Нові сполуки конденсованого 1,2,4-триазину: молекулярне моделювання, синтез та біотестування

Л. Г. Пальчиковська, І. В. Алексєєва, М. О. Платонов, О. М. Костенко, Л. С. Усенко, В. В. Негруцька, А. Д. Швед

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

l.palchykovska@imbg.org.ua

Мета. *Розширити спектр біологічно активних сполук 1,2,4-триазино[5,6-b][1,4]бензотіазинів (1,2,4-ТБТ) та виявити з-поміж них інгібітори синтезу РНК.* ***Методи.*** *Неемпірична квантово-хімічна оптимізація структури 3-оксо-1,2,4-ТБТ фрагментно-орієнтованим заміщенням, їхній молекулярний докінг у віртуальну мішень, раціональний хімічний синтез теоретично спрогнозованих речовин та їхнє тестування у модельній ферментативній системі транскрипції.* ***Результати****. Отримано низку похідних 1,2,4-ТБТ із замісниками у бензольному і триазиновому циклах базової молекули. Тестування сполук у системі транскрипції in vitro ДНК-залежною РНК-полімеразою бактеріофага Т7 визначило структурно- та концентраційно-залежне пригнічення ними синтезу РНК. Для всіх досліджуваних сполук експериментальні дані задовільно корелюють з результатами віртуального скринінгу. Найефективнішим інгібітором виявився 3-оксо-8-бутил-1,2,4- ТБТ, який у концентрації 6 мкг/мл забезпечує повне блокування транскрипції.* ***Висновки.*** *Аналіз даних тестування дозволяє припустити, що пригнічення синтезу РНК обумовлено зв'язуванням 3-оксо-8-бутил-1,2,4-ТБТ як з неасоційованою РНК-полімеразою, так і з РНК-полімеразою у складі транскрипційного комплексу.*

Ключові слова: 1,2,4-триазино[5,6-b][1,4]-бензотіазини, комп'ютерне моделювання, віртуальний скринінг, синтез, модельна система транскрипції.

Вступ. Біологічну дію поліциклічних планарних молекул часто пов'язують з їхньою взаємодією з ДНК [1]. Сполуки такої природи можуть пригнічувати роботу ферментативних комплексів системи біосинтезу нуклеїнових кислот (НК), до складу яких входить ДНК, а саме – РНК- та ДНК-полімеразні, -топоізомеразні, -геліказні комплекси та ін. [2]. Попередні дослідження щодо впливу низки нових трициклічних 1,2,4-триазинвмісних основ та їхніх нуклеозидів на репродукцію вірусів родини *Herpes viridae* – вірусу простого герпесу (ВПГ) та вірусу Епштейна-Барр (ВЕБ) [3, 4] спонукали нас до подальшого дизайну базової основи для отримання ефективніших противірусних речовин.

Мета даної роботи – розширення спектра ефективних біологічно активних сполук трициклічної системи – 1,2,4-триазино[5,6-b][1,4]-бензотіазинів (1,2,4-ТБТ) – біоізостерів алоксазину та ізоалоксазину (що є природними складовими рибофлавінових коферментів) та структурних аналогів деяких поліциклічних антибіотиків [5, 6]. З огляду на можливість пригнічення функціонування вірусних полімераз ми вважали за доцільне дослідити вплив нових похідних на синтез РНК у модельній системі

транскрипції, що здійснюється ДНК-залежною Т7 РНК-полімеразою (Т7 РНКП) *in vitro*.

Для досягнення поставленої мети потрібно було розв'язати такі завдання: провести комп'ютерний дизайн базової основи – 3-оксо-1,2,4-ТБТ, модифікуючи триазиновий та бензотіазиновий фрагменти молекули, і з'ясувати можливу модель механізму дії створених структур молекулярним докінгом у віртуальну мішень каталітичного сайта Т7 РНКП [7, 14].

Матеріали і методи. *Процедура докінгу ліганда у модельний рецептор.* Усі розрахунки здійснювали у програмі QXP /Flo+ [8]. Докінг проводили з використанням гнучкого ліганда та фіксованої моделі рецептора, застосовуючи алгоритм систематичного докінгу (SDOCK+), який демонструє задовільну здатність відтворення конформації лігандів з мінімальним RMSD (середньо-квадратичне відхилення) відносно кристалографічних даних [9]. Максимальне число кроків розрахунку встановлювали на 300 та 10 найкращих комплексів (виходячи із внутрішніх скоринг-функцій QXP), що зберігаються для аналізу. Модель рецептора створено на основі рентгеноструктурних даних для транскрипційного комплексу Т7 РНКП–ДНК (PDB X-Ray code: 1SOV) [10].

Хімічний синтез. Для синтезу похідних конденсованого триазину використано 6-бром-1,2,4-триазин-3,5(2H,4H)-діон (**1**), його N2-β-D-триацетилрибофуранозид (**2**) та 2-аміно-4(5)-R-тіофеноли (**3**), синтезовані за описаними раніше методиками [11, 12]. Інші застосовані в роботі реагенти та розчинники вироблено фірмами «УкрОргСинтез» (Україна) і «Fluka» (Швейцарія).

