

Received: 2005.02.11  
Accepted: 2005.05.17  
Published: 2005.06.15

## Zależność aktywności biologicznej aktynomycyn od ich budowy chemicznej na przykładzie modyfikacji struktury aktynomycyny D

### Modifications of actinomycin D structure as example of actinomycins structure-activity relationship

**Marcin Koba**

Katedra i Zakład Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

#### Streszczenie

Aktynomycyny są znanymi antybiotykami wykazującymi dużą aktywność przeciwbakteryjną oraz przeciwnowotworową i już od ponad 60 lat są przedmiotem badań naukowych. Aktynomycyny, ze względu na dużą toksyczność nie znalazły szerszego chemioterapeutycznego zastosowania w leczeniu chorób pochodzenia bakteryjnego i grzybowego. Niemniej jednak, najbardziej znana z aktynomycyn – aktynomycyna D została wprowadzona do praktyki klinicznej jako lek przeciwnowotworowy. Stała się również, obok 7-aminoaktynomycyny D użytecznym narzędziem stosowanym w biochemii i biologii molekularnej. Bardzo dobrze poznano izolację, produkcję i chemię, a także biologiczne i kliniczne zastosowanie aktynomycyn. Wyizolowano i zsyntetyzowano wiele pochodnych aktynomycyn, różniących się zarówno budową chemiczną jak i aktywnością biologiczną, a ich modyfikacje dotyczyły nie tylko części chromoforowej, którą stanowi pierścień fenoksazonu, ale również i części peptydowej, która składa się z dwóch cyklicznych pięciopetydowych układów laktonowych. Modyfikacje chromoforu dotyczyły głównie grupy aminowej w pozycji 2 i atomu węgla w pozycji 7, ale i także modyfikacji pozycji 4, 6 i 8 pierścienia fenoksazonowego aktynomycyn. Modyfikacje w układzie peptydowym, dotyczyły głównie zmian aminokwasów w różnych pozycjach cyklicznego łańcucha peptydowego, zsyntetyzowano również pochodne aktynomycyn z otwartymi pierścieniami laktonowymi. Pozwoliło to na wyłonienie tych elementów w strukturze aktynomycyn, które są odpowiedzialne za ich aktywność biologiczną, co jest istotną informacją dla poznania mechanizmów działania tej grupy związków, a także jest bardzo ważne w aspekcie badania mechanizmów działania innych aktywnych biologicznie związków oraz projektowania nowych i skuteczniejszych chemioterapeutyków.

**Słowa kluczowe:**

**aktynomycyny • zależność struktura-aktywność • antybiotyki**

#### Summary

For over 60 years, actinomycins, well-known antibacterial and anticancer antibiotics, have been the subject of the scientific research. These compounds exhibit high toxicity and therefore are not widely used in the chemotherapeutic treatment of antibacterial and antifungal diseases. However, actinomycin D, the best-known compound from the actinomycin group, has been introduced into clinical practice as an anticancer drug. Actinomycin D, together with 7-amino-actinomycin D, also became a useful tool in biochemistry and molecular biology. The isolation, production, chemistry, and biological and clinical use of the actinomycins have been thoroughly investigated. Many derivatives of actinomycins, differing in chemical structure as well as biological activi-

ty, have been isolated and synthesized and their modifications involved not only the chromophoric phenoxazone ring, but also two cyclic pentapeptide lacton rings. Modifications of the actinomycins' chromophore mainly concerned introducing an amino group in position 2 and a carbon atom in position 7, but also modifications in positions 4, 6, and 8 of the phenoxazone ring. The actinomycin peptide moiety was mainly modified by replacement of amino acids in the pentapeptide rings and also by the synthesis of actinomycin derivatives with open peptide lacton rings. These modifications enabled separating the elements in the actinomycin structure which are responsible for the biological activity of these compounds. That was key information for recognizing the performance of these compounds, and an important way of planning effective new chemotherapeutics.

**Key words:** actinomycins • structure-activity relationship • antibiotics

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_59/7627.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7627.pdf)

**Word count:** 2081

**Tables:** –

**Figures:** 3

**References:** 47

**Adres autora:** dr Marcin Koba, Katedra i Zakład Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Jagiellońska 13, 85-067 Bydgoszcz; e-mail: kobamar@wp.pl

## 1. WPROWADZENIE

Aktynomycyny są toksycznymi antybiotykami, będącymi metabolicznymi produktami promieniowców z rodzaju *Streptomyces*. Odkryte zostały przez Waksmana i Woodruffa w roku 1940 w kulturach *Actinomyces antibioticus*. Bardzo dobrze poznano, izolację, produkcję i chemię, a także biologiczne i kliniczne zastosowanie aktynomycyn, głównie aktynomycyn C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, a przede wszystkim aktynomycyn D, określanej także jako aktynomycyna C<sub>1</sub> lub dactinomycin [9,11,18].

Aktynomycyny, podobnie jak penicyliny, hamują rozwój bakterii Gram-dodatnich m.in. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, czy *Sarcina lutea*, w stężeniach poniżej 0,1 µg/ml. Na drobnoustroje Gram-ujemne, tj. *Escherichia coli* czy *Salmonella typhi*, aktynomycyny działają znacznie słabiej, bo w stężeniu 10–200 µg/ml. Aktynomycyny wywierają również silne działanie przeciwrzybicze, w stężeniu 0,2–2 µg/ml. Jednakże, ze względu na dużą toksyczność, związki nie znalazły szerszego chemioterapeutycznego zastosowania w leczeniu chorób pochodzenia bakteryjnego i grzybowego. Niemniej jednak, w roku 1954 wprowadzono aktynomycynę D do leczenia klinicznego jako lek przeciwnowotworowy [9,11,18].

