедин.*, **363**–378.
25. Bystrov V. F., Ivanov V. T., Portnova S. L., Balashova T. A., Ovchinnikov Yu. A. (1973) *Tetrahedron*, **29**, 873–877.
26. Желтова В. Н., Иванова А. Г., Костецкий П. В., Иванов В. Т., Попов Е. М., Овчинников Ю. А. (1973) *Химия природн. соедин.*, **322**–338.

27. Ивапов В. Т., Сснвяина Л. Б., Ефремов Е. С., Шилин В. В., Овчинников Ю. А. (1971) Химия природн. соедин., 347-357.
28. Neupert-Laves K., Dobler M. (1975) *Helv. chim. acta*, 58, 432-442.
29. Шемякин М. М., Виноградова Е. И., Рябова И. Д., Фонина Л. А., Санасарян А. А. (1973) Химия природн. соедин., 241-248.
30. Виноградова Е. И., Фонина Л. А., Рябова И. Д., Иванов В. Т. (1974) Химия природн. соедин., 278-286.
31. Titlestad K., Groth P., Dale G., Yusuff Ali M. (1973) *J. Chem. Soc., Ser. D*, 346-348.
32. Ивапов В. Т., Лавринович И. А., Портнова С. Л., Лаплин В. В., Костецкий П. В., Овчинников Ю. А. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2320-2327.
33. Bystrov V. F., Portnova S. L., Balashova T. A., Gavrilov Yu. D., Koz'min S. A., Afanas'ev V. A. (1973) *J. Pure and Appl. Chem.*, 36, 19-26.
34. Sobell H. M., Jain S. C. (1972) *J. Mol. Biol.*, 68, 21-34.
35. Sigihara T., Imanishi Y., Higashimura T. (1975) *Biopolymers*, 14, 723-732.

Поступила в редакцию
7.I.1980

STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP FOR CYCLIC DEPSIPEPTIDES OF VALINOMYCIN SERIES. VII. ANALOGS WITH MODIFIED ESTER GROUPS

IVANOV V. T., FONINA L. A., SENYAVINA L. B., OVCHINNIKOV Yu. A.,
CHERVIN I. I., YAKOVLEV G. I.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino

Spectral and theoretical methods were used to study the conformations of eight valinomycin analogs having ester groups substituted for amide and N-methylamide groups. The bracelet conformation typical of valinomycin in nonpolar media is also characteristic of the compounds with one and three hydroxy acids substituted for amino and methylamino acids. The introduction of two amide (N-methylamide) groups results in destabilization of bracelet conformation of free depsipeptides. The complexes of analogs have the same bracelet system of H-bonds as valinomycin, ligands being both ester and amide (N-methylamide) groups. It was also shown that the introduction of N-methylamide groups significantly restricts the conformational mobility of macrocycles. Tertiary amide groups of free compounds as well as their complexes have *trans*-orientation.