



УДК 577.182.36.088.53:543.422.25

¹H-ЯМР-АНАЛИЗ САМОАССОЦИИИ АНТИБИОТИКА АКТИНОЦИЛ-БИС(3-ДИМЕТИЛАМИНОПРОПИЛАМИНА) В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

© 2002 г. Д. А. Веселков*, А. О. Лантушенко**, Д. Б. Дэвис*, А. Н. Веселков***

* Беркбек колледж Лондонского университета, департамент химии, Лондон, Великобритания;

** Севастопольский государственный технический университет,
99053, Украина, г. Севастополь, Стрелецкая балка

Поступила в редакцию 02.07.2001 г. Принята к печати 15.10.2001 г.

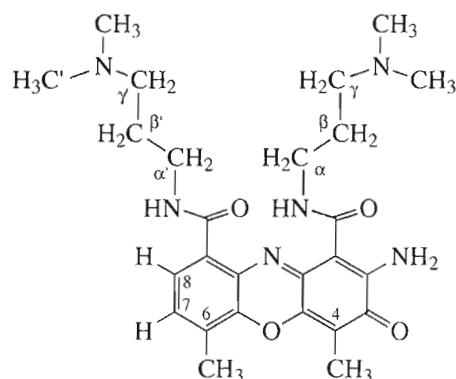
Самоассоциация синтетического антибиотика актиноцил-бис(3-диметиламинопропиламина) в водном растворе исследована методом одномерной и двумерной ¹H-ЯМР-спектроскопии (500 МГц). Двумерные эксперименты TOCSY и ROESY использованы для полного отнесения сигналов протонов антибиотика и качественного анализа взаимного расположения молекул в агрегате. По данным концентрационных и температурных зависимостей химических сдвигов протонов, определены равновесные константы, термодинамические параметры (ΔH , ΔS) ассоциации молекул и предельные значения химических сдвигов протонов молекул в ассоциатах. Полученные данные проанализированы с использованием бесконечномерной некооперативной и кооперативной моделей самоассоциации молекул. Значение параметра кооперативности ($\sigma \approx 1.1$) свидетельствует о существенно меньшем проявлении антикооперативного эффекта при агрегации молекул исследованного синтетического антибиотика в сравнении с противоопухолевым антибиотиком актиномицином *D* ($\sigma \approx 1.5$). В рассчитанной наиболее вероятной структуре димерного ассоциата антибиотика в водном растворе, так же как и в димере актиномицина *D*, имеет место антипараллельная ориентация плоскостей феноксазоновых хромофоров взаимодействующих молекул.

Ключевые слова: антибиотики противоопухолевые, синтетический аналог актиномицина *D*, самоассоциация, равновесные константы, термодинамические параметры; ЯМР-спектроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Синтетический аналог антибиотика актиномицина *D* (AMD), актиноцил-бис(3-диметиламинопропиламин) (ACT), отличающийся от AMD тем, что к его феноксазоновому хромофору вместо пентапептидных колец присоединены диметиламинопропильные группы, обладает противоопухолевой активностью, проявляющейся как в опытах *in vitro* [1], так и *in vivo* [2]. Анализ методом проточной цитофлюориметрии индуцированного апоптоза и фаз клеточного цикла в лейкемических клетках MOLT-3 человека показал, что ACT проявляет значительную цитотоксическую активность в интервале концентраций 1–9 мкМ [1]. В работе [1] сделано предположение, что фармакологическое действие ACT связано с комплексобразованием антибиотика с ДНК и ингибированием синтеза ДНК и РНК. Исследования методом электронной спектроскопии связывания ACT с ДНК в водно-солевом растворе свидетельствуют о том, что наиболее вероятным механизмом об-

разования комплекса ACT с ДНК является интеркаляция феноксазонового хромофора лиганда между плоскостями оснований ДНК [1, 3]. Изучение закономерностей процесса самоассоциации ароматических молекул антибиотиков, характера равновесия между мономерными и ассоциированными формами важно для анализа механизма комплексообразования этих соединений с нукле-



Структурная формула молекул актиноцил-бис(3-диметиламинопропиламина) (ACT).

Сокращения: ACT – актиноцил-бис(3-диметиламинопропиламин); AMD – актиномицин *D*.

Автор для переписки (тел.: 38-(0692) 235-251; эл. почта: veselkov@sevgtu.sebastopol.ua).

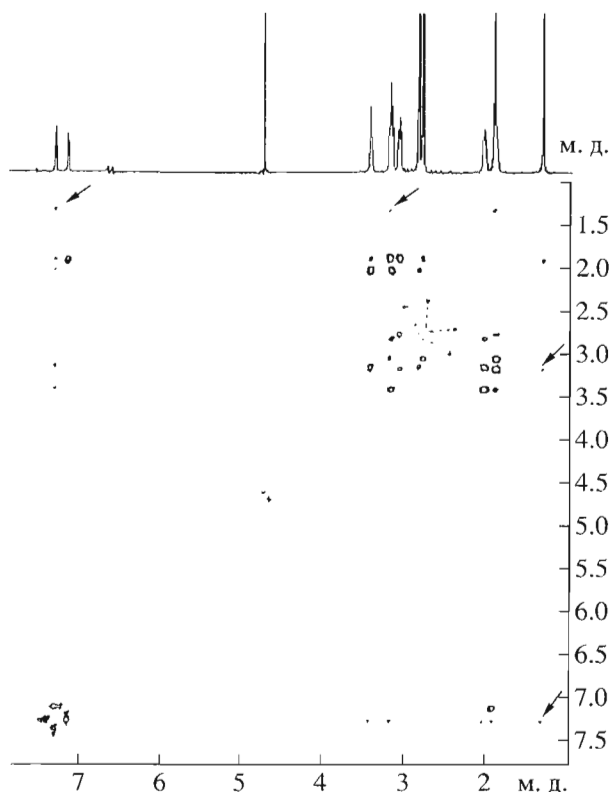


Рис. 1. Контурный ROESY-спектр (500 МГц, τ_m 200 мс) раствора АСТ ($x_0 = 0.883$ мМ, T 298 К). Межмолекулярные кросс-пики показаны стрелками.

иновыми кислотами в растворе [4–6]. Вместе с тем сведения о структурных и термодинамических параметрах агрегации АСТ в водном растворе в литературе отсутствуют.

В настоящей работе исследована самоассоциация АСТ в водном растворе методом одномерной (1D) и двумерной (2D) ^1H -ЯМР-спектроскопии (500 МГц). Анализ структурных и термодинамических параметров агрегации феноксазонового антибиотика проведен так же, как это делалось ранее [7, 8] при исследовании ароматических красителей и антибиотиков, т.е. по 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отнесение сигналов в ^1H -ЯМР-спектрах АСТ получено путем анализа двумерных спектров TOCSY и ROESY [4–6]. Существенно, что в ROESY-спектре (рис. 1) наблюдаются кросс-пики между протоном H8 и метильной группой при C4, а так-

же между протонами 4- CH_3 и $(\text{CH}_2)_\alpha$ (показаны стрелками на рис. 1), которые при условии проведения эксперимента с малыми временами смешивания, исключая влияние эффектов диффузии намагниченности, следует отнести к межмолекулярным взаимодействиям близко расположенных в пространстве протонов молекул АСТ в агрегате. Полученные результаты однозначно свидетельствуют об антипараллельной ориентации хромофоров АСТ молекул в самоассоциате.

На основании концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов (рис. 2a) можно также сделать вывод об ассоциации АСТ за счет стэкинг-взаимодействия хромофоров при их антипараллельной ориентации относительно друг друга. Действительно, при увеличении концентрации АСТ наблюдается сдвиг сигналов протонов хромофора в область более сильного поля, как это обычно имеет место при образовании стопочных ассоциатов ароматических молекул в растворе [7]. Ввиду того, что бензольное кольцо феноксазонового хромофора имеет значительно большие π -кольцевые токи, чем хиноидное, можно сделать вывод, что протоны 4- CH_3 , испытывающие наибольшее экранирование, расположены в ассоциате в окрестности бензольного кольца, что предполагает антипараллельную ориентацию плоскостей хромофоров взаимодействующих молекул.

Для интерпретации экспериментальных данных, как и ранее [7, 8], 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 [7]:

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

где δ_i – химический сдвиг сигнала протона для молекулы красителя внутри ассоциата, а δ_m – в мономере, т.е. при бесконечном разбавлении. Экспериментальные данные обрабатывались на основе вариационного метода, описанного в [7, 9]. Параметры δ_m , δ_i и K уравнения (2) находились из условия минимизации квадратичной функции невязки [9]. Численная процедура минимизации функции невязки описана в [7, 9]. Результаты расчетов параметров для необменивающихся с растворителем протонов АСТ приведены в таблице.

Сравнение равновесных констант самоассоциации АСТ и актиномицина D [10], полученных в одинаковых условиях (0.1 М фосфатный буфер, рD 7.1), позволяет сделать вывод о том, что наличие массивных боковых цепей – пентапептидных

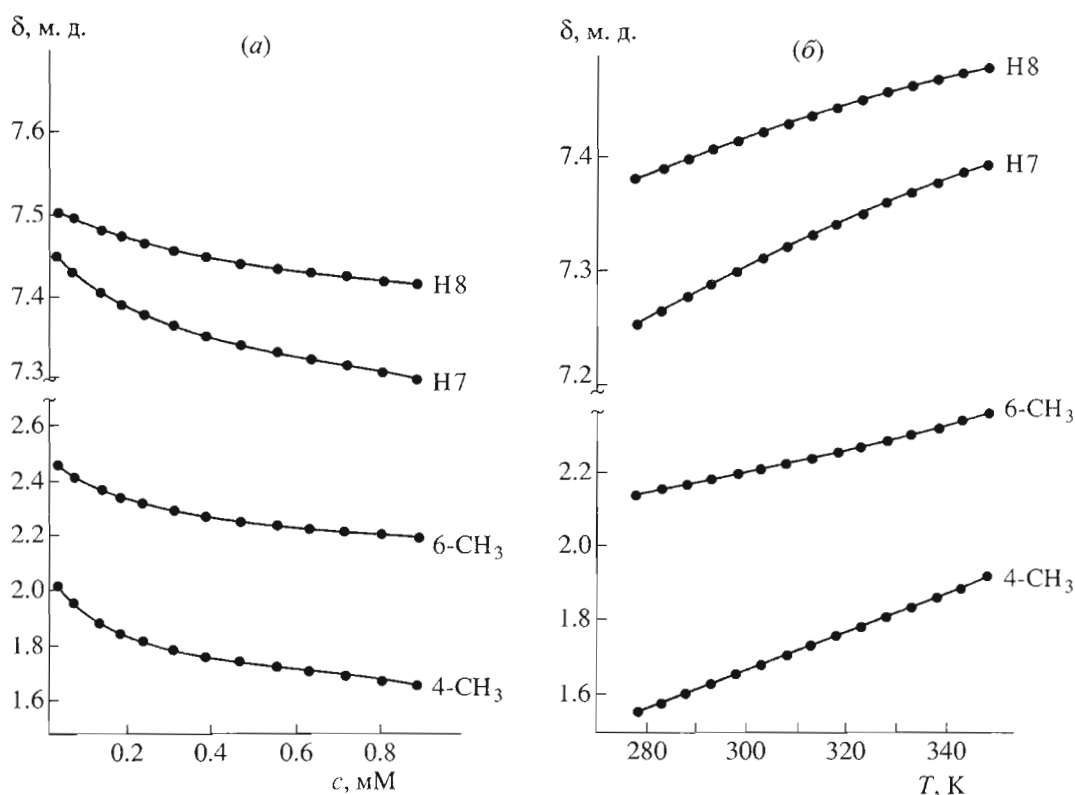


Рис. 2. Экспериментальные зависимости химических сдвигов протонов АСТ от концентрации при $T = 298$ К (а), от температуры при $c_0 = 0.883$ мМ (б).

лактонных колец в антибиотике AMD не оказывает существенного влияния на вероятность образования димерных агрегатов феноксазоновых антибиотиков в водном растворе, т.е. стэкинг-взаимо-

действие ароматических хромофоров молекул играет определяющую роль при их агрегации.

Для того чтобы определить вероятность образования агрегатов антибиотика более высокого

Значения параметров самоассоциации антибиотика актиноцил-бис(3-диметиламинопропиламина) в 0.1 М фосфатном буфере в D₂O, pD 7.1

$T = 298$ К

Бесконечномерная некооперативная модель				Бесконечномерная кооперативная модель				Термодинамические параметры		
протон	δ_m , м.д.	δ_i , м.д.	$K \times 10^{-3}$, М ⁻¹	δ_m , м.д.	δ_i , м.д.	$K \times 10^{-3}$, М ⁻¹	σ	$-\Delta G^0$, кДж/моль	$-\Delta H^{0*}$, кДж/моль	$-\Delta S^{0**}$, Дж/(моль К)
H8	7.51	7.28	3.1 ± 1.4	7.51	7.27	2.8 ± 1.3	1.09 ± 0.01	19.9 ± 0.9	32.3 ± 3.5	40.6 ± 9.2
H7	7.47	7.12		7.47	7.11					
6-CH ₃	2.50	1.97		2.50	1.95					
4-CH ₃	2.11	1.40		2.12	1.39					

$T = 308$ К

протон	δ_m , м.д.	δ_i , м.д.	$K \times 10^{-3}$, М ⁻¹	δ_m , м.д.	δ_i , м.д.	$K \times 10^{-3}$, М ⁻¹	σ
H8	7.52	7.31	2.90 ± 1.35	7.52	7.29	2.70 ± 1.35	1.13 ± 0.04
H7	7.48	7.15		7.48	7.12		
6-CH ₃	2.53	2.00		2.53	1.99		
4-CH ₃	2.16	1.44		2.16	1.43		

* Энтальпия самоассоциации AMD, $\Delta H^0 = -(31.8 \pm 6.3)$ кДж/моль.

** Энтропия самоассоциации AMD, $\Delta S^0 = -(46.9 \pm 10.9)$ Дж/(моль К).

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 $K_1 = \sigma K$ [7]. 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 [7]:

$$\frac{\delta - \delta_m}{\delta_i - \delta_m} = 1 - \frac{x_1}{x_0} - \frac{\sigma K x_1^2}{x_0(1 - Kx_1)}, \quad (3)$$

где x_0 – исходная молярная концентрация, x_1 – молярная концентрация мономеров АСТ в растворе. В уравнение (3) входит 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 [7, 9]. Значения параметров, полученных в результате расчетов по кооперативной модели, также представлены в таблице. Величина параметра $\sigma \approx 1.1$ (таблица) свидетельствует о существенно меньшем проявлении антикооперативного эффекта при агрегации АСТ в сравнении с АМД ($\sigma \approx 1.5$) [10]. Анализ полученных данных приводит к выводу о том, что параметр кооперативности σ зависит от размера и характера боковых групп и цепей в ароматических молекулах лигандов. Так, в случае образования в тех же условиях самоассоциатов ароматических молекул акридинового красителя профлавина, хромофор которого не содержит боковых групп или цепей, параметр $\sigma < 0.5$ [7], в то время как для антибиотиков актиномицина *D* и дауномицина, к хромофорам которых присоединены массивные боковые цепи, параметр $\sigma > 1$ и процесс самоассоциации носит антикооперативный характер [7, 8].

Термодинамика самоассоциации АСТ в водном растворе. На рис. 2б представлены экспериментальные температурные зависимости химических сдвигов δ , необменивающихся в водном растворе протонов АСТ. Для описания зависимости δ_i от температуры можно воспользоваться следующей моделью [7]:

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

где δ_{mi} , δ_{ai} и $f_m(T_j)$, $f_a(T_j)$ – значения химических сдвигов протонов 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 темпера-

турном интервале. Аналогичная ситуация имеет место и для других ароматических молекул красителей и антибиотиков в водном растворе [7, 8].

В соотношении (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 АСТ. Подробное описание методики расчета величин ΔH и ΔS приведено в работе [7]. Усредненные значения термодинамических параметров самоассоциации АСТ приведены в таблице.

Известно, что экзотермические реакции характерны для процессов самоассоциации, включающих в себя стэкинг-взаимодействие ароматических систем с делокализованными π -электронами, таких, как пуриновые основания, акридиновые красители и т.п. Считается, что самоассоциация ароматических красителей происходит главным образом в результате дисперсионных взаимодействий хромофоров этих молекул [11, 12]. Такие взаимодействия характеризуются как отрицательной энтальпией, так и отрицательной энтропией [13]. Сравнение абсолютных значений энтальпий реакций самоассоциации АСТ (таблица) и актиномицина *D* [7] свидетельствует о совпадении величин ΔH в пределах ошибки их определения. Следовательно, можно предположить, что основной вклад в энтальпию ассоциации молекул АСТ и АМД дают дисперсионные взаимодействия феноксазоновых хромофоров. В свою очередь энтропия самоассоциации АМД несколько больше по абсолютной величине по сравнению с АСТ (таблица). Отсюда можно заключить, что характер боковых групп феноксазонового хромофора оказывает существенное влияние на гидрофобные взаимодействия при агрегации молекул. В частности, можно предположить, что укладка боковых пентапептидных колец при образовании димерных комплексов антибиотика АМД отвечает большему упорядочению растворителя в окрестности ассоциатов по сравнению с димерными комплексами АСТ, в молекулах которых к феноксазоновому хромофору присоединены менее массивные диметиламинопропильные группы.

Структура димерного комплекса АСТ в водном растворе. Анализ структур димеров АСТ в водном растворе сделан на основании рассчитанных значений индуцированных химических сдвигов протонов антибиотика $\Delta\delta = \delta_m - \delta_d$ (см. таблицу). Взаимное расположение хромофоров в димере определяли путем установления соответствия величин $\Delta\delta$ их теоретическим значениям на кривых экранирования, рассчитанных квантово-механическим методом для ароматических молекул [14].

При этом учитывали антипараллельную ориентацию хромофоров АСТ в димере, как это следует из данных ROESY (рис. 1) и характера концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов антибиотика (рис. 2). Найденное в результате расчетов наиболее вероятное взаимное расположение хромофоров в структуре димера АСТ представлено на рис. 3. Данная структура определена по кривым экранирования протонов при расстоянии между плоскостями молекул 0.34 нм. В силу того, что структура димера АСТ рассчитывалась главным образом на основании индуцированных химических сдвигов $\Delta\delta$ для четырех необмениваемых протонов, возможно некоторое смещение плоскостей молекул в агрегате вдоль продольной оси хромофора антибиотика. Однако при таком смещении уменьшается перекрывание плоскостей хромофоров молекул и соответственно их стэкинг-взаимодействие в димерном комплексе. Наблюдаемая антипараллельность хромофоров АСТ в димере, связанная с характерным распределением электрических зарядов в феноксазоновом хромофоре, имеет место и для ряда других красителей и антибиотиков [7].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез актиноцил-бис(3-диметиламинопропиламина) проведен как описано ранее [15, 16]. 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 [15, 16], а также данными 1D- и 2D- ^1H -ЯМР-спектров. АСТ лиофилизовали из D_2O (99.95 % D, Sigma) и растворяли в дейтерированном 0.1 М фосфатном буфере (pD 7.1, 0.1 М NaCl, 10^{-4} М EDTA). Концентрацию АСТ в водном растворе определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения ϵ_{450} $36700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Концентрационные зависимости химических сдвигов протонов измерены в интервале концентраций АСТ от 0.88 до 0.033 М при двух температурах, 298 и 308 К, температурные зависимости химических сдвигов протонов АСТ измерены в диапазоне температур от 278 до 348 К. Химический сдвиг определяли относительно DSS (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфокислота), в качестве внутреннего стандарта использовали бромид тетраметиламмония (ТМА).

Методика приготовления образцов и проведения одно- и двумерных (TOCSY, ROESY) ^1H -ЯМР-экспериментов достаточно подробно описана в [4, 5].

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

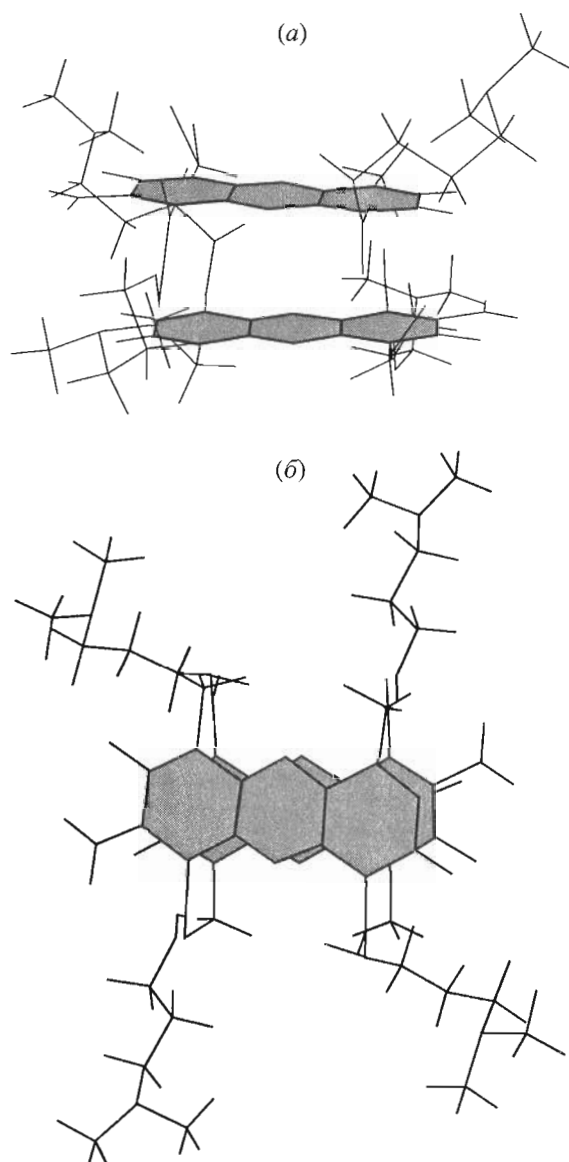


Рис. 3. Пространственные структуры димера АСТ: вид сбоку (а); вид на молекулярный ассоциат сверху, перпендикулярно хромофорам антибиотика (б). Хромофоры антибиотика заштрихованы.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karawajew L., Glibin E.N., Maleev V.Ya., Czerwony G., Dorken B., Davies D.B., Veselkov A.N. // *Anticancer Drug Des.* 2000. V. 15. P. 331–338.
2. Яворская Н.П., Голубева И.С., Кубаева И.Ю., Глибин Е.Н. // *Хим.-фарм. журн.* 1996. Т. 30. С. 22–26.
3. Семенов М.А., Сагайдакова Н.Н., Больбух Т.В., Гасан А.И., Круглова Е.Б., Березняк Е.Г., Малеев В.Я., Глибин Е.Н., Овчинников Д.В., Веселков А.Н. // *Биофиз. вестник ХНУ.* 2001. Вып. 3. С. 34–41.

4. *Davies D.B., Veselkov A.N.* // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1996. V. 92. P. 3545–3557.
5. *Davies D.B., Karawajew L., Veselkov A.N.* // Biopolymers. 1996. V. 38. P. 745–757.
6. *Davies D.B., Pahomov V.I., Veselkov A.N.* // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 4523–4531.
7. *Davies D.B., Djimant L.N., Veselkov A.N.* // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1996. V. 92. P. 383–390.
8. *Итон Р.Дж., Веселков Д.А., Барановский С.Ф., Осетров С.Г., Дымант Л.Н., Дэвис Д.Б., Веселков А.Н.* // Хим. физика. 2000. Т. 19. С. 98–104.
9. *Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Куликов Э.Л.* // Хим. физика. 1984. Т. 3. С. 1101–1108.
10. *Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Барановский С.Ф., Болотин П.А., Завьялова О.С., Веселков Д.А., Паркес Х., Дэвис Д.Б.* // Журн. структур. химии. 1995. Т. 36. С. 81–88.
11. *Robinson B.N., Loffler A., Schwartz G.* // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1973. V. 69. P. 56–73.
12. *Chaires J.B., Dattagupta N., Grothers D.M.* // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 3927–3932.
13. *Ross P.D., Subramanian S.* // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 3096–3102.
14. *Giessner-Prettre C., Pullman B.* // Quart. Rev. Biophys. 1987. V. 20. P. 113–172.
15. *Глибин Е.Н., Плеханова Н.Г., Овчинников Д.В., Коришнова З.И.* // Журн. орг. химии. 1996. Т. 32. С. 406–408.
16. *Глибин Е.Н., Овчинников Д.В., Плеханова Н.Г.* // Журн. орг. химии. 1997. Т. 33. С. 1573–1576.

The Self-Association of Antibiotic Actinocyl-bis(3-dimethylaminopropylamine) in Aqueous Solution: An ^1H NMR Analysis

D. A. Veselkov*, A. O. Lantushenko**, D. B. Davies*, and A. N. Veselkov***

Phone: 38 (0692) 235-251; e-mail: veselkov@sevgtu.sebastopol.ua

*School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, University of London, Gordon House, 29 Gordon Square, London WC1H 0PP

**Department of Physics, Sevastopol State Technical University, Streletskaya balka, Sevastopol, Crimea, 99053 Ukraine

The self-association of the synthetic antibiotic actinocyl-bis(3-dimethylaminopropylamine) was studied in aqueous solution by one- and two-dimensional ^1H NMR spectroscopy at 500 MHz. The two-dimensional homonuclear correlation NMR techniques (TOCSY and ROESY) were used to completely assign all the proton signals of the antibiotic and to quantitatively analyze the mutual arrangement of the antibiotic molecules in their aggregates. The concentration and temperature dependences of proton chemical shifts were used to determine the equilibrium constants and the thermodynamic parameters (ΔH and ΔS) of the self-association, as well as the limiting values of proton chemical shifts in associates. The experimental results were analyzed using both the indefinite noncooperative and cooperative models of the molecular self-association. The calculated value of the cooperativity coefficient ($\sigma \approx 1.1$) for our synthetic antibiotic confirmed a substantially lower anticooperative effect at the aggregation of its molecules in comparison with that of the antitumor antibiotic actinomycin D ($\sigma \approx 1.5$). We calculated the most favorable structure of the dimeric associate of the synthetic antibiotic in aqueous solution and found that, like in the actinomycin D dimer, the antiparallel orientation of the phenoxazone chromophore planes of interacting molecules is characteristic of its dimer. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: antitumor antibiotics, equilibrium constants, NMR spectroscopy, self-association, synthetic analogue of actinomycin D, thermodynamic parameters

Сдано в набор 29.03.2002 г.

Подписано к печати 11.06.2002 г.

Формат бумаги 60 × 88 $\frac{1}{8}$

Офсетная печать

Усл. печ. л. 12.0

Усл. кр.-отт. 3.4 тыс.

Уч.-изд. л. 11.9

Бум. л. 6.0

Тираж 269 экз.

Зак. 6308

Свидетельство о регистрации № 0110214 от 08.02.93 г. в Министерстве печати и информации Российской Федерации
Учредитель: Российская академия наук

Адрес издателя: 117997, Москва, Профсоюзная ул., 90

Отпечатано в ППП "Типография "Наука", 121099, Москва, Шубинский пер., 6