Перебіг реакцій та чистоту отриманих сполук контролювали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на платівках Silica gel 60 F_{254} («Merck», Німеччина) у системі розчинників хлороформ:етанол (9:1) (А) або (98:2) (Б). Для препаративної хроматографії на силікагелі використовували градієнт концентрації етанолу в хлороформі. Спектри ^{1}H-ЯМР синтезованих сполук записано на спектрометрі «Mercury-400» («Varian», США) у DMSO-d_6, електронні спектри поглинання – на спектрофотометрі Shimadzu UV-3100 (Японія). Температуру топлення визначали на приладі Боетіуса.

Загальна методика одержання 2,4-дигідро-3-оксо-7(8)-R-1,2,4-триазино[5,6-b][1,4]бензотіазинів (4a–c). 5 ммоль бромпохідного триазину **(1**) та 5 ммоль відповідного амінотіофенолу (**3**) кип'ятили в 10 мл суміші діоксан:піридин (9:1) із зворотним холодильником протягом 4 год. У першу годину процесу утворюється об'ємний осад, що поступово розчиняється при подальшому перебігу реакції. Після охолодження реакційної суміші розчинники видаляли у вакуумі, залишок кристалізували з диметилформаміду (фізико-хімічні характеристики нових сполук наведено в таблиці).

Синтез N2-β-D-рибофуранозил-3(4H)-оксо-7-трифторметил-1,2,4-триазино [5,6-b][1,4]бензотіазину (5a). М е т о д I. До суспензії бромпохідного ацилнуклеозиду **2** (452 мг, 1 ммоль) у 5 мл суміші етанол:диметилформамід (4:1) додавали 0,08 мл піридину (1 ммоль) і 2-аміно-4-трифторметил-бензотіол (**3a**) (0,193 г, 1 ммоль) та кип'ятили протягом 8 год. Після випарювання розчинників ацилнуклеозид виділяли хроматографією на колонці з силікагелем з подальшим деблокуванням 25 %-м розчином гідроксиду амонію (10 мл) упродовж 20 год за кімнатної температури. Цільовий рибонуклеозид кристалізували з етанолу. Отримано 112 мг (27 %) аналітично чистого **5a**.

М е т о д II. До суспензії основи **4a** (290 мг, 1 ммоль) та тетраацетилрибози (350 мг, 1,1 ммоль) у 10 мл абсолютного ацетонітрилу додавали 0,2 мл триметилхлорсилану (ТМХС) (1,6 ммоль), 0,17 мл гексаметилдисилазану (ГМДС) (0,8 ммоль) і 0,15 мл хлориду олова (1,6 ммоль). Реакційну суміш перемішували за кімнатної температури упродовж 7 год. Осад видаляли. Фільтрат випаровували до олієподібного залишку, який розчиняли у хлороформі, промивали водою та насиченим розчином ацетату натрію. Хлороформ випаровували, сирий ацилнуклеозид очищували на колонці з силікагелем із подальшим деблокуванням гідроксидом амонію. Отримано 138 мг (33 %) аналітично чистого **5a.**

Синтез N2-β-D-рибофуранозил-3(4H)-оксо-7-хлор-1,2,4-триазино[5,6-b][1,4]бензотіазину (**5b**) здійснено аналогічно **5a** за обома методами. Вихід цільового рибонуклеозиду за методом I становив 42,3 мг (11 %), за методом II – 87,5 мг (23 %) аналітично чистого **5b**.

*Фізико-хімічні характеристики синтезованих похідних 1,2,4-триазино[5,6-b][1,4]бензотіазинів (**4a–c**, **5a**, **5b**)*

Сполука	Вихід, %	Т. пл., ℃	Сигнали в спектрах ^{1}Н-ЯМР (ДМСО-d_6): δ, м. ч. (J, Гц)	УФС: $\lambda_{макс}$, нм
4a	67	≥300	7,03 (м, 2H, Ph); 7,17 (д, 1H, Ph); 11,27 (с, 1H, NH); 12,09 (уш. с, 1H, NH)	232; 246; [280]*; 369
4b	80	330	7,26 (с,1H, Ph); 7,34 (d, lH,Ph); 7,26 (с, 1H, Ph); 11,25 (с, 1H, NH); 12,15 (с, 1H, NH)	212; 243; [268]*; 379
4c	53	279-282	0,88 (т, 3H, CH_3); 1,25 (м, 2H, CH_2); 1,49 (м, 2H, CH_2); 2,46 (м, 2H, CH_2); 6,94 (м, 2H, Ph); 7,00 (с, 1H, Ph); 10,98 (уш. с, 1H, NH); 11,80 (уш. с, 1H, NH)	243; [268]*; 385
5a	27 (33)**	165-167	3,41 (м, 1H, $H_β$-5'); 3,50 (м, 1H, $H_α$-5'); 3,78 (д,1H, H-4', J = 4,8); 3,98 (дд, 1H, H-3'); 4,15 (дд, 1H, H-2'); 4,39 (т, 1H, OH-5'); 4,79 (д, 1H, OH-3', J = 5,6); 5,00 (д, 1H, OH-2', J = 4,8); 5,85 (д, 1H, H-1', J = 0,8); 7,26-7,30 (м, 3H, Ph); 11,59 (с, 1H, NH)	212; 249,5; [280]*; 379
5b	11 (23)**	199-202	3,40 (м, 1H, $H_β$-5'); 3,49 (м, 1H, $H_α$-5'); 3,77 (дд,1H, H-4', J = 4,8); 3,97 (дд, 1H, H-3'); 4,15 (дд, 1H, H-2'); 4,39 (т, 1H, OH-5'); 4,78 (д, 1H, OH-3', J = 6,0); 4,99 (д, 1H, OH-2', J = 5,2); 5,85 (д, 1H, H-1', J = 2,4); 6,99–7,15 (м, 3H, Ph); 11,46 (с, 1H, NH)	244; [266]*; 387

П р и м і т к а. УФ спектри, зняті в етанолі; *прихований максимум; **вихід сполуки за методом глікозилювання.

Реакція транскрипції in vitro. Методику тестування синтезованих речовин на модельній системі транскрипції наведено в попередньому повідомленні [13]. Використано такі реагенти: лінеаризована ДНК плазміди *pTZ19R* як матриця, чотири канонічних рибонуклеозидтрифосфати, інгібітор РНКаз (RiboLock), транскрипційний буфер (трис-HCl, pH 7,5, $MgCl_2$, спермідин, дитіотреїтол) фірми «Fermentas» (Литва).

Преінкубацію тест-агентів з ДНК-матрицею або РНК-полімеразою проводили за присутності інших компонентів системи протягом 15 хв за кімнатної температури. Після преінкубації до системи додавали відповідний біополімер, якого бракувало, і далі реакція тривала іще впродовж 40 хв.

Результати і обговорення. *Молекулярне моделювання конденсованих триазинів.* Комп'ютерними дослідженнями планувалося вирішити такі завдання: визначити топологію і таутомерний статус базової основи 3-оксо-1,2,4-ТБТ; здійснити дизайн, вводячи замісники різної структури та природи у триазиновий та бензтіазиновий фрагменти молекули; з'ясувати поведінку базової молекули і її похідних у моделі сайта зв'язування Т7 РНКП; сконструювати активніші, згідно з чисельними експериментами, похідні базової структури.

Конструювання нових молекулярних структур передбачає збереження положення функціональних груп, донорно-акцепторних центрів триазинового фрагмента 1,2,4-ТБТ, здатних взаємодіяти як із матричними основами, так і з консервативним амінокислотним оточенням. Бензотіазиновий фрагмент, приєднаний до триазинового ядра, заповнює досить велику (подовжену) кишеню каталітичного сайта полімерази, водночас сприяючи реалізації численних можливостей стекінг-взаємодії та катіон-π-зв'язків. На нашу думку, заміщення бензольного ядра може підсилити взаємодію нових похідних з ферментом за рахунок збільшення їхнього об'єму та гідрофобності.

Наявність чотирьох атомів азоту та мобільних протонів обумовлює здатність базової сполуки та її похідних до таутомерних перетворень.

На першому етапі комп'ютерних досліджень перед нами стояло завдання визначити вірогідніші та енергетично найвигідніші таутомери базового 3-оксо-1,2,4-ТБТ і їхню топологію. Зазначені характеристики можуть відбиватися на їхній поведін-

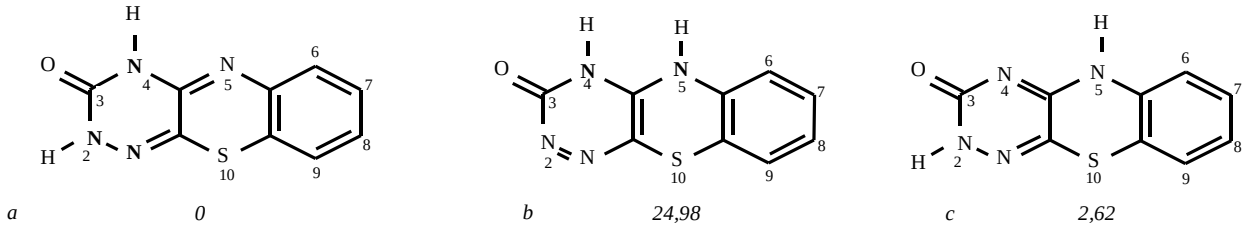


Рис. 1. Найвірогідніші таутомери (**a–c**) 3-оксо-1,2,4-триазино[5,6-b][1,4]бензотіазину (**4**) та їхні відносні енергії Гіббса (ккал/моль)

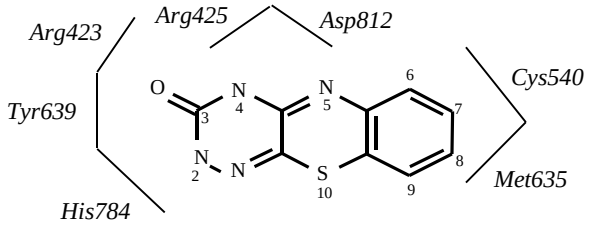


Рис. 2. Схематичне зображення сайта зв'язування інгібіторів із зазначеними ключовими амінокислотними залишками

ці у ферментативній мішені а, отже, й на механізмові дії зазначених сполук, тобто на реалізації взаємодії з біополімерами. Відмінності в енергії такої взаємодії для низки таутомерів бувають досить незначними, тоді як амінокислотне оточення, як правило, кардинально різниться, що часом призводить до появи так званих «помилково позитивних хітів». Оптимізацію структури 3-оксо-1,2,4-ТБТ проведено методами DFT.

Методами молекулярного дизайну побудовано просторові структури найвірогідніших таутомерів базової основи. З трьох таутомерів структура лише одного наближається до планарної, яка у даному разі і є енергетично найвигіднішою. За даними спектральних досліджень, саме цей таутомер реалізується при синтезі і саме його ми використовували в докінгу для вивчення закономірностей взаємодії досліджуваного класу сполук з активним сайтом Т7 РНКП. На рис. 1 представлено структури таутомерів 3-оксо-1,2,4-ТБТ (**4**).

Подальший дизайн 3-оксо-1,2,4-ТБТ був спрямований на підсилення взаємодії нових похідних з ферментативною мішенню та встановлення можливого механізму їхньої дії. Для щільнішого заповнення об'єму кишені ферментативного комплексу модифікували бензотіазиновий фрагмент, вводячи галоїд-, галоїдалкільні та алкільні групи за різними положеннями.

При створенні моделі активного сайта ми враховували усі амінокислотні залишки в радіусі 0,1 нм навколо каталітичної кишені – як ті, що можуть брати участь у зв'язуванні лігандів, так і залишки, які забезпечують функціонування полімерази (рис. 2). Тут важливо визначити, як рухається фермент під час каталітичного акта. Це вкрай необхідно, щоб запобігти появі вищезгаданих «помилково позитивних хітів», тобто сполук, у яких, за розрахунковими даними, активність присутня, але при біотестуванні її не спостерігається.

Молекулярним докінгом в обрану ділянку транскрипційного комплексу моделі каталітичного сайта Т7 РНКП здійснювали віртуальний скринінг змодельованих структур. Аналіз отриманих даних виявив, що ліганди достовірно розміщуються в каталітичній кишені і утримуються в ній за рахунок водневих зв'язків, стекінг- та катіон-π-взаємодії із залишками амінокислот і нуклеотидними основами матриці. Триазиновий фрагмент більшості розглянутих структур розташований у безпосередній близькості до каталітичного іона магнію і залишку Tyr639, який бере участь в упізнаванні чергового рибонуклеотиду, що входить до каталітичного сайта (рис. 3, див. вклейку).

Для похідних із замісниками у бензольному кільці прийнятними виявилися дві різні моделі зв'язування. Для сполук з галоїд-замісником або трифторметильною групою у 7-му положенні бензольного фрагмента триазиновий цикл фіксується стекінг-взаємодією з матричною основою (аденін) і водневими зв'язками із залишками Asp812 та

Arg425 (відстань між відповідними атомами становить 0,23 і 0,20 нм), при цьому замісники утворюють слабкий електростатичний зв'язок з Lys441 (рис. 4, див. вклейку).

Для 3-оксо-8-бутил-1,2,4-ТБТ спостерігається інша ситуація: триазиновий фрагмент утримується в активному сайті за рахунок водневих зв'язків із залишками Arg422 та Tyr427 (відстань між атомами 0,28 і 0,21 нм відповідно), а бензотіазиновий – із залишком His784 (відстань між відповідними атомами 0,10 нм). Алкільний ланцюжок занурюється в об'ємну кишеню, утворену залишками Cys540 та Met635 (рис. 5, див. вклейку), і фіксується в ній гідрофобними взаємодіями. У цьому разі відсутні зв'язки сполуки з матричною основою в складі комплексу, отже, її утримання в каталітичному сайті відбувається лише за рахунок взаємодії з ферментом.

Аналіз поведінки похідних вищезгаданих основ, що містять глікозидний залишок у триазиновому фрагменті, у моделі каталітичного сайта показав відсутність однозначної суперпозиції структур при визначенні найвигідніших варіантів їхнього розташування в мішені. Варто підкреслити, що значна різниця відповідних позицій молекули у віртуальній мішені може свідчити про низьку енергію зв'язування і, як наслідок, низьку інгібіторну здатність цієї речовини, незважаючи на наявність п'яти водневих зв'язків (Tyr639, His784, Asp812 Lys441, Mg^{2+}) та малі відстані між атомами, які їх утворюють (0,16; 0,22; 0,29; 0,26 та 0,25 нм відповідно).

Результати віртуального скринінгу дозволяють припустити, що розглянуті сполуки можуть бути потенційними інгібіторами, при цьому подовжений алкільний замісник бензотіазинового фрагмента здатний збільшувати стабільність комплексу за рахунок гідрофобної взаємодії і в такий спосіб підсилювати їхню інгібіторну активність. Натомість, введення глікозидного залишку в триазиновий фрагмент може спричинити протилежний ефект.

Підтвердження або спростування цієї робочої гіпотези визначиться тестуванням активності створених сполук у модельній системі транскрипції *in vitro*, що здійснюється саме Т7 РНКП.

У попередніх роботах авторами запропоновано доволі просту схему синтезу трициклічної триазинвмісної системи та її функціоналізації [3, 4]. Саме цей підхід поширено на синтез низки сконструйованих та залучених до віртуального скринінгу нових похідних базового 3-оксо-1,2,4-ТБТ (**4**).

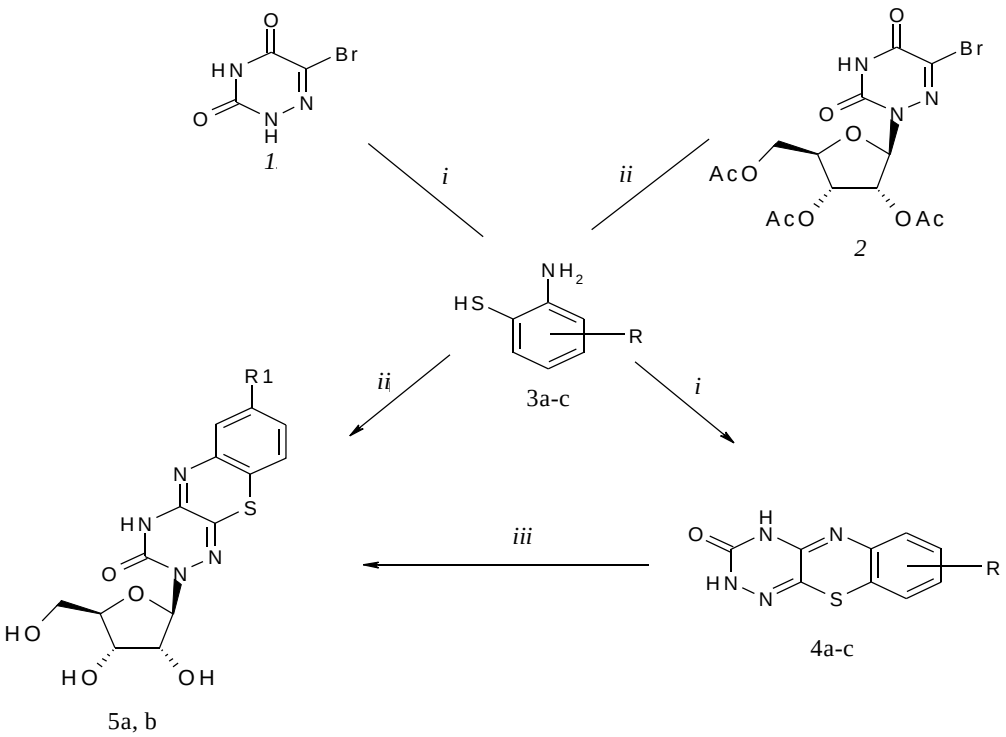
До позитивних характеристик зазначеного методу можна віднести його технологічність та економічність – реакція проходить в одну стадію за відсутності особливих умов, що дозволяє проводити її у препаративних кількостях.

У такий спосіб одержано нові триазинвмісні основи (**4a–c**), заміщені по бензотіазиновому фрагменту атомом хлору або трифторметильною групою у положенні 7 чи бутильним замісником – у положенні 8 та глікозильовані по триазиновому фрагменту відповідних основ рибонуклеозиди **5a**, **5b**.

Ефективність синтезу отриманих основ виявилася вищою за 50 % і для **4a** становила 67, **4b –** 80, **4c –** 53 %, але нижчою за таку для незаміщеного 3-оксо-(1,2,4-ТБТ), вихід якого дорівнював 90 %. Ці дані беззаперечно свідчать про суттєвий вплив хімічної природи замісників, введених у молекулу 2-амінотіофенолу, на процес утворення триазинвмісної гетеросистеми. Як видно з рис. 6, рибонуклеозиди **5a** та **5b** отримували двома методами для визначення більш продуктивного з них.

У разі взаємодії триацетилрибозиду 5-бром-6-азаурацилу (**2**) з амінотіофенолом **3a** за наведених умов (рис. 6) вихід цільового продукту (**5a**) становить 27 %, тоді як при використанні реагенту **3b** він істотно менший – 11 % (сполука **5b**)**.** Значне зниження ефективності синтезу зазначених рибофуранозидів за цим методом можна пояснити, в першу чергу, чутливістю ацилнуклеозиду (**2**) до умов реакції (температура вище 100 °C) та, як і при синтезі основ, чималим впливом Cl- та CF_3-замісників відповідних амінотіофенолів.

Безпосереднє глікозилювання триазинвмісних основ (**4a**, **4b)** за описаною методикою [3] дещо підвищує вихід кінцевого продукту для CF_3-заміщеної (33 %) та значно збільшує вихід для Cl-заміщеної основи (23 %). Негативний внесок у перебіг процесу глікозилювання та отримання нуклеозиду бажаної будови робить присутність щонайменьше двох реакційних центрів (атоми азоту у положеннях 2 і 4), тобто можливість утворення двох ізомерних продуктів. Аналіз реакційної суміші показав, що



де R=R$_1$ = H (4, 5); R=R$_1$ = CF$_3$ (a); R=R$_1$ = Cl (b); R= н-Ви (c). Реагенти та умови: (i) 1. EtOH – ДМФА, Ру, 120 °С; 2. NH$_4$OH/EtOH, 20 °С; (ii) діоксан – Ру, 100 °С; (iii) 1. ацетонітрил, тетраацетилрибоза, силілюючи агенти (ТМХС, ГМДС), SnCl$_4$, 25 °С; 2. NH$_4$OH/EtOH, 20 °С.

Рис. 6. Схема синтезу 7(8)R-3-оксо- 1,2,4-триазино[5,6-b][1,4]бензотіазинів

сумарний вихід ацильованих глікозидів сягав близько 60 %, однак частка ацетату домінуючого N2-нуклеозиду не перевищувала 45 %. Вільні рибофуранозиди **5a**, **5b** отримано деацилюванням відповідних ацетатів спиртово-водним розчином гідроксиду амонію.

При порівнянні аналітичних характеристик зразків трициклічних рибонуклеозидів, одержаних альтернативними способами, визначено їхню ідентичність.

Дослідження регуляторних властивостей отриманих сполук у модельному транскрипційному комплексі in vitro. До тестування у ферментативній системі залучено базову основу (**4**) та її рибозидну похідну (**5**) (як сполуки порівняння), синтезовані основи (**4a–c**) і два рибонуклеозиди (**5a**, **5b**).

В експериментах у модельній системі транскрипції *in vitro*, що здійснюється Т7 РНКП, відбувається концентраційно- та структурно-залежне пригнічення тотального синтезу РНК похідними 1, 2,4-ТБТ. Достовірно пригнічували синтез РНК три основи – з С1-, CF_3- та бутильним замісниками у бензотіазиновому фрагменті сполук **4a, 4b, 4c** на відміну від базової сполуки **4** (рис. 7). При цьому бутильна похідна **4c** виявилася найефективнішим інгібітором процесу транскрипції *in vitro* серед досліджених сполук, як і прогнозувалося за даними докінгу. Практично повна відсутність транскрипта спостерігалася при концентрації 6 мкг/мл.

Підтвердилася також наша гіпотеза щодо глікозидних похідних **5a** та **5b**, тестування яких у «живій» ферментативній системі не показало виразного пригнічення синтезу РНК порівняно з відповідними основами, тобто для цієї модельної системи рибонуклеозиди (**5a, 5b)** виявилися «помилково знайденими хітами», як і передбачалося за результатами докінгу.

Щоб визначити, до якого з двох біополімерів похідні 1,2,4-ТБТ виявляють більшу афінність, проводили преінкубацію досліджуваних сполук з кож-

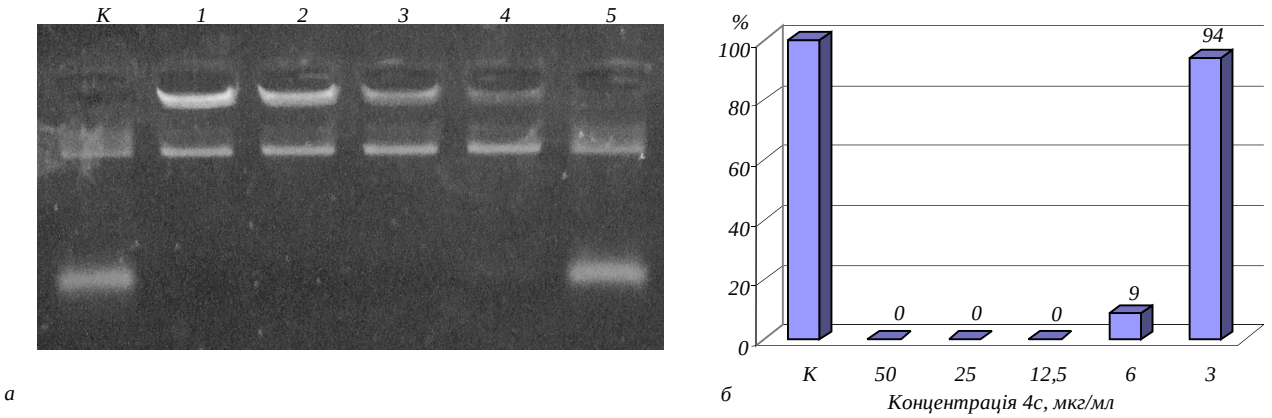


Рис. 7. Інгібування синтезу РНК *in vitro* (транскрипція Т7 РНКП) сполукою **4с** за стандартних умов. Повне інгібування визначається відсутністю РНК-продукту в агарозному гелі: *а* – типова електрофореграма РНК-транскриптів з трьох незалежних експериментів (*K* – позитивний контроль; *1* – 50; *2* – 25; *3* – 12,5; *4* – 6; *5* – 3 мкг/мл **4с**); *б* – усереднені результати, представлені як відсоток РНК-продукту від позитивного контролю (*K*) (програма Scion)

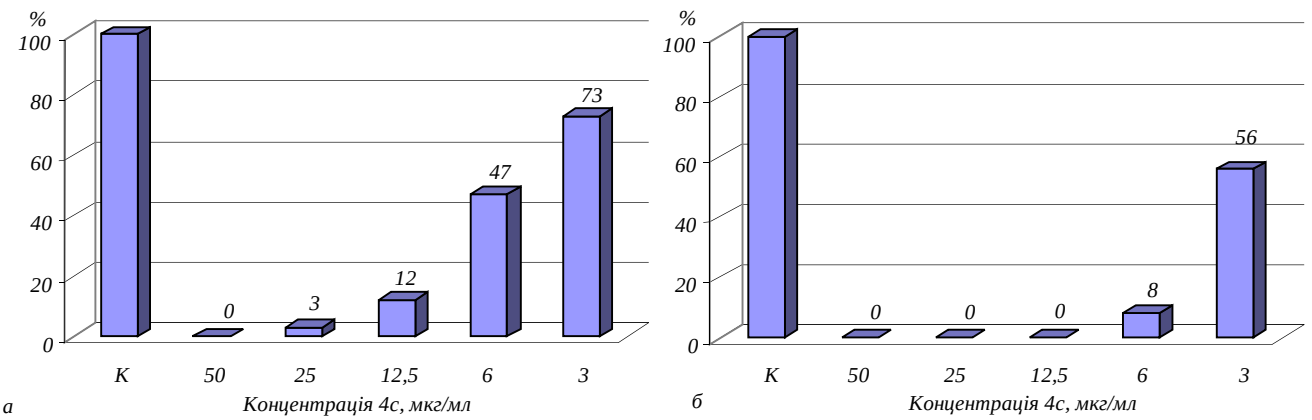


Рис. 8. Вплив преінкубації (15 хв, кімнатна температура) сполуки **4с з** ДНК-матрицею (*а*) та Т7 РНКП (*б*) на пригнічення синтезу РНК *in vitro* (транскрипція Т7 РНКП). Наведено усереднені результати, представлені як відсоток РНК-продукту від позитивного контролю (*K*) (програма Scion)

ним із них. Усі синтезовані основи по-різному виявляють здатність взаємодіяти з обома біополімерами. На прикладі бутильної похідної **4с** видно, що преінкубація з Т7 РНКП практично не змінює профілю концентраційно-залежного перебігу реакції транскрипції порівняно з реакцією за стандартних умов, але майже удвічі знижує мінімальну інгібуючу концентрацію цієї речовини (рис. 8). Натомість, попередня інкубація **4с** з ДНК значно впливає на профіль концентраційно-залежного перебігу синтезу РНК. Розподіл речовини по всій довжині матриці призводить до значного зменшення робочої концентрації інгібітора в реакційній суміші і, як наслідок, до появи РНК-транскрипта при вищих концентраціях сполуки (починаючи з 25 мкг/мл). Вірогідно, у пригніченні синтезу РНК сполукою **4с** вирішальною є її взаємодія з Т7 РНКП.

Висновки. Узагальнюючи результати проведеного дослідження можна зробити такі висновки:

1) методами обчислювальної біології сконструйовано низку нових похідних 1,2,4-триазино[5,6-b][1,4]бензотіазину;

2) технологічно зручними методами синтезовано сполуки прогнозованої структури з латеральними замісниками у положеннях 2, 7 і 8 молекули 3-оксо-1,2,4-триазинобензотіазину, у тому числі N2-рибонуклеозиди з CF_3-групою або атомом хлору у бензольному кільці; підтверджено ідентичність глікозидних похідних, отриманих двома незалежними синтезами;

3) тестуванням синтезованих речовин у системі транскрипції *in vitro*, що здійснюється Т7 РНКП, визначено достатньо ефективні інгібітори синтезу РНК. Аналіз отриманих даних дозволив зробити припущення стосовно того, що досліджувані сполуки здатні взаємодіяти з обома біополімерами – ферментом і ДНК. У блокуванні синтезу РНК у цій серії найефективнішим інгібітором виявився 3-оксо-8-бутил-триазинобензотіазин: визначальну роль у його дії, на нашу думку, відіграє взаємодія сполуки як із вільними молекулами РНК-полімерази, так і з тими, що перебувають у складі транскрипційного комплексу.

L. G. Palchykovska, I. V. Alexeeva, M. O. Platonov, O. M Kostenko, L. S. Usenko, V. V. Negrutska, A. D. Shved

New 1,2,4-triazine bearing compounds: molecular modeling, synthesis and biotesting

Summary

Aim*. To enlarge a spectrum of biologically active compounds in the series of the 1,2,4-triazino[5,6-b] [1,4]benzothiazine (1,2,4-TBT) derivatives and reveal among them efficient inhibitors of RNA synthesis* ***Methods****. The methods of structure optimization of the 3-oxo-1,2,4-TBT by fragment-oriented substitution, the molecular doking of new structures in a virtual target, the rational chemical synthesis of the theoretically predicted compounds and their testing in the system of transcription in vitro.* ***Results****. The series of 1,2,4-TBT derivatives with substituents in the benzene and triazine cycles of a base molecule were synthesized. The testing of synthesized compounds in the in vitro transcription system directed by T7 RNA polymerase revealed the structure- and concentration-dependent inhibition of the RNA synthesis by some of these compounds. The experimental and virtual screening data for all investigated compounds have a good correlation. It was found that most effective derivative is the 3-oxo-8-butyl-1,2,4-TBT which completely inhibited transcription at the concentration of 6 mg/ml.* ***Conclusions****. The biotesting results allow us to assume that the inhibition of RNA synthesis is caused by binding of the 3-oxo-8-butyl-1,2,4-TBT to both free RNA polymerase molecules and those including in a transcriptional complex with DNA.*

Keywords: 1,2,4-triazino[5,6-b][1,4]benzothiazines, design, virtual screening, synthesis, model transcription system.

Л. И. Пальчиковская , И. В. Алексеева, М. О. Платонов, А. Н. Костенко, Л. С.Усенко, В. В. Негруцкая, А. Д. Швед

Новые соединения конденсированного 1,2,4-триазина: молекулярное моделирование, синтез и биотестирование

Резюме

Цель. *Расширить спектр биологически активных соединений в ряду производных 1,2,4-триазино[5,6-b][1,4]бензотиазина (1,2,4-ТБТ) и выявить среди них ингибиторы синтеза РНК.* ***Методы.*** *Неэмпирическая, квантово-химическая оптимизация структуры 3-оксо-1,2,4-ТБТ фрагментно-ориентированным замещением, молекулярный докинг новых структур в виртуальную мишень, рациональный химический синтез теоретически спрогнозированных веществ и их тестирование в модельной ферментативной системе транскрипции.* ***Результаты.*** *Получена серия производных 1,2,4-ТБТ с заместителями в бензольном и триазиновом циклах базовой молекулы. Тестирование веществ в системе транскрипции in vitro ДНК-зависимой РНК-полимеразой бактериофага Т7 определило структурно- и концентрационно-зависимое ингибирование синтеза РНК. Для всех исследованных соединений экспериментальные данные удовлетворительно коррелируют с результатами виртуального скрининга. Наиболее эффективным ингибитором оказался 3-оксо-8-бутил-1,2,4-ТБТ, который в концентрации 6 мкг/мл обеспечивает полное блокирование транскрипции.* ***Выводы.*** *Анализ данных тестирования позволяет предположить, что угнетение синтеза РНК обусловлено связыванием 3-оксо-8-бутил-1,2,4-ТБТ как с неассоциированной РНК-полимеразой, так и с РНК-полимеразой в составе транскрипционного комплекса.*

Ключевые слова: 1,2,4-триазино [5,6-b][1,4]бензотиазины, компьютерное моделирование, виртуальный скрининг, синтез, модельная система транскрипции.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *DNA* and RNA binders. From small molecules to drugs / Eds M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson.–Weinheim: Wiley-VCH, 2003.–Vol. 1.–P. 278–315.
2. *Hendry L. B., Mahesh V. B., Bransome Jr. E. D., Ewing D. E.* Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals // Mutat. Res.–2007.–**623**.–P. 53–71.
3. *Alexeeva I. V., Palchikovskaya L. G., Rybalko S. L., Usenko L. S., Kobko O. S., Popova L. A., Dyadun S. T., Shved A. D.* Nucleosides with tricyclic aglycone. The ribonucleosides of condensed 1,2,4-triazine: synthesis and its antiherpetic activity // Biopolymers and Cell.–2006.–**22**, N 6.–P. 468–474.
4. *Alexeeva I. V., Palchikovska L. G., Usenko L. S., Kostina V. G.* Tricyclic 1,2,4-triazine bearing heterosystem: directed synthesis of new bioactive compounds // Biopolymers and Cell.–2008.–**24**, N 5.–P. 406–411.
5. *Nagamatsu T., Yamasaki H., Hirota T., Yamato M., Kido Y., Shibata M., Yoneda F.* Syntheses of 3-substituted 1-methyl-6-phenylpyrimido[5,4-e]-1,2,4-triazine-5,7(1H, 6H)-diones (6-phenyl analogs of toxoflavin) and their 4-oxides, and evaluation of antimicrobial activity of toxoflavins and their ana-

logs // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).–1993.–**41**, N 2.–P. 362–368.

6. *Shorshnev S. V., Yesipov S. Ye., Chernyshev A. I., Pozharskii A. F., Nanavyan I. M., Kuz'menko V. V.* Different basic hydrolysis of fervenuline and isofervenuline // Chem. Heterocycl. Compounds (Russia).–1987.–N 11.–P. 1555–1559.
7. *Piestrzeniewich M., Studzian K., Wilmanska D., Pluciennicz-ak G., Gniazdowski M.* Effect of DNA-interacting drugs on page T7 RNA polymerase // Acta Biochim. Pol.–1998.– **45**, N 1.– P. 127–132.
8. *McMartin C., Bohacek R. S.* QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design // Comput. Aided Mol. Des.–1997.–**11**, N 4.–P. 333–344.
9. *Temiakov D., Patlan V., Anikin M., Callister W. T., Yokoyama S., Vassylyev D. G.* Structural basis for substrate selection by T7 RNA polymerase // Cell.–2004.–**116**, N 3.–P. 381–391.
10. *Warren G. L., Andrews C. W., Capelli A. M., Clarke B., La-Londe J., Lambert M. H., Lindvall M., Nevins N., Semus S. F., Senger S., Tedesco G., Wall I. D., Woolven J. M., Peishoff C. E., Head M. S.* A critical assessment of docking programs and scoring functions // J. Med. Chem.–2006.–**49**, N 20.–P. 5912–5931.
11. *Alexeeva I. V., Palchikovs'ka L. G., Usenko L. S., Kostina V. G.* 5-Aminosubstituted triazine nucleosides and their furanidylic analogues: synthesis and primary screening on tumor cell models // Biopolymers and Cell.–2005.–**21**, N 2.–P. 174–179.
12. *Thomas L., Gupta A., Gupta V.* Synthesis of 2-amino-5-cloro-3(trifluoromethyl)benzenethiol and conversion into 4H-1,4-benzothiazines and their sulfones // J. Fluorine Chem.–2003.–**122**, N 2.–P. 207–213.
13. *Palchykovska L. G., Alexeeva I. V., Kostina V. G., Platonov M. O., Negrutska V. V., Deriabin O. M., Tarasov O. A., Shved A. D.* New amides of phenazine-1-carboxylic acid: antimicrobial activity and structure-activity relationship // Ukr. Biochem. J.–2008.–**80**, N 3.–P. 140–147.
14. *Levine M., Tjian R.* Transcription regulation and animal diversity // Nature.–2003.–**424**, N 6945.–P. 147–151.

УДК 547.836:573.3:577.15.04
Надійшла до редакції 10.07.09