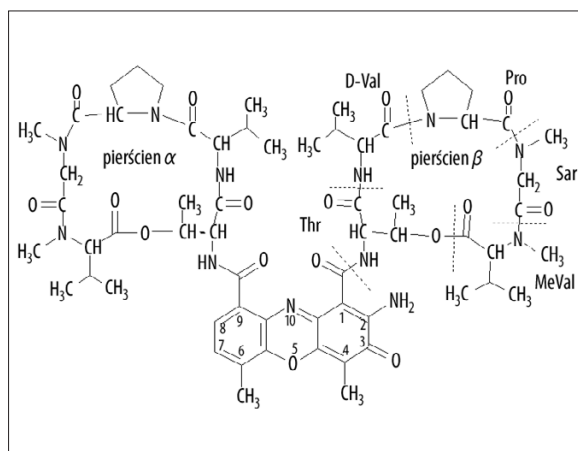
## 2. STRUKTURA I NAZEWNICTWO AKTYNOMYCYN

Struktura aktynomycyn określona została przez Brockmanna [4] w 1949 roku. Aktynomycyny zawierają heterotrójcykliczny układ chromoforowy (kwas 2-amino-4,6-dwumetylofenoksazyń(3)on-1,9-dwukarboksylowy), nazywany pierścieniem fenoksazonowym, który jest odpowiedzialny za barwę aktynomycyn, od żółtej do czerwonej oraz za możliwość oddziaływania z DNA. Poprzez karboksylowy atom węgla do pierścienia fenoksazonu dołączone są dwa cykliczne łańcuchy pięciopeptydowe. W przypadku natu-

ralnych analogów aktynomycyn, pierwszym aminokwasem łańcucha peptydowego jest zawsze L-treonina, której grupa hydroksylowa tworzy ugrupowanie laktonowe z węglem karboksylowym w piątym aminokwasie łańcucha peptydowego. Drugim aminokwasem łańcucha peptydowego może być D-walina lub D-izoleucyna. Trzecim L-prolina lub L-γ-hydroksypolina, L-γ-ketoprolina lub sarkozyna. Czwartym jest zawsze sarkozyna, a piątym może być L-metylowalina lub L-metyloizoleucyna. Naturalne analogi aktynomycyn różnią się zatem aminokwasami w ich części peptydowej, która determinuje rozpuszczalność i siłę wiązania do DNA oraz aktywność biologiczną takiego analogu. Pierścień fenoksazonowy pozostaje niezmienny [4,9,11,18].

W przypadku aktynomycyny D (ryc. 1), cząsteczka jej składa się z dwóch identycznych cyklicznych łańcuchów pięciopeptydowych α i β związanych z pierścieniem fenoksazonowym, a łańcuch polipeptydowy tworzą kolejno następujące aminokwasy: L-treonina (Thr), D-walina (D-Val), L-prolina (Pro), sarkozyna (Sar), L-metylowalina (MeVal). Grupa hydroksylowa L-treoniny bierze udział w wiązaniu estrowym z karboksylową grupą L-metylowaliny tworząc pierścień laktonowy [4,8,11].

Brockmann zaproponował również nazewnictwo aktynomycyn i ich pochodnych, które zalecane jest przez IUPAC. Wszystkie aktynomycyny traktowane są jako analogi jednej z dwóch aktynomycyn, dwu-(D-izoleucyno)-aktynomycyny (C<sub>3</sub>, VII) lub dwu-(D-walino)-aktynomycyny (C<sub>1</sub>, D, IV), zgodnie ze zmianą struktury w ich części peptydowej. Pierścień benzoidowy chromoforu aktynomycyny D oznaczono jako pierścień α, a chinoidowy jako pierścień β, a zatem lakton peptydowy przyłączony w pozycji 9 chromoforu aktynomycyny D nazywany jest laktonem α, a w pozycji 1 chromoforu laktonem β. Pozycję aminokwasu w łańcuchu peptydowym oznaczono cyfrą arabską



Ryc. 1. Wzór aktynomycyny D

z symbolem prim. Zgodnie z powyższą nomenklaturą nazwa aktynomycyny D będzie brzmiała dwu-(2'-D-walino)-aktynomycyna, a dla aktynomycyn zawierających dwa różne łańcuchy peptydowe, np. dla aktynomycyny C<sub>2</sub>, w której D-walina w drugim aminokwasie β pierścienia zastąpiona jest D-izoleucyną nazwa będzie brzmiała [α(2'-D-walino)-β(2'-izoleucyno)]-aktynomycyna [4,11].

### 3. ZALEŻNOŚĆ AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ AKTYNOMYCYN OD ICH BUDOWY

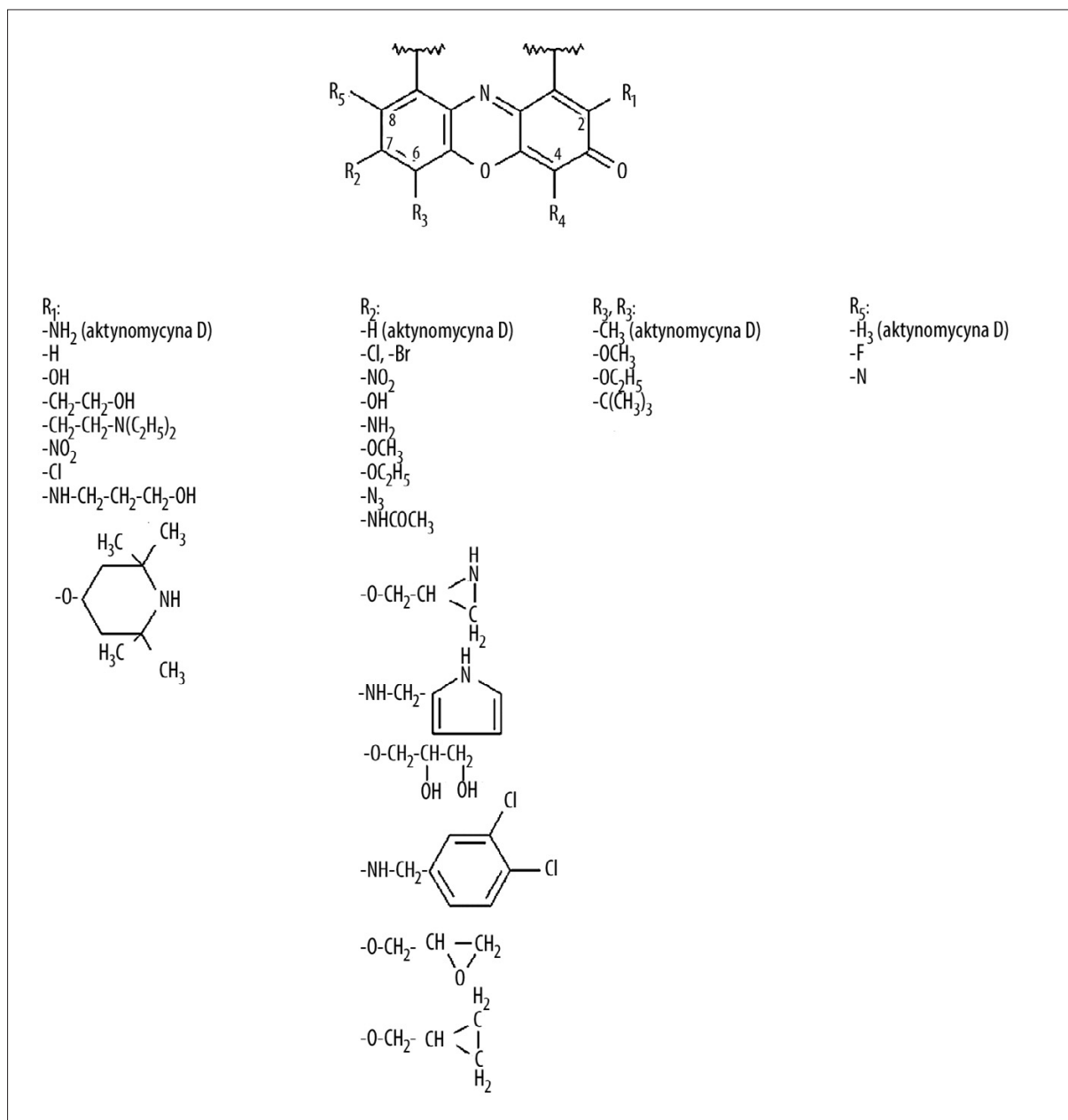
#### 3.1. Aktynomycyny modyfikowane w chromoforze

Pierwsze modyfikacje chromoforu (ryc. 2) dotyczyły głównie grupy aminowej w pozycji 2 części benzoidowej i atomu węgla w pozycji 7 części chinoidowej pierścienia fenoksazonowego aktynomycyn C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub>. Brak lub zamiana grupy aminowej w pozycji 2 chromoforu aktynomycyny D na grupę hydroksylową, dwuetyloaminoetylową, hydroksyetylową, nitrową albo chlor daje pochodne, które wykazują 10–15% aktywności wyjściowej aktynomycyny lub podobnie jak pochodne acylowe i dwualkilowe są nieaktywne [11,18,28,47]. Natomiast pochodna z grupą hydroksypropyloaminową w pozycji C<sub>2</sub> chromoforu, wykazuje aktywność przeciwnowotworową podobną do aktynomycyny D [28,47]. Inne modyfikacje grupy aminowej w pozycji 2 chromoforu, to podstawienie jednego z wodorów podstawnikami z ugrupowaniem 4-(2,2,6,6-cztery-metylo-1-piperidynoksylowym) zawierającym rodnik nitrowy, co dało pochodne o mniejszym niż aktynomycyna D powinowactwie do DNA, ale większej aktywności przeciwnowotworowej [38,39]. Modyfikacjom nie poddawano pozycji 3 chromoforu aktynomycyn. Grupa karbonylowa, pozostaje niezmienną jako główna i niezbędna część ugrupowania chinoidowego, a redukcja tego ugrupowania prowadzi do całkowitej utraty aktywności aktynomycyn. Modyfikacje w pozycji 7 chromoforu dotyczyły podstawienia bromem, chlorem lub grupą nitrową, co dało pochodne o około 50% wyższej aktywności przeciwbakteryjnej w stosunku do aktynomycyn niepodstawionych w tej pozycji [11,18].

Natomiast wprowadzenie grupy hydroksylowej lub aminowej przy węglu C<sub>7</sub>, dało pochodne o mniejszej aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej [11,18,20,35]. Niemniej jednak 7-aminoaktynomycyna D [5,34], ze

względu na własności fluorescencyjne i silne oddziaływanie z DNA, znalazła zastosowanie jako narzędzie w badaniach cytochemicznych [8], cytometrycznych [15,25,41,46], m.in. przy określaniu apoptozy [24] czy w mikroskopii fluorescencyjnej [40] w o wiele większym stopniu niż aktynomycyna D [6,45]. Pochodne aktynomycyny z bardziej rozbudowanym podstawnikiem w pozycji C<sub>7</sub> chromoforu, np. grupą acetaminową, zgodnie z wynikami Mullera i Crothersa [23] wykazują znaczny spadek powinowactwa do DNA i aktywności biologicznej lub są biologicznie nieaktywne [16]. Jednakże, pochodne z ugrupowaniem 2-pyrometiloaminowym lub 3,4-dwuchlorobenzylaminowym w pozycji 7 chromoforu, oddziałują z DNA lepiej lub podobnie jak aktynomycyna D [3]. Jest to związane z elastycznością ugrupowania –NHCH<sub>2</sub>–, co daje możliwość ułożenia się podstawnika w dużym rowku helisy DNA i oddziaływania z resztami fosforanowymi. Podstawienie natomiast grupą metoksyową, etoksyową lub n-propyloksyową w pozycji 7 chromoforu, daje pochodne o niezmiennych lub nieznacznie lepszych właściwościach przeciwnowotworowych od aktynomycyny D [28], gdzie pochodne 2,3-dwuhydroksypropyloksy i 2,3-epoksypropyloksy 7-podstawionej aktynomycyny D, wykazują zdecydowanie korzystniejsze właściwości przeciwnowotworowe i indeks terapeutyczny niż aktynomycyna D [27]. 7-(2,3-epoksypropyloksy)aktynomycyna D tworzy dwa enancjomery R-(+) i S-(-), których duża aktywność cytotoksyczna zarówno przeciw białaczkom, jak i nowotworom litym jest związana z tworzeniem przez te związki kowalencyjnych adduktów z deoksyguanozyną [29,33]. Natomiast pochodne z grupą (2-cyklopropylo)metoksyową i (2-azyrydyno)metoksyową, wykazują aktywność cytotoksyczną poniżej 25% aktywności aktynomycyny D [26]. Kolejne modyfikacje w pozycji 7 chromoforu, dały 7-azydoaktynomycynę D z fotoreaktywnym ugrupowaniem azydowym, które w wyniku fotolizy może tworzyć kowalencyjne wiązanie z DNA [10]. Pochodne zmodyfikowane w pozycji 4 i 6 chromoforu, np. 4,6-dwumetoksy- lub 4,6-dwuetylo- charakteryzują się małą aktywnością biologiczną, a analog 4,6-dwu-*tert*-butylo- jest zupełnie nieaktywny [11,18]. Uzyskano ponadto pochodne aktynomycyny D, N8-aktynomycynę D lub F8-aktynomycynę D, w których część C-H w pozycji 8 chromoforu zastąpiono odpowiednio ugrupowaniem C-N lub C-F, a których zdolność hamowania syntezy RNA jest niewiele mniejsza niż aktynomycyny D. Pochodne te wykazują również bardzo unikalną aktywność przeciwko białaczkom, gdyż hamują proliferację ich komórek w 50% już przy stężeniach rzędu 1 nM, gdzie aktynomycyna D nie wykazuje takiej selektywności i zabija większość komórek przy stężeniu około 50 nM. Dodatkowo, N8-aktynomycyna D i F8-aktynomycyna D wiążą się preferencyjnie do hybryd RNA: DNA i mogą być wykorzystane jako związki hamujące aktywność retrowirusowej odwrotnej transkryptazy i hamować replikację wirusów [37,43].

Zsyntetyzowano również wiele pochodnych będących czteropierścieniowymi chromoforowymi analogami aktynomycyny D, powstałymi w wyniku przekształcenia grupy aminowej w pozycji 2 i karbonylowego tlenu w pozycji 3 w pierścieniach oksazolowy albo oksazonowy. Związki te wykazują zróżnicowaną aktywność cytotoksyczną w porównaniu z aktynomycyną D, a wiele z nich wykazuje *in vivo* większą aktywność przeciwnowotworową w stosunku do nowotworów litych i ma o wiele korzystniejszy indeks te-



Ryc. 2. Modyfikacje aktynomycyn w części chromoforowej

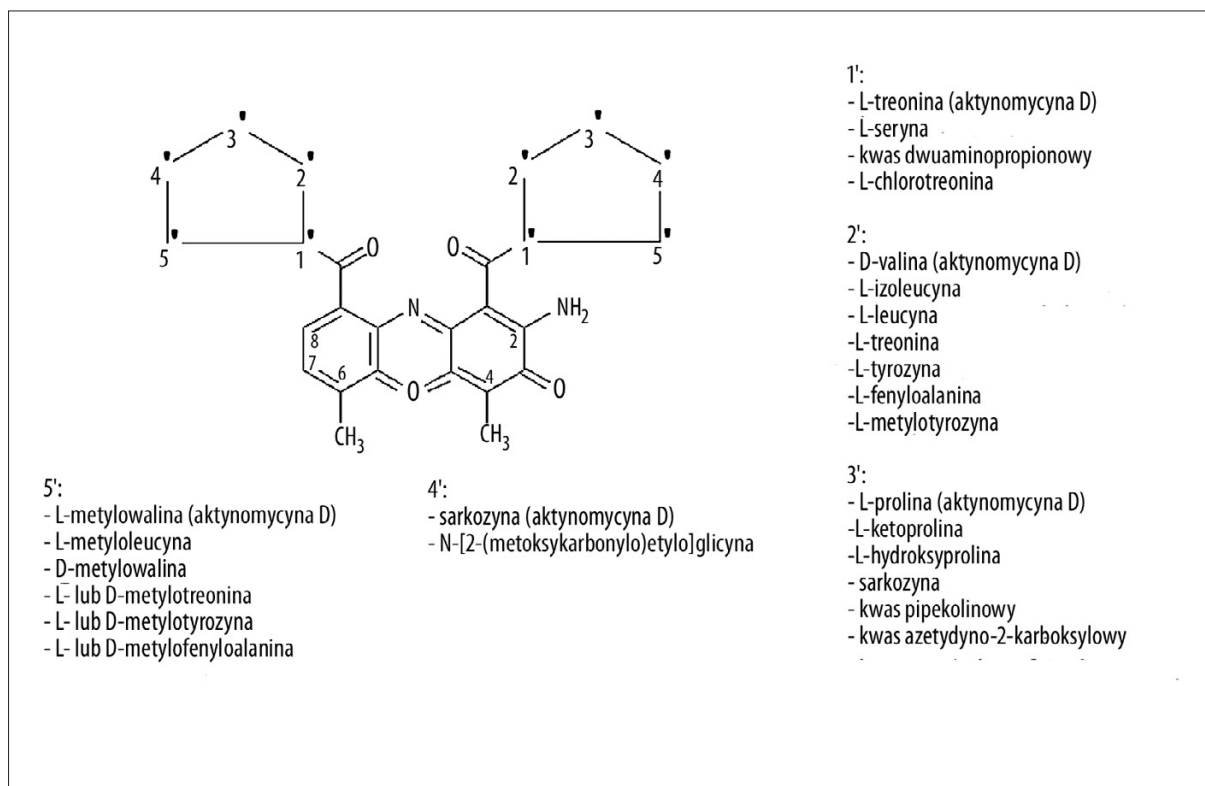
rapeutyczny od aktynomycyny D. Jest to prawdopodobnie związane z generowaniem przez te związki rodników i innym niż interkalacja sposobem oddziaływania z DNA [2,30,31,32,36].

### 3.2. Aktynomycyny modyfikowane w układzie peptydowym

Jak wiadomo, część peptydowa aktynomycyn ma wpływ na ich aktywność biologiczną, wpływając przede wszystkim na stabilizację struktury DNA oraz na właściwości hydrofilowe i hydrofobowe związku, ważne podczas transportu do komórki.

Modyfikacje w układzie peptydowym (ryc. 3), dotyczyły głównie wymiany aminokwasów w różnych pozycjach łań-

cucha peptydowego. Zastąpienie treoniny w pozycji 1 łańcucha peptydowego, seryną lub kwasem dwuaminopropionowym, spowodowało spadek aktywności antybakteryjnej takich pochodnych o 80%, w porównaniu z aktynomycyną D [11,18]. Natomiast zamiana treoniny w pierścieniu peptydowym  $\beta$  na 4-chloro-treoninę, spowodowała zwiększenie aktywności przeciwnowotworowej takich pochodnych w porównaniu z aktynomycyną D [14]. Pochodne otrzymane w wyniku zmian aminokwasu w pozycji 2 łańcucha peptydowego, wykazują większe zróżnicowanie w aktywności, np. zastąpienie waliny, izoleucyną powoduje tylko niewielki spadek aktywności aktynomycyny, podczas gdy skutkiem wprowadzenia leucyny jest spadek aktywności przeciwbakteryjnej o około 80% [11,18]. W wyniku zastąpienia waliny, treoniną, tyrozyną, fenyloalaniną czy metylotryozyną, tylko analog aktynomycyny D z fenyloalaniną



Ryc. 3. Modyfikacje aktynomycyn w części peptydowej

w pozycji 2 łańcucha peptydowego, wykazuje większą od aktynomycyny D zdolność hamowania syntezy RNA, gdy pozostałe analogi wykazują o wiele mniejszą aktywność. Jest to prawdopodobnie związane ze spadkiem rozpuszczalności w wodzie takich analogów, a tym samym spadkiem ich stężenia, a w konsekwencji obniżeniem zdolności wiązania się do DNA [7,12]. Ponadto, dwu-(2'-D-fenylalanino)-aktynomycyna selektywnie hamuje wzrost białaczek, przy stężeniu ponad 100 razy mniejszym niż wzrost innych nowotworów [42]. Wymiana aminokwasu w pozycji 3 ma zdecydowanie większy wpływ na zmiany w aktywności biologicznej, gdyż wymiana prolina na ketoprolinę powoduje wzrost aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej o 50–150%, a zastąpienie prolina przez hydroksyprolinę lub sarkozynę, znaczny spadek aktywności takich pochodnych. Redukcja ketoprolina lub estyfikacja hydroksyprolina doprowadziła natomiast, do uzyskania pochodnych o 5–10 razy mniejszej aktywności biologicznej, w porównaniu z aktynomycyną D [11,18]. Ponadto, zastąpienie prolina kwasem pipekolinowym lub kwasem azetydino-2-karboksylowym, dało pochodne o obniżonej aktywności antybakteryjnej, która nie jest skorelowana z aktywnością przeciwnowotworową [19]. Modyfikacje w pozycji 4 łańcucha peptydowego, dotyczyły zmiany sarkozyny na N-[2-(metoksykarbonylo)etylo]glicynę, co dało pochodną o mniejszej aktywności antybakteryjnej od aktynomycyny D. W wyniku zamiany metylowaliny na metyloleucynę w pozycji 5 łańcuchów peptydowych, uzyskano aktywną pochodną, która przy prawie 100 razy mniejszym stężeniu wykazywała podobną aktywność przeciwnowotworową jak aktynomycyna D [17]. Natomiast zamiana izomeru L metylowaliny na izomer D, dała pochodną, która hamuje syntezę RNA 20 razy silniej niż aktynomycyna D [44].

Kolejne modyfikacje w pozycji 5 łańcucha peptydowego aktynomycyny D, dotyczyły również zamiany L-metylowaliny na postaci L lub D metyloleucyny, metyloleucyny, metylofenylalaniny. Dało to pochodne, o wysokiej selektywności w stosunku do białaczek [42] i zróżnicowanej zdolności hamowania syntezy RNA. Spośród nich tylko pochodne z L i D metylofenylalaniną, hamują syntezę RNA o wiele mocniej od aktynomycyny D [12,44].

Pochodne aktynomycyn, w których otwarto łańcuchy laktonowe, pochodne monolaktonowe, kwasowe lub estrowe, będące izomerami pozycyjnymi w pierścieniu  $\alpha$  lub  $\beta$ , takie jak  $\alpha$ -lakton- $\beta$ -kwas,  $\beta$ -lakton- $\alpha$ -kwas czy  $\beta$ -kwas- $\alpha$ -kwas, nie mają lub wykazują niewielką aktywność przeciwbakteryjną i przeciwnowotworową. Bardzo ważną jest zatem integralność układu cyklicznego peptydów, która narzuca ich sztywną konformację przestrzenną, niezbędną do oddziaływania z DNA. Gdy oba laktony peptydowe zastąpiono monocyklicznym peptydem z antybiotyku Gramacydyna S, nie zaobserwowano oddziaływania z DNA i hamowania syntezy RNA [11,18]. Ponadto aktynomina, związek mający taki sam układ chromoforowy jak aktynomycyna D, a różniący się od niej częścią peptydową pozbawioną laktonów, w której zarówno w pozycji  $\alpha$  jak i  $\beta$  chromoforu występuje N,N-dwuetyl-etylenodwuamina, interkaluje do DNA równie mocno jak aktynomycyna D [1,13,23], ale nie wykazuje żadnej aktywności przeciwbakteryjnej [23].

Zsyntetyzowano również laktamowe pochodne aktynomycyn, w których atom tlenu zastąpiono atomem azotu, w wyniku zamiany treoniny na kwas  $\alpha$ ,  $\beta$ -dwuaminopropionowy. Takie pochodne równie silnie jak aktynomycyna D wiążą się z DNA i wykazują średnią, ale zarazem za-

dawalającą przy stosowaniu aktywność przeciwbakteryjną i niewielką aktywność przeciwnowotworową, w porównaniu z aktynomycyną D [11,18,22].

#### 4. PODSUMOWANIE

Reasumując, na aktywność biologiczną, zarówno przeciwbakteryjną, jak i przeciwnowotworową wszystkich aktynomycyn, a w tym aktynomycyny D oraz ich zdolność do wiązania się z DNA mają wpływ następujące elementy struktury:

- integralność konfiguracji izomerów aminokwasów, odpowiednio L, D, L, w pozycjach 1, 2, 5, łańcuchów peptydowych;
- obecność wolnej grupy  $-NH_2$  w pozycji 2 chromoforu. Gdy zsyntetyzowano pochodne zawierające grupy hydroksy-, chloro- lub dwumetyleno- w tej pozycji, stwierdzono brak oddziaływania z DNA i brak aktywności biologicznej takich pochodnych aktynomycyny D;

- obecność tlenu karbonylowego w pozycji 3 chromoforu i niezredukowanego układu chinoidowego jaki tworzy on z azotem w pozycji 10 pierścienia chromoforu. Redukcja tego układu powoduje całkowitą utratę aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej takich pochodnych;
- obecność pierścieni laktonowych. Hydroliza laktonów do kwasów karboksylowych uniemożliwia tworzenie fizykochemicznych kompleksów z DNA i powoduje utratę aktywności przeciwnowotworowej;
- obecność grup metylowych w pozycji 4 i 6 chromoforu, wydaje się sterycznie optymalna do oddziaływania z DNA i aktywności biologicznej. Pochodne niepodstawione w pozycji 4 i 6 chromoforu lub z większymi podstawnikami, wykazują mniejszą aktywność przeciwbakteryjną i przeciwnowotworową od aktynomycyny D lub są nieaktywne;
- podstawienia w pozycji 7 chromoforu mogą dawać pochodne o zwiększonej aktywności zarówno przeciwbakteryjnej, jak i przeciwnowotworowej.

#### PIŚMIENNICTWO

- [1] Bittman R., Blau L.: Stopped-flow kinetic studies of actinomycin binding to DNAs. *Biochemistry*, 1975; 14: 2138–2145
- [2] Bolognese A., Correale G., Manfra M., Lavecchia A., Mazzoni O., Novellino E., Barone V., Pani A., Tramontano E., La Colla P., Murgioni C., Serra I., Setzu G., Loddo R.: Antitumor agents. I. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of 5H-pyrido[3,2- $\alpha$ ]phenoxazin-5-one, a compound with potent antiproliferative activity. *J. Med. Chem.*, 2002; 45: 5205–5216
- [3] Brennan T.F., Sengupta S.K.: DNA binding studies of 7-bulky-substituted actinomycin analogues. *J. Med. Chem.*, 1983; 26: 448–451
- [4] Brockmann H.: Structural differences of the actinomycins and their derivatives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960; 89: 323–335
- [5] Chen Chiao Y.C., Gurudath Rao K., Hook J.W.3rd, Krugh T.R., Sengupta S.K.: 7-Amino-actinomycin D complexes with deoxynucleotides as model for binding of the drug to DNA. *Biopolymers*, 1979; 18: 1749–1762
- [6] Chinsky L., Turpin P.Y.: Fluorescence of actinomycin D and its DNA complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977; 475: 54–63
- [7] Chu W., Shinomiya M., Kamitori K.Y., Kamitori S.: Role of D-valine residues in the antitumor drug actinomycin D: replacement of D-valine with other D-amino acids changes the DNA binding characteristics and transcription inhibitory activities. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994; 116: 7971–7982
- [8] Gill J.E., Jotz M.M., Young S.G., Modest E.J., Sengupta S.K.: 7-Amino-actinomycin D as a cytochemical probe. I. Spectral properties. *J. Histochem. Cytochem.*, 1975; 23: 793–799
- [9] Goldberg I.H.: *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. Part II*, Springer-Verlag, Berlin, 1975: 582–592
- [10] Graves D.E., Wadkins R.M.: 7-Azidoactinomycin D: a novel probe for examining actinomycin D-DNA interactions. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 7262–7266
- [11] Hollstein U.: Actinomycin. Chemistry and mechanism of action. *Chem. Rev.*, 1974; 74: 625–652
- [12] Kim H.K., Nam J.Y., Han M.Y., Son K.H., Choi J.D., Kwon B.M., Takusagawa H.L., Huang Y., Takusagawa F.: Natural and synthetic analogues of actinomycin D as Grb2-SH2 domain blockers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000; 10: 1455–1457
- [13] Krugh T.R.: Association of actinomycin D and deoxyribonucleotides as a model for binding of the drug to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972; 69: 1911–1914
- [14] Lackner H., Bahner I., Shigematsu N., Pannell L.K., Mauger A.B.: Structures of five components of the actinomycin Z complex from *Streptomyces fradiae*, two of which contain 4-chlorothreonine. *J. Nat. Prod.*, 2000; 63: 352–356
- [15] Loborg H., Linden E., Lonn A., Skoglund P., Rundquist I.: High affinity binding of 7-aminoactinomycin D and 4',6'-diamidino-2-phenylindole to human neutrophilic granulocytes and lymphocytes. *Cytometry*, 1995; 20: 296–306
- [16] Madhavarao M.S., Chaykovsky M., Sengupta S.K.: N7-substituted 7-aminoactinomycin D analogues. Synthesis and biological properties. *J. Med. Chem.*, 1978; 21: 958–961
- [17] Mauger A.B., Stuart O.A., Katz E.: Synthesis and properties of some peptide analogues of actinomycin D. *J. Med. Chem.*, 1991; 34: 1297–1301
- [18] Meienhofer J., Atherton E.: Structure-activity relationships in the actinomycins. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1973; 16: 203–300
- [19] Meienhofer J., Atherton E.: Structure-activity relationships among the semisynthetic antibiotics. (Perlman D., Ed.), Academic Press, New York 1977: 427–529
- [20] Modest E.J., Sengupta S.K.: 7-Substituted actinomycin D (NSC-3053) analogs as fluorescent DNA-binding and experimental antitumor agents. *Cancer Chemother. Rep.*, 1974; 58: 35–48
- [21] Moore S., Kondo M., Copeland M., Meienhofer J.: Synthesis and antitumor activity of 2-deamino- and N $_7$ -( $\alpha$ -hydroxypropyl)actinomycin D. *J. Med. Chem.*, 1975; 18: 1098–1101
- [22] Moore S., Patel R.P., Atherton E., Kondo M., Meienhofer J.: Synthesis and some properties and antitumor effects of the actinomycin lactam analog, [di(1'-L- $\alpha$ , $\beta$ -diaminopropionic acid)]actinomycin D1. *J. Med. Chem.*, 1976; 19: 766–772
- [23] Muller W., Crothers D.M.: Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA. *J. Mol. Biol.*, 1968; 35: 251–290
- [24] Philpott N.J., Turner A.J., Scopes J., Westby M., Marsh J.C., Gordon-Smith E.C., Dalgleish A.G., Gibson F.M.: The use 7-amino-actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood*, 1996; 87: 2244–2251
- [25] Schmid I., Krall W.J., Uittenbogaart C.H., Braun J., Giorgi J.V.: Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*, 1992; 13: 204–208
- [26] Sehgal R.K., Almassian B., Rosenbaum D.P., Zazdrozny R., Sengupta S.K.: Synthesis and biological properties of actinomycin D chromophoric analogues substituted at carbon 7 with aziridine and cyclopropyl functions. *J. Med. Chem.*, 1988; 31: 790–793
- [27] Sengupta S.K., Anderson J.E., Kelley C.: Carbon-7 substituted actinomycin D analogues as improved antitumor agents: synthesis and DNA-binding and biological properties. *J. Med. Chem.*, 1982; 25: 1214–1219
- [28] Sengupta S.K., Anderson J.E., Kogan Y., Tries D.H., Beltz W.R., Madhavarao M.S.: N2 and C-7 substituted actinomycin D analogues: synthesis, DNA-binding affinity, and biochemical and biological properties. Structure-activity relationship. *J. Med. Chem.*, 1981; 24: 1052–1059
- [29] Sengupta S.K., Blondin J., Szabo J.: Covalent binding of isomeric 7-(2,3-epoxypropoxy)actinomycin D to DNA. *J. Med. Chem.*, 1984; 27: 1465–1470

- [30] Sengupta S.K., Kelly C., Sehgal R.K.: "Reverse" and "symmetrical" analogues of actinomycin D: metabolic activation and *in vitro* and *in vivo* tumor growth inhibitory activities. *J. Med. Chem.*, 1985; 28: 620–628
- [31] Sengupta S.K., Kogan Y., Kelly C., Szabo J.: New actinomycin D analogues as superior chemotherapeutic agents against primary and advanced colon tumors and colon xenografts in nude mice. *J. Med. Chem.*, 1988; 31: 768–774
- [32] Sengupta S.K., Madhavarao M.S., Kelly C., Blondin J.: Tetracyclic chromophoric analogues of actinomycin D: synthesis, structure elucidation and interconvertibility from one form to another, antitumor activity, and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.*, 1983; 26: 1631–1637
- [33] Sengupta S.K., Rosenbaum D.P., Sehgal R.K., Almassian B., Blondin J.: Enantiomers of 7-(2,3-epoxypropoxy) actinomycin D as dual-action DNA-acting antitumor agents. *J. Med. Chem.*, 1988; 31: 1540–1547
- [34] Sengupta S.K., Schaer D.: The interaction of 7-substituted actinomycin D analogs with DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978; 521: 89–100
- [35] Sengupta S.K., Tinter S.K., Lazarus H., Brown B.L., Modest E.J.: 7-Substituted actinomycin D analogs. Chemical and growth-inhibitory studies. *J. Med. Chem.*, 1975; 18: 1175–1180
- [36] Sengupta S.K., Trites D.H., Madhavarao M.S., Beltz W.R.: Actinomycin D oxazinones as improved antitumor agents. *J. Med. Chem.*, 1979; 22: 797–802
- [37] Shinomiya M., Chu W., Carlson R.G., Weaver R.F., Takusagawa F.: Structural, physical, and biological characteristics of RNA:DNA binding agent N8-actinomycin D. *Biochemistry*, 1995; 34: 8481–8491
- [38] Sinha B.K., Cox M.G., Chignell C.F., Cysyk R.L.: Synthesis and biological properties of N2-substituted spin-labeled analogues of actinomycin D. *J. Med. Chem.*, 1979; 22: 1051–1055
- [39] Sinha B.K., Cysyk R.L.: Mechanism of action of N2-substituted spin labeled actinomycin D: binding to nucleic acids and erythrocyte ghost membranes. *Chem. Biol. Interact.*, 1981; 34: 362–372
- [40] Stepanova N.G., Nikitin S.M., Valeeva F.S., Kartasheva O.N., Zhuze A.L., Zelenin A.V.: Application of 7-amino-actinomycin D for the fluorescence microscopical analysis of DNA in cells and polytene chromosomes. *Histochem. J.*, 1985; 17: 131–142
- [41] Stokke T., Holte H., Smeland E.B., Lie S.O., Steen H.B.: Differential chromatin structure-dependent binding of 7-aminoactinomycin D in normal and malignant bone marrow hepatopoietic cells. *Cancer Res.*, 1992; 52: 5007–5012
- [42] Takusagawa F., Carlson R.G., Weaver R.F.: Anti-leukemia selectivity in actinomycin analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, 2001; 9: 719–725
- [43] Takusagawa F., Takusagawa K.T., Carlson R.G., Weaver R.F.: Selectivity of F8-actinomycin D for RNA:DNA hybrids and its anti-leukemia activity. *Bioorg. Med. Chem.*, 1997; 5: 1197–1207
- [44] Takusagawa F., Wen L., Chu W., Li Q., Takusagawa K.T., Carlson R.G., Weaver R.F.: Physical and biological characteristics of the antitumor drug actinomycin D analogues derivatized at N-methyl-L-valine residues. *Biochemistry*, 1996; 35: 13240–13249
- [45] Yoo H., Rill R.L.: Single-strand DNA binding of actinomycin D with chromophore 2-amino to 2-hydroxyl substitution. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2003; 36: 305–311
- [46] Zelenin A.V., Kirianova E.A., Kolesnikov V.A., Stepanova N.G.: Use of actinomycin D for the specific quenching of fluorescence of deoxyribonucleic acid in cells stained with acridine aminoderivatives. *J. Histochem. Cytochem.*, 1976; 24: 1169–1172
- [47] Zelenin A.V., Poletaev A.I., Stepanova N.G., Barsky V.E., Kolesnikov V.A., Nikitin S.M., Zhuze A.L., Gnutchev N.V.: 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. *Cytometry*, 1984; 5: 348–354