

АНАЛИЗ САМОАССОЦИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФЕНОКСАЗОНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ^1H ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

Лантушенко А.О.¹⁾, Дэвис Д.Б.²⁾, Веселков А.Н.¹⁾

¹⁾ Кафедра физики Севастопольского национального технического университета.
Стрелецкая балка, г. Севастополь 99053, Украина

E-mail: veselkov@sevgtu.sebastopol.ua

²⁾ Департамент химии Беркбек колледжа Лондонского университета
Лондон WC1N 0OP, Великобритания

Представлены результаты исследования самоассоциации синтетических феноксазоновых антибиотиков, аналогов актиномицина D, в водном растворе методом 1M и 2M ^1H -ЯМР спектроскопии (500 МГц). По данным экспериментальных зависимостей протонных химических сдвигов антибиотиков определены: равновесные константы, термодинамические параметры самоассоциации и предельные значения протонных химических сдвигов молекул.

Введение. Анализ биологической активности синтетических антибиотиков – аналогов актиномицина D показал, что она существенно зависит от структуры боковых цепей феноксазонового хромофора [1]. Исследования индуцированного апоптоза и фаз клеточного цикла в лейкемических клеточных линиях MOLT-3 человека, проведенные методом проточной цитофлюориметрии, свидетельствуют о том, что антиопухолевая активность синтезированных антибиотиков в значительной степени определяется количеством CH_2 групп в боковой аминоалкильной цепи феноксазонового хромофора [1,2]. В частности, наблюдается значительное снижение активности соединений актиноцил-бис-(4-диметиламинобутил) амида (ActIV) и актиноцил-бис-(5-диметиламинопентил) амида (ActV), содержащих, соответственно, четыре и пять CH_2 групп в боковой цепи по сравнению с исследованным ранее актиноцил-бис-(3-диметиламинопропил) амидом (ActIII), содержащим три CH_2 группы в боковой цепи [2]. Антибиотик ActIII проявляет значительную цитотоксическую активность в интервале концентраций 1-9 μM [1]. Исследования взаимодействия ActIII с молекулой ДНК в водно-солевом растворе методом УФ- и видимой оптической спектроскопии свидетельствуют о том, что наиболее вероятным механизмом комплексообразования этого антибиотика с ДНК является интеркаляция феноксазонового хромофора лиганда между плоскостями азотистых оснований [1]. Близость химических структур антибиотиков ActIV, ActV и ActIII позволяет предположить, что ActIV и ActV также взаимодействует с ДНК путем интеркаляции. Известно, что биологическая активность антибиотиков зависит от степени их связывания с ДНК. Количественное определение параметров связывания ароматических лигандов с ДНК

предполагает исследование самоассоциации лигандов в одинаковых экспериментальных условиях [3].

В настоящей работе исследована самоассоциация ActIV и ActV в водном растворе методом одномерной (1D) и двумерной (2D) ^1H ЯМР спектроскопии (500 МГц). Анализ структурных и термодинамических параметров агрегации феноксазоновых антибиотиков проведен так же, как и исследованных ранее [2,4] ароматических красителей и антибиотиков по экспериментальным концентрационным и температурным зависимостям химических сдвигов протонов молекул. Отнесение сигналов в спектрах ^1H ЯМР, отождествление химических и пространственных связей молекул проводили, соответственно с помощью двумерных гомоядерных TOCSY и ROESY экспериментов

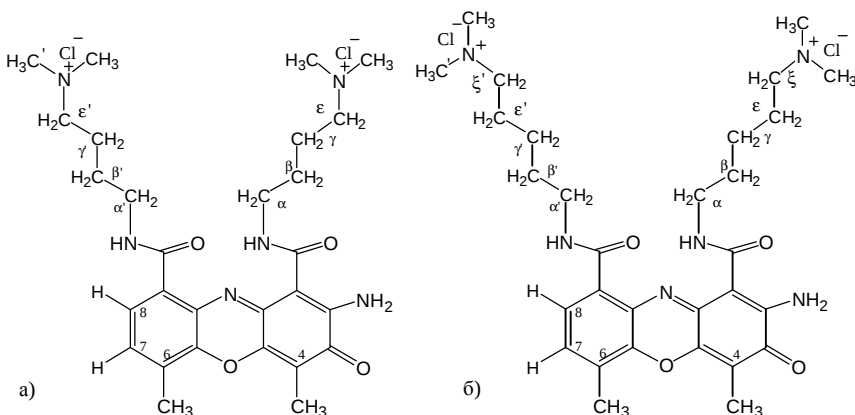


Рисунок 1 – Структурные формулы молекул феноксазоновых антибиотиков:
а - ActIV; б - ActV

Методика эксперимента. Синтез антибиотиков ActIV и ActV (рисунок 1) проведен, как описано ранее [5], путем окисления производного ортоаминофенола пара-хиноном, образованным в результате каталитического гидрирования соответствующих амидов 2-нитро-3-бензилокси-4-метилбензойной кислоты. Состав и строение полученного соединения подтверждены данными элементного анализа, наличием характеристических полос в ИК спектрах и характерного для феноксазонового хромофора поглощения в видимой области электронных спектров [5], а также данными 1D- и 2D- ^1H ЯМР спектров. ActIV и ActV лиофилизировали из D_2O с изотопной чистотой 99,95% D (“Sigma”) и растворяли в дейтерированном 0.1 молярном фосфатном буфере (pD 7.1, 0.1M NaCl), содержащем 10^{-4} моль/л EDTA. 1D- и 2D- ^1H ЯМР спектры измерены на спектрометре “Bruker DRX” с резонансной частотой 500 МГц. Химический сдвиг определяли

относительно ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоукислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония (ТМА). Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при двух температурах, 298 К и 308 К, в интервале концентраций для ActIV от 0.975 до 0.034 ммоль/л и от 0.926 до 0.042 ммоль/л

для ActV; температурные зависимости химических сдвигов протонов ActIV и ActV измерены в диапазоне температур от 278 К до 353 К.

Методика приготовления образцов и проведения одно- и двумерных (TOCSY, ROESY) ^1H ЯМР экспериментов достаточно подробно описана в [3,4].

Результаты и обсуждение. Отнесение сигналов в ^1H ЯМР спектрах ActIV и ActV получено путем анализа 2D-TOCSY и 2D-ROESY спектров [3,4]. Существенно, что в 2D-ROESY спектре ActIV (рисунок 2) наблюдается кросс-пик между протоном H8 и метильной группой 4-CH₃ (показан стрелкой на рисунке 2), который при условии проведения эксперимента с малыми временами смешивания, исключаящими влияние

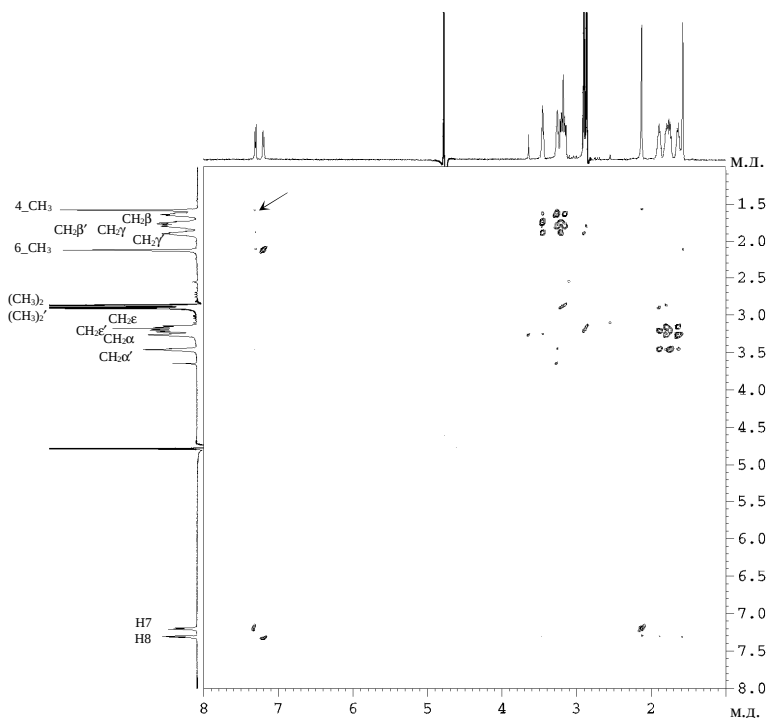


Рисунок 2 - Контурный 2D – ROE спектр (500 МГц, $\tau_m = 240$ мс) раствора Act IV ($x_0 = 1.1$ ммоль/л, $T = 298$ К), стрелкой показан межмолекулярный кросс-пик

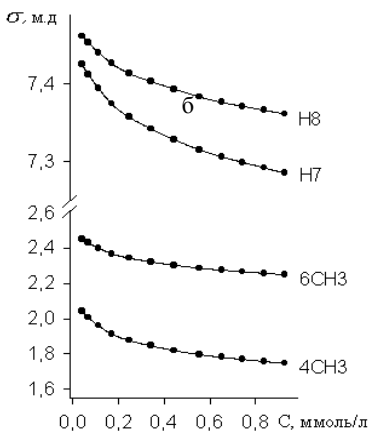
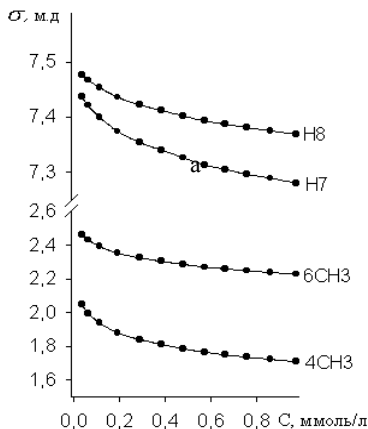


Рисунок 3 - Экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов протонов при T = 298 K:

экспериментальных данных, как и ранее [4], использовали модель бесконечномерной некооперативной самоассоциации молекул, в которой константы равновесия K_j для реакций



предполагаются одинаковыми при всех j : $K_1 = K_2 = \dots = K_j = K$. В такой модели зависимость химического сдвига δ от концентрации x_0 имеет вид [4]:

эффектов диффузии спинов, следует отнести к межмолекулярным взаимодействиям близко расположенных в пространстве протонов молекул ActIV в агрегате. Полученный результат свидетельствует об антипараллельной ориентации хромофоров ActIV в самоассоциате.

На основании экспериментальных концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов (рисунок 3) можно также сделать вывод об ассоциации ActIV и ActV за счет стэкинг-взаимодействия хромофоров при их антипараллельной ориентации относительно друг друга. Действительно, при увеличении концентрации синтетического антибиотика смещение резонансов протонов хромофора ActIV и ActV наблюдается в область более сильного поля, как это обычно имеет место при образовании стопочных ассоциатов ароматических молекул в растворе [4], при этом протоны 4-CH₃ испытывают существенно большее экранирование, чем 6-CH₃, что предполагает расположение 4-CH₃ протонов в агрегате в окрестности бензольного кольца хромофора.

Для интерпретации

$$\delta = \delta_m + (\delta_i - \delta_m) \left(\frac{2Kx_0 + 1 - \sqrt{(4Kx_0 + 1)}}{2Kx_0} \right), \quad (2)$$

где δ_i – протонный химический сдвиг для молекулы антибиотика внутри ассоциата, δ_m – протонный химический сдвиг в мономере, т.е. при бесконечном разбавлении. Параметры δ_m , δ_i и K модели (2) находились из условия минимизации квадратичной функции невязки, численная процедура минимизации достаточно подробно описана в [4]. Результаты расчетов параметров для необменивающихся протонов ActIV и ActV приведены в таблице.

Таблица 1 – Расчетные значения параметров самоассоциации антибиотиков актиноцил-бис-(4-диметиламинобутил) амида (ActIV) и актиноцил-бис-(5-диметиламинопентил) амида (ActV) в 0.1 М фосфатном буфере в D₂O, pD 7.1

T = 298K							
Бесконечномерная некооперативная модель				Бесконечномерная кооперативная модель			
протон	δ_m , м.д.	δ_i , м.д.	$K, 10^3$ л/моль	δ_m , м.д.	δ_i , м.д.	$K, 10^3$ л/моль	σ
Act IV							
H8	7.49	7.23	3.1±1.3	7.49	7.21	3.0±1.2	1.2±0.03
H7	7.46	7.10		7.46	7.07		
6-CH ₃	2.51	2.04		2.51	2.03		
4-CH ₃	2.13	1.48		2.14	1.45		
Act V							
H8	7.48	7.24	3.3±1.2	7.48	7.22	3.1±1.1	1.2±0.07
H7	7.45	7.13		7.45	7.11		
6-CH ₃	2.51	2.08		2.51	2.06		
4-CH ₃	2.14	1.53		2.14	1.52		
T=308K							
протон	δ_m , м.д.	δ_i , м.д.	$K, 10^3$ л/моль	δ_m , м.д.	δ_i , м.д.	$K, 10^3$ л/моль	σ
Act IV							
H8	7.50	7.25	2.2±1.2	7.50	7.23	2.1±1.1	1.2±0.02
H7	7.47	7.13		7.47	7.11		
6-CH ₃	2.53	2.07		2.54	2.04		
4-CH ₃	2.18	1.51		2.18	1.48		
Act V							
H8	7.49	7.25	2.4±1.1	7.49	7.23	2.2±1.0	1.2±0.08
H7	7.46	7.14		7.46	7.12		
6-CH ₃	2.53	2.09		2.54	2.06		
4-CH ₃	2.18	1.55		2.18	1.54		

Термодинамические параметры		
$-\Delta G^0$, кДж/моль	$-\Delta H^0$, кДж/моль	$-\Delta S^0$, Дж/(моль·К)
Act IV		
19.9±1.1	33.1±2.7	43.9±8.9
Act V		
20.1±1.0	31.8±2.9	39.3±9.5

Сравнение равновесных констант самоассоциации ActIV и ActV (таблица) и ActIII [2] в одинаковых экспериментальных условиях (0.1 М фосфатный буфер, рD 7.1) позволяет сделать заключение, что при самоассоциации синтетических феноксазоновых антибиотиков с различным числом CH_2 – групп в аминоалкильной боковой цепи значения K в пределах экспериментальной погрешности совпадают.

Для того, чтобы определить вероятность образования агрегатов антибиотика более высокого порядка, чем димеры, экспериментальные результаты были проанализированы с помощью бесконечномерной кооперативной модели самоассоциации, в которой равновесные константы реакций (1) предполагаются равными для всех $j \geq 2$ ($K_2 = K_3 = \dots = K_j = K$) и $K_1 = \sigma K$ [4]. Случай $\sigma = 1$ соответствует рассмотренной выше некооперативной модели. Система является кооперативной при $\sigma < 1$, когда образование димеров создает энергетически выгодные условия для последующей ассоциации молекул, и антикооперативной при $\sigma > 1$. Такая модель приводит к следующей зависимости химического сдвига δ от концентрации [4]:

$$\frac{\delta - \delta_m}{\delta_i - \delta_m} = 1 - \frac{x_1}{x_0} - \frac{\sigma K x_1^2}{x_0(1 - K x_1)}, \quad (3)$$

где x_0 – исходная молярная концентрация, x_1 – молярная концентрация мономеров антибиотика в растворе. В уравнение (3) входят четыре неизвестных параметра: δ_m , δ_i , σ и K , подлежащих определению по экспериментальным концентрационным зависимостям химического сдвига δ . Процедура нахождения параметров подробно описана в [4]. Значения параметров, полученных в результате расчетов по кооперативной модели, представлены в таблице 1. Как видно из таблицы, значения σ для ActIV, ActV и ActIII [2] так же, как и равновесные константы исследованных антибиотиков совпадают в пределах погрешности их определения, что, очевидно, обусловлено близостью химических структур синтетических антибиотиков. Важно отметить, что при самоассоциации антибиотика актиномицина D [4], содержащего в качестве боковых цепей массивные пентапептидные кольца, значение параметра кооперативности ($\sigma = 1.5$) существенно отличается от синтетических феноксазоновых антибиотиков.

аминоалкильными боковыми привесками. Из таблицы можно также заключить, что значения индуцированных протонных химических сдвигов $\Delta\delta = \delta_m - \delta_d$ для ActIV и ActV близки к значениям, рассчитанным для ActIII [2], что предполагает сходство пространственных структур димеров ActIV и ActV и ActIII в водном растворе.

Термодинамические параметры (энтальпия ΔH и энтропия ΔS) самоассоциации феноксазоновых антибиотиков определяли, как и ранее [2,4], из экспериментальных температурных зависимостей химических сдвигов δ_i необменивающихся протонов антибиотиков в водном растворе (рисунок 4). Для описания зависимости δ_i от температуры была использована следующая модель [4]:

$$\delta_i(T_j) = f_m(T_j)\delta_{mi} + f_a(T_j)\delta_{ai}, \quad (4)$$

где δ_{mi} , δ_{ai} , и $f_m(T_j)$, $f_a(T_j)$ – значения протонных химических сдвигов и равновесные молярные доли антибиотика при температуре T_j соответственно для его мономерной формы и в ассоциате. В соотношении (4) предполагается, что величины δ_{mi} , δ_{ai} для протонов феноксазонового хромофора не зависят от температуры в исследованном температурном интервале. Такая ситуация имеет место для исследованных ранее ароматических молекул красителей и антибиотиков в водном растворе [4].

В модели (4) влияние температуры на значения δ учитывается тем, что молярные доли f_m и f_a , однозначно связанные с равновесной константой ассоциации молекул K , являются функциями температуры. Определение температурной зависимости для константы равновесия позволяет найти термодинамические параметры – энтальпию (ΔH) и энтропию (ΔS) самоассоциации молекул ActIV и ActV. Подробное описание методики расчета величин ΔH и ΔS дано в работе [4].

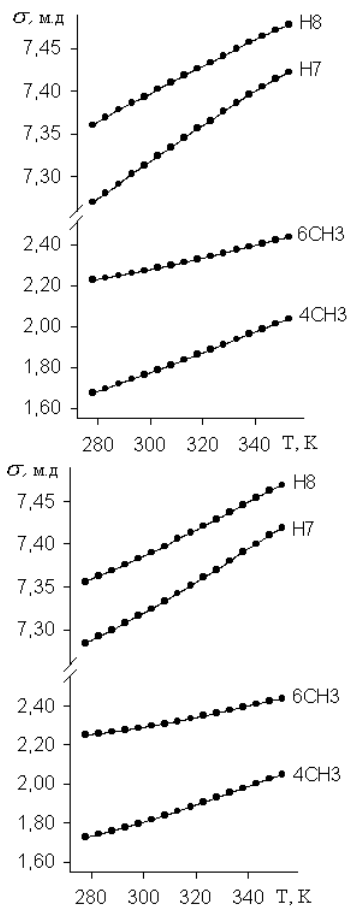


Рисунок 4 – Экспериментальные температурные зависимости химических сдвигов протонов: а - ActIV при $x_0 = 0.57$ ммоль/л; б - ActV при $x_0 = 0.56$ ммоль/л

термодинамических параметров самоассоциации ActIV и ActV приведены в таблице.

Из таблицы видно, что реакция самоассоциации ActIV и ActV является экзотермической. Считается, что самоассоциация ароматических молекул происходит главным образом в результате дисперсионных взаимодействий хромофоров этих молекул, которые характеризуются как отрицательной энтальпией, так и отрицательной энтропией. Сравнение абсолютных значений энтальпий реакций самоассоциации ActIV и ActV (таблица) и ActIII [2] свидетельствует о совпадении величин ΔH в пределах ошибки их определения. Более того, энтальпия самоассоциации антибиотика актиномицина D [4] также в пределах погрешности совпадает с ΔH для синтетических феноксазоновых антибиотиков. Следовательно, можно заключить, что основной вклад в энтальпию ассоциации молекул антибиотиков дают стэкинг-взаимодействия феноксазоновых хромофоров.

Выражаем благодарность Объединенному исследовательскому центру Лондонского университета за предоставленную возможность в Беркбек колледже использовать для измерений ЯМР-спектрометр "Bruker DRX" (500 МГц).

Работа частично финансировалась Международной программой INTAS (грант INTAS-97-31753).

Библиографический список

1. Role of crown-like side chains in the biological activity of substituted-phenoxazone drugs / L. Karawajew, E.N. Glibin, V.Ya. Maleev and oth. // *Anticancer Drug Des.* — 2000. — V. 15. — P. 331–338.
2. ^1H ЯМР анализ самоассоциации антибиотика актиноцил-бис-(3-диметиламинопропил) амина в водном растворе / Д.А. Веселков, А.О. Лантушенко, Д.Б. Дэвис, А.Н. Веселков // *Биорг. химия.* — 2002. — Т. 28. — № 4. — С. 379–384.
3. Davies D.B. Structural and thermodynamical analysis of molecular complexation by ^1H NMR spectroscopy. Intercalation of ethidium bromide with the isomeric deoxytetranucleoside triphosphates 5'-d(GpCpGpC) and 5'-d(CpGpCpC) in aqueous solution / D.B. Davies, A.N. Veselkov // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* — 1996. — V. 92. — P. 3545–3557.
4. Davies D.B. ^1H NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution. Structural and thermodynamical analysis / D.B. Davies, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* — 1996. — V. 92. — P. 383–390.
5. Синтез аналогов актиномицина. Бензо-краун-4-карбоалкил амиды актиноцина / Е.Н. Глибин, Н.Г. Плеханова, Д.В. Овчинников, З.И. Коршунова // *Журн. органич. химии.* — 1997. — Т. 33. — Вып. 10. — С. 1573–1576.

Поступила в редакцию 29.01.2002 г.