

1,6-BIS[(БЕНЗИЛОКСИ)МЕТИЛ]ПРОИЗВОДНЫЕ УРАЦИЛА – НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИЧ-1

Гейсман А.Н.,¹ Валуев-Эллистон В.Т.,² Новиков М.С.¹

¹ ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», Волгоград, Россия (400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1), e-mail: geisman-1@mail.ru

² ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва, Россия (119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32)

Производные 1,6-бис[(бензилокси)метил]замещенного урацила проявляют выраженную активность в отношении обратной транскриптазы (ОТ) – ключевого фермента ВИЧ – в микромолярном диапазоне концентраций. Обнаружено, что наличие ароматического радикала, связанного мостиковой цепочкой с атомом азота в положении 1 цикла урацила, является критическим для проявления активности в отношении ОТ. Среди синтезированных соединений обнаружены высокоактивные ингибиторы мутантных форм ОТ ВИЧ-1, превосходящие по активности используемый в практике препарат невирапин. Охарактеризованы закономерности «структура-активность» для синтезированных веществ. Для соединения-лидера серии – 6-[(бензилокси)метил]-1-[(3,5-дихлорбензилокси)метил]-урацила – осуществлен молекулярный докинг с использованием комплексов ОТ дикого типа ВИЧ-1 с известными нуклеозидными ингибиторами, депонированных в Банке данных белков (PDB). Обнаружено, что исследуемое вещество способно к формированию водородных связей с аминокислотными остатками фермента в положениях 101 и 103, что играет важную роль в проявлении активности в отношении ОТ.

Ключевые слова: производные урацила, ВИЧ, обратная транскриптаза ВИЧ-1, нуклеозидные ингибиторы.

1,6-BIS[(BENZYLOXY)METHYL]URACIL DERIVATIVES – NOVEL INHIBITORS OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE

Geysman A.N.¹, Valuev-Elliston V.T.², Novikov M.S.¹

¹ Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia (400131, Volgograd State Medical University, Pavshikh Bortsov Sq., 1, Volgograd 400131, Russia), e-mail: geisman-1@mail.ru

² Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Science, Vavilov Str., 32, Moscow 119991, Russia

1,6-Bis[(benzyloxy)methyl]substituted uracil derivatives demonstrate profound inhibitory activity against reverse transcriptase (RT) – a key enzyme of HIV-1 lifecycle – at micromