

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДИМЕРНОГО АНАЛОГА ДИСТАМИЦИНА С ПОЛИ(dA)-ПОЛИ(dT), ПОЛИ[d(A-T)]-ПОЛИ[d(A-T)] И ДУПЛЕКСОМ O₂₃ В НАЧАЛЕ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГЕРПЕСА

© 2016 г. А.Н. Суrowая*, Н.П. Бажулина*, С.Ю. Лепехина*, В.Л. Андрoнова* **, Г.А. Галегов**, Е.Д. Моисеева*, С.Л. Гроховский*, Г.В. Гурский*

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32;

**Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

E-mail: annasur@eimb.ru

Поступила в редакцию 30.12.15 г.

С помощью ультрафиолетовой спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма исследовано связывание димерного аналога дистамицина (Pt-bis-Dst) с поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)], поли(dA)-поли(dT) и дуплексом O₂₃ с последовательностью 5'-GCCAATATATATATATTAT-TAGG-3', который присутствует в начале репликации OriS вируса герпеса. Отличительной особенностью синтетического полиамида от природного антибиотика является то, что в нем два дистамициновых фрагмента соединены с помощью глицинированной *цис*-диаминоплатиновой группы. Показано, что связывание Pt-bis-Dst с поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)] и поли(dA)-поли(dT) достигает насыщения, если одна молекула лиганда приходится примерно на восемь пар оснований. При дальнейшем увеличении отношения добавленного лиганда к парам оснований в спектрах кругового дихроизма комплексов с поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)] наблюдается смещение максимума длинноволновой полосы в сторону больших длин волн, а в области спектра 290–310 нм появляется «плечо», которое отсутствовало в спектрах комплексов, полученных при низких заполнениях полимера лигандом. При высоких отношениях концентрации лиганда к концентрации олигонуклеотида Pt-bis-Dst может связываться с поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)] в форме шпильки или может образовывать ассоциаты за счет взаимодействия между дистамициновыми фрагментами соседних молекул Pt-bis-Dst. Структура комплексов стабилизируется взаимодействиями между пирролкарбоксамидными фрагментами половинок двух молекул Pt-bis-Dst, адсорбированных на соседних перекрывающихся связывающих местах. Эти взаимодействия, вероятно, также ответственны за концентрационно-зависимые спектральные изменения, наблюдаемые при образовании комплекса между Pt-bis-Dst и поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)]. Спектральные изменения практически отсутствуют при связывании Pt-bis-Dst с поли(dA)-поли(dT). Связывание Pt-bis-Dst с дуплексом O₂₃ достигает насыщения, если две молекулы лиганда приходятся на дуплекс, содержащий кластер из 18 АТ-пар. При увеличении отношения концентраций лиганда к дуплексу спектры кругового дихроизма претерпевают концентрационно-зависимые изменения, аналогичные тем, которые наблюдаются при связывании Pt-bis-Dst с поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)]. Испытания противовирусной активности Pt-bis-Dst показали, что концентрация, при которой цитопатический эффект, вызываемый вирусом герпеса в культуре клеток Vero E6 уменьшается в два раза, равна 1,5 мкг/мл, а индекс селективности противовирусного действия равен 65 при относительно невысокой цитотоксичности. Концентрация Pt-bis-Dst, при которой погибает примерно половина клеток, равна 100 мкг/мл.

Ключевые слова: димерные производные дистамицина, синтетические олигонуклеотиды, ультрафиолетовая спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, противовирусная активность.

Первыми ДНК-связывающими лигандами, для которых было установлено специфическое связывание с (A+T)-кластерами в малом желобе ДНК, были противоопухолевые антибиотики нетропсин и дистамицин (см. обзоры [1,2]). С помощью рентгеноструктурного анализа [3–5] и ЯМР-спектроскопии [6,7] было показано, что эти антибиотики связываются в узкой бороздке

ДНК и занимают при связывании четыре или пять пар оснований. Карбоксамидные NH-группы молекулы нетропсина образуют водородные связи с N3 аденинов и O2 пиримидинов. Основной вклад в энергию связывания вносят ван-дер-ваальсовы контакты и электростатические взаимодействия. NH₂-группа гуанина, выступающая в малый желоб ДНК, стерически

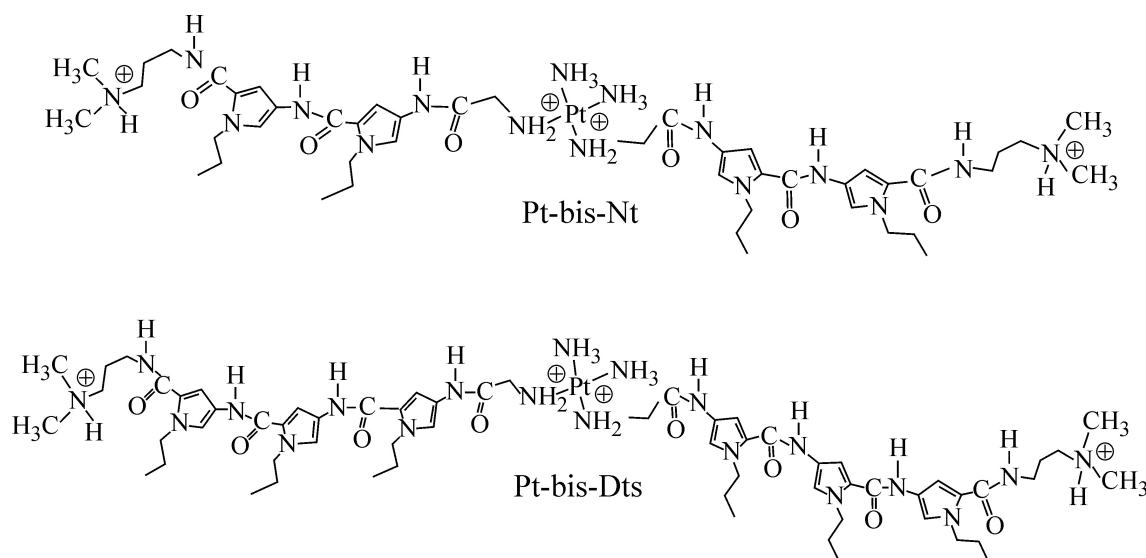


Рис. 1. Химическая структура димерных аналогов нетропсина и дистамицина Pt-bis-Nt и Pt-bis-Dst.

препятствует образованию водородных связей между карбоксамидными группами антибиотика и N3-атомами гуанина.

Несмотря на выраженные противоопухолевые свойства, эти антибиотики не нашли применения в клинической практике из-за высокой токсичности, обусловленной недостаточной высокой избирательностью связывания. Одним из путей увеличения специфичности связывания является синтез димерных соединений (бис-нетропсинов и бис-дистамицинов), в которых аналоги антибиотиков соединены ковалентно в различных ориентациях.

В нашей лаборатории были синтезированы и исследованы несколько димерных производных. Одними из самых удачных оказались аналоги Pt-bis-Dst и Pt-bis-Nt, в которых дистамициновые и нетропсиновые фрагменты соединены в ориентации хвост-к-хвосту с помощью остатка глицинированной *cis*-диаминоплатины. Все синтетические аналоги также содержали N-пропилпиррольные остатки вместо N-метилпиррольных остатков в природных антибиотиках.

Исследования методом ДНК-азного футпринтинга показали, что такие ковалентно-связанные димерные аналоги обладают значительно большей избирательностью связывания, чем мономеры [8–11].

Pt-bis-Dst и Pt-bis-Nt преимущественно связываются с последовательностями 3'-TTTТАААА-5'. Этот эффект наблюдается уже при концентрации димерных аналогов, равной 10^{-7} М [9,10]. В настоящей работе с помощью спектроскопии кругового дихроизма было ис-

следовано взаимодействие Pt-bis-Dst с поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)], поли(dA)-поли(dT) и дуплексом O₂₃, который присутствует в начале репликации вируса герпеса OriS. Ранее было показано, что Pt-bis-Nt – аналог Pt-bis-Dst, связывается с протяженными кластерами АТ-пар в полностью растянутой конформации с помощью двух нетропсиновых фрагментов, а также в форме шпильки с параллельной укладкой двух нетропсиновых фрагментов в узкой бороздке ДНК [12–14].

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Лиганды. Химические структуры бис-нетропсина и бис-дистамицина, в которых два нетропсиноподобных и дистамициноподобных фрагмента соединены в ориентации хвост-к-хвосту с помощью остатка *cis*-диаминоплатины (II) (Pt-bis-Nt и Pt-bis-Dst), представлены на рис. 1. Все синтетические аналоги содержали N-метилпиррольные остатки вместо N-пропилпиррольных, присутствующих в антибиотиках нетропсине и дистамицине. Pt-bis-Dst был синтезирован в соответствии с процедурой, описанной в работе [15]. Концентрацию бис-дистамицина определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции при длине волны 297 нм, равный $60000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Олигонуклеотиды, дуплексы и полинуклеотиды. Олигонуклеотиды синтезированы с использованием автоматического синтезатора (Applied Biosystems, США) на основе фосфорамидитной химии. Использованы следующие олигонуклеотидные дуплексы – декамер O₁₀

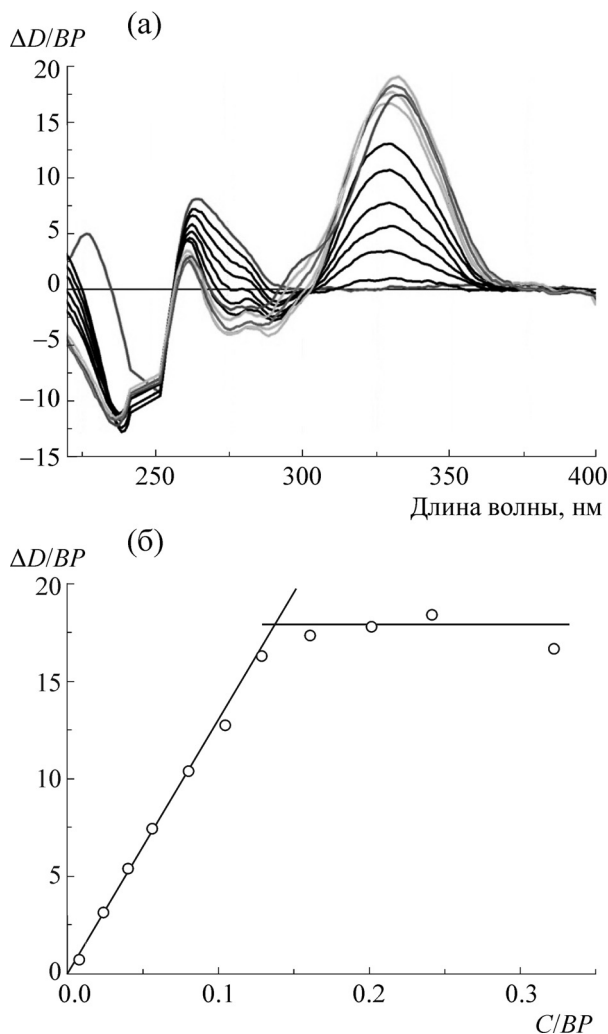


Рис. 2. Спектры кругового дихроизма (а) и кривая титрования при $\lambda = 330$ нм для комплексов Pt-bis-Dst с поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)] (б). $\Delta D'/BP$ – амплитуда кругового дихроизма, измеренная при длине волны λ (нм) и рассчитанная на моль пар оснований и 1 см оптического пути; C/BP – отношение концентрации лиганда к концентрации пар оснований.

(структуры (1) и (2)) и 23-х членный дуплекс O_{23} (структуры (3) и (4)):



Молярные концентрации полинуклеотидов определяли путем измерения оптической плотности при длине волны 260 нм и температуре

25°C, используя коэффициенты молярной экстинкции $12000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для поли(dA)-поли(dT) и $13500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)].

Молярные концентрации олигонуклеотидов определяли путем измерения оптической плотности олигонуклеотидов при длине волны 260 нм и температуре 90°C, используя коэффициенты молярной экстинкции $88100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для олигонуклеотида (1), $111700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для олигонуклеотида (2), 271600 для олигонуклеотида (3) и 267200 для олигонуклеотида (4). Для образования дуплексов, содержащих олигонуклеотиды (1+2) и (3+4) комплементарные нити смешивали в эквимольных количествах, отжигали при 90°C и затем медленно охлаждали до комнатной температуры в течение 8–10 ч. Кривые плавления, полученные для дуплексов, имели только один переход из двуспирального в расплавленное состояние.

Приборы и методы. Спектры кругового дихроизма измеряли на спектрометре Jasco-720, используя кюветы с длиной оптического пути 1,0, 0,2 и 0,1 см. Спектры поглощения и кривые плавления измеряли на спектрофотометре Cary Eclipse. Все измерения, кроме отдельно указанных случаев, проводили в 0,001 М Na-какодилатном буфере (pH 7,0) в присутствии 0,1 М NaCl. Бис-дистамицин растворяли в небольшом объеме этанола (20–30 мкл), а затем переводили в упомянутый выше какодилатный буфер.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведены спектры кругового дихроизма и кривые титрования Pt-bis-Dst-ом поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)]. Для сравнения на рис. 3 приведены спектры кругового дихроизма и кривые титрования для комплексов Pt-bis-Dst с поли(dA)-поли(dT).

Наличие изодихроичной точки и положение максимума спектров кругового дихроизма для комплексов Pt-bis-Dst с поли(dA)-поли(dT) и поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)] при 330 нм свидетельствуют о присутствии мономерного типа комплекса. Видно, что связывание Pt-bis-Dst с поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)] и поли(dA)-поли(dT) достигает насыщающего уровня, если одна молекула лиганда приходится примерно на восемь пар оснований. При дальнейшем увеличении отношения добавленного лиганда к парам оснований в спектрах кругового дихроизма комплексов с поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)] наблюдаются спектральные изменения: максимум длинноволновой полосы смещается в сторону больших длин волн, в то время как в области 290–310 нм амплитуда кругового дихроизма

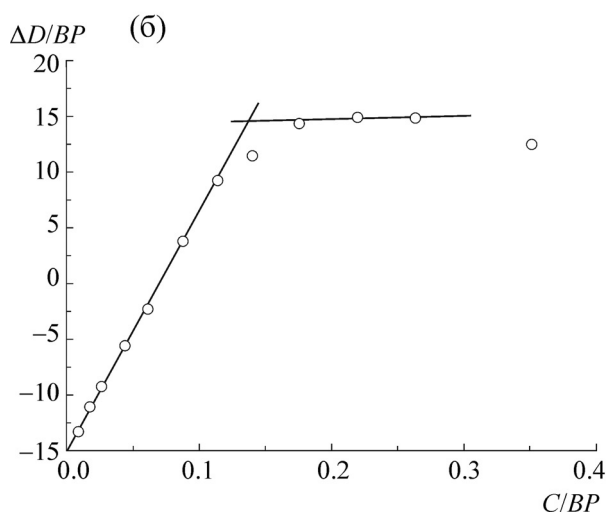
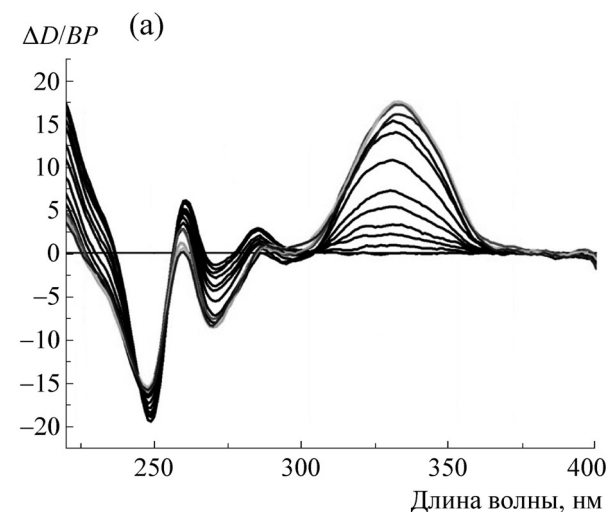


Рис. 3. Спектры кругового дихроизма (а) и кривая титрования для связывания Pt-bis-Dst с поли(dA)-поли(dT) (б). [Pt-bis-Dst] = $1,91 \cdot 10^{-4}$ М; [поли(dA)-поли(dT)] = $7,24 \cdot 10^{-5}$ М. $\Delta D/BP$ – амплитуда кругового дихроизма, рассчитанная на моль пар оснований полимера и 1 см оптического пути; C/BP – отношение концентрации лиганда к концентрации пар оснований

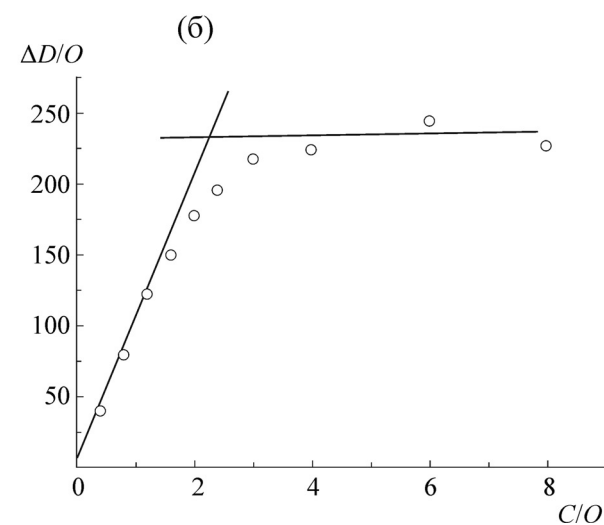
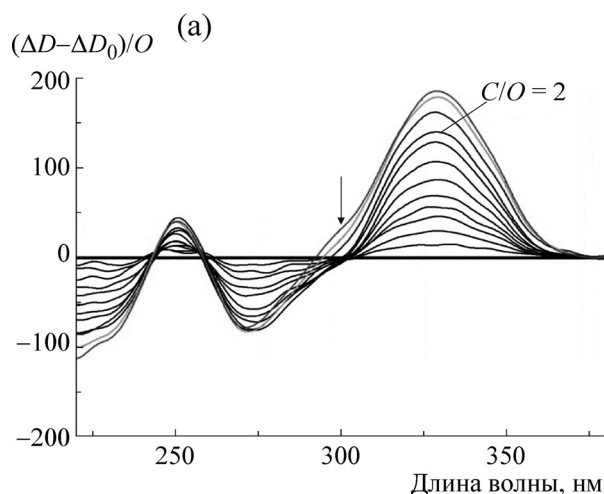


Рис. 4. Спектры кругового дихроизма и кривая титрования растворов Pt-bis-Dst с O_{23} . $[O_{23}] = 1,3 \cdot 10^{-6}$ М; исходная концентрация [Pt-bis-Dst] = $1,5 \cdot 10^{-4}$ М; длина оптического пути $L = 1$ см. $\Delta D/O$ – амплитуда кругового дихроизма, измеренная при длине волны 330 нм, рассчитанная на моль дуплекса и 1 см оптического пути; C/O – отношение концентрации лиганда к концентрации дуплекса.

увеличивается и появляется «плечо», которое отсутствовало в спектрах комплексов, полученных при низких заполнениях полимера лигандом. Эти спектральные изменения свидетельствуют об образовании второго типа комплекса между Pt-bis-Dst и поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)]. Полученные результаты согласуются с тем, что Pt-bis-Dst при низких заполнениях связывается в полностью растянутой конформации с помощью двух дистамициновых фрагментов, каждый из которых занимает примерно четыре АТ-пары оснований и вносит одинаковый вклад в величину молярного дихроизма. При высоких отношениях C/BP ($C/BP > 0,13$) Pt-bis-Dst может связываться с поли [d(A-T)]-поли[d(A-T)] в фор-

ме шпильки или может образовывать димерный комплекс за счет ассоциации дистамициновых фрагментов двух молекул бис-дистамицина, связанных на соседних перекрывающихся связывающих местах. Предполагается, что дистамициновые фрагменты образуют сэндвичи в узком желобе ДНК. Их структура стабилизируется взаимодействиями между пирролкарбоксамидными фрагментами двух дистамициновых половинок. Мы предполагаем, что стэкинг-взаимодействия ответственны за наблюдаемые спектральные изменения при образовании комплекса второго типа между Pt-bis-Dst и поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)].

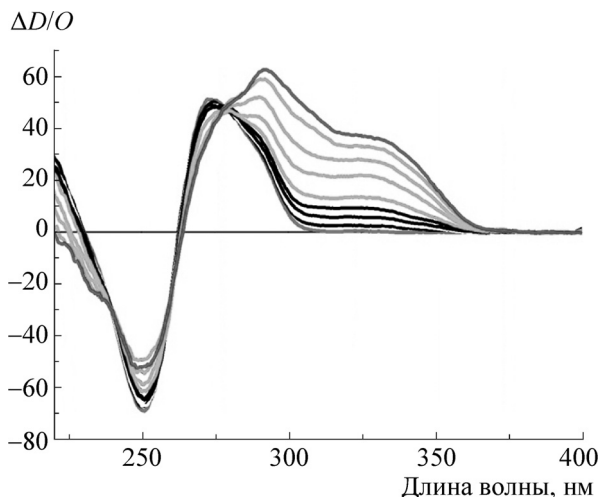


Рис. 5. Спектры кругового дихроизма растворов Pt-bis-Dst с 10-мерным дуплексом. $[O_{10}] = 6 \cdot 10^{-5}$ М, исходная концентрация $[Pt-bis-Dst] = 2,2 \cdot 10^{-4}$ М, длина оптического пути $L = 1$ см. $\Delta D/O_{10}$ – амплитуда кругового дихроизма, измеренная при конкретной длине волны и рассчитанная на моль дуплекса и 1 см оптического пути.

Эти спектральные изменения являются менее ярко выраженными при связывании Pt-bis-Dst с поли(dA)-поли(dT) (рис. 4), что, вероятно, отражает тот факт, что в этом случае условия для образования второго типа комплекса являются неблагоприятными из-за недостаточной ширины узкого желоба в гомополимере.

На рис. 4 представлены спектры кругового дихроизма комплекса Pt-bis-Dst с дуплексом O_{23} .

Из рис. 4 видно, что связывание Pt-bis-Dst с дуплексом достигает насыщения, если примерно две молекулы лиганда приходятся на дуплекс, содержащий кластер из 18 АТ-пар. Это согласуется с тем, что молекула Pt-bis-Dst занимает при связывании восемь-девять пар оснований. При увеличении C/O ($C/O > 2$) спектры кругового дихроизма претерпевают концентрационно-зависимые изменения, которые соответствуют образованию второго типа комплекса между Pt-bis-Dst и дуплексом O_{23} . Эти изменения аналогичны тем, которые уже были описаны для связывания Pt-bis-Dst с поли[d(A-T)]-поли[d(A-T)]. Мы предполагаем, что второй тип комплекса соответствует связыванию Pt-bis-Dst с дуплексом в форме шпильки с параллельной укладкой двух дистамициновых фрагментов в узком желобе ДНК или соответствует образованию димерного типа комплекса за счет ассоциации дистамициновых фрагментов двух молекул Pt-bis-Dst, связанных на соседних перекрывающихся связывающих местах. Стэкинг-

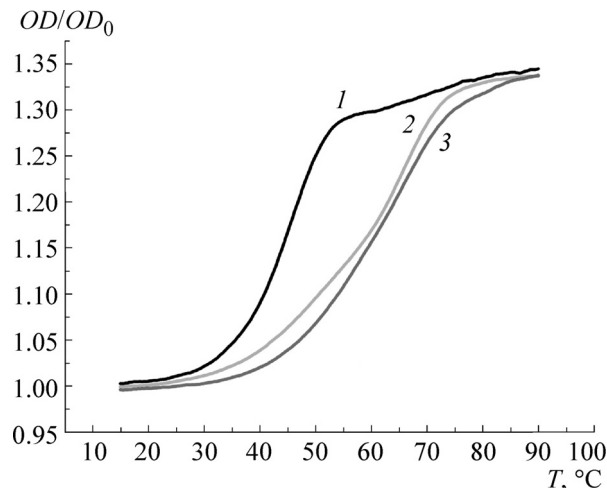


Рис. 6. Кривые плавления для: 1 – нативного дуплекса O_{23} ($T = 46^\circ\text{C}$), 2 – 1:1 комплекса O_{23} с Pt-bis-Nt ($T = 65^\circ\text{C}$), 3 – 1:1 комплекса O_{23} с Pt-bis-Dst ($T = 64^\circ\text{C}$). Повышение температуры плавления свидетельствует о том, что Pt-bis-Dst и Pt-bis-Nt стабилизируют структуру АТ-кластера. Раскрытие АТ-пар необходимо для начала инициации репликации вирусной ДНК с помощью хеликазы UL9 и вирусного белка ICP8. Этим можно объяснить противовирусное действие Pt-bis-Dst и Pt-bis-Nt.

взаимодействия между пирролкарбоксамидными звеньями двух дистамициновых половинок, образующих ассоциат, ответственны за наблюдаемые концентрационно-зависимые изменения в спектрах кругового дихроизма комплексов Pt-bis-Dst с дуплексом O_{23} и поли [d(A-T)]-поли [d(A-T)].

В связи с наблюдаемыми концентрационно-зависимыми изменениями вызывает интерес взаимодействие Pt-bis-Dst с ДНК-дуплексами, в которых размер АТ-кластера значительно уменьшен. На рис. 5 представлен спектр кругового дихроизма комплексов Pt-bis-Dst с 10-мерным дуплексом 5'-ССТАТАТАСС-3'.

Наличие изодихроичной точки и максимумов спектров кругового дихроизма для комплексов Pt-bis-Dst с 5'-ССТАТАТАСС-3' при 290 нм и 330 нм соответственно свидетельствует о присутствии двух типов комплекса.

Ранее было показано, что Pt-bis-Nt – аналог Pt-bis-Dst – связывается с протяженными кластерами АТ-пар в полностью растянутой конформации с помощью двух нетропсиновых фрагментов и в форме шпильки с параллельной укладкой двух нетропсиновых фрагментов в узкой бороздке ДНК. Что касается связывания ассоциатов, то этим процессом можно пренебречь из-за электростатического отталкивания

между платиновой группой и заряженными концевыми группами молекулы бис-нетропсина.

На рис. 6 представлены кривые плавления для нативного дуплекса O_{23} , для его комплексов с Pt-bis-Dst и Pt-bis-Nt и соответствующие температуры.

Испытания противовирусной активности Pt-bis-Dst показали, что: 1) концентрация IC_{50} при которой цитопатический эффект, вызываемый вирусом герпеса в культуре клеток Vero E6 уменьшается в два раза, равна 1,5 мкг/мл (5 мкг/мл для Pt-bis-Nt и Nt); 2) индекс селективности противовирусного действия равен 65 (59 для Pt-bis-Nt и 7,5 для Nt при относительно невысокой цитотоксичности); концентрация Pt-bis-Dst, при которой погибает примерно половина клеток, равна 100 мкг/мл (297 мкг/мл для Pt-bis-Nt и 37,5 мкг/мл для Nt).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе исследована ДНК-связывающая и противовирусная активности димерного аналога антибиотика дистамицина (Pt-bis-Dst). Согласно данным ДНКазного футпринтинга Pt-bis-Dst и его аналог Pt-bis-Nt избирательно связываются с участками ДНК с последовательностью 5'-ТТТТАААА-3' и обладают в пять раз меньшим сродством к участкам с последовательностью 5'-ААААТТТТ-3'. Показано, что оба синтетических полиамида образуют прочные комплексы с фрагментами ДНК, содержащими начало репликации вируса герпеса. Pt-bis-Dst образует два типа комплекса с дуплексом O_{23} (23 пары оснований), присутствующим в начале репликации OriS вируса герпеса и содержащим кластер из 18 АТ-пар оснований. Pt-bis-Dst связывается с этим дуплексом в полностью растянутой конформации с помощью двух дистамициновых фрагментов и занимает при связывании восемь-девять пар оснований. Этот тип комплекса достигает насыщения, если две молекулы Pt-bis-Dst связаны с дуплексом. Pt-bis-Dst может также связываться с дуплексом в форме шпильки с параллельной укладкой двух дистамициновых фрагментов в узкой бороздке ДНК. При связывании в форме шпильки Pt-bis-Dst занимает примерно пять пар оснований.

Противовирусная активность бис-нетропсина коррелирует с их способностью избирательно связываться с (А+Т)-кластером в OriS. Связывание приводит к увеличению температуры плавления (А+Т)-кластера примерно на 19°C. Это препятствует раскрытию АТ-пар оснований, вызванных термическими флуктуациями, что приводит к подавлению инициации репликации вирусной ДНК, которую катализирует хеликаза UL9 вируса герпеса.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-01269-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ch. Zimmer and U. Wahnert, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **47**, 31 (1986).
2. Ch. Bailly and B. Chairs, *Bioconjugate Chemistry* **9**, 513 (1998).
3. M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1376 (1985).
4. M. Coll, C. A. Frederick, A. H.-J. Wang, and A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8385 (1987).
5. L. Taberero, N. Verdager, M. Coll, et al., *Biochemistry* **32**, 8403 (1993).
6. R. E. Klevit, D. E. Wemmer, and B. R. Reid, *Biochemistry* **25**, 3296 (1986).
7. J. G. Pelton, D. E. Wemmer, and B. R. Reid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5723 (1986).
8. G. V. Gursky, A. S. Zasedatelev, A. L. Zhuze, et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **47**, 367 (1983).
9. A. A. Khorlin, A. S. Krylov, S. L. Grokhovsky, et al., *FEBS Lett.* **118**, 311 (1980).
10. S. L. Grokhovsky and V. E. Zubarev, *Nucl. Acids Res.* **19**, 257 (1990).
11. V. A. Nikolaev, S. L. Grokhovsky, A. N. Surovaya, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **14**, 31 (1996).
12. S. L. Grokhovsky, A. N. Surovaya, G. Burkhardt, et al., *FEBS Lett.* **439**, 346 (1998).
13. A. N. Surovaya, G. Burkhardt, S. L. Grokhovsky, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **14**, 595 (1997).
14. A. N. Surovaya, G. Burkhardt, S. L. Grokhovsky, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **18**, 689 (2001).
15. Г. В. Гроховский, А. Л. Жузе, и Б. П. Готтих, *Биоорг. химия* **18**, 570 (1992).
16. A. N. Surovaya, S. L. Grokhovsky, N. P. Bazhulina, and G. V. Gursky, *Biophysics* **53** (5), 344 (2008).

Interaction of Distamycin Dimeric Analog with Poly(dA)·poly(dT), Poly[d(A-T)]·poly[d(A-T)] and Duplex O₂₃ at Origin of Replication of the Herpes Simplex Virus

A.N. Surovaya*, N.P. Bazhulina*, S.Yu. Lepehina*, V.L. Andronova* **, G.A. Galegov**, E.D. Moiseeva*, S.L. Grokhovsky*, and G.V. Gursky*

*Engelhard Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

**Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Gamalei 16, Moscow, 123098 Russia

The binding of distamycin dimeric analog (Pt-bis-Dst) to poly[d(A-T)]·poly[d(A-T)], poly(dA)·poly(dT) and duplex O₂₃ with the sequence 5'-GCCAATATATATATATTATTAGG-3' which is present at the origin of replication of herpes simplex virus OriS is investigated with the use of UV and CD spectroscopy. The distinction of the synthetic polyamide from a natural antibiotic lies in the fact that in the synthetic polyamide there are two distamycin moieties bound via a glycine *cis*-diamino platinum group. It was shown that the binding of Pt-bis-Dst to poly[d(A-T)]·poly[d(A-T)] and poly(dA)·poly(dT) reaches saturation if one molecule of the ligand occurs at approximately every 8 bp. With further increase in the ratio of the added ligand to the base pairs in CD spectra of complexes with poly[d(A-T)]·poly[d(A-T)], we observed that the maximum wavelength band tend to be shifted towards longer wavelengths, while in the spectral region of 290–310 nm a “shoulder”, that was absent in the spectra of the complexes obtained at low polymer coverages by the ligand, appeared. At high molar concentration ratios of ligand to oligonucleotide Pt-bis-Dst can bind to poly[d(A-T)]·poly[d(A-T)] in the form of hairpins or may form associates by the interaction between the distamycin moieties of neighboring molecules of Pt-bis-Dst. The structure of the complexes is stabilized by interactions between pirrolcarboxamide moieties of two molecules of Pt-bis-Dst adsorbed on adjacent overlapping binding sites. These interactions are probably also responsible for the concentration-dependent spectral changes observed during the formation of a complex between Pt-bis-Dst and poly[d(A-T)]·poly[d(A-T)]. Spectral changes are almost absent in binding of Pt-bis-Dst to poly(dA)·poly(dT). Binding of Pt-bis-Dst to duplex O₂₃ reaches saturation if two ligand molecules occur in a duplex that contains a cluster of 18 AT pairs. With increasing the molar concentration ratio of the ligand to the duplex CD spectra undergo concentration-dependent changes similar to those observed during binding of Pt-bis-Dst to poly[d(A-T)]·poly[d(A-T)]. Testing for antiviral efficacy of Pt-bis-Dst showed that the concentration, at which the cytopathic effect produced by the herpes simplex virus in cell culture Vero E6 halved, is equal to 1.5 µg/ml and the selectivity index for evaluating antiviral activity is 65 at a relatively low cytotoxicity. The concentration of Pt-bis-Dst, at which approximately half the cells are killed, is equal to 100 µg/ml.

Key words: dimeric derivatives of distamycin, synthetic oligonucleotides, UV and CD spectroscopy, antiviral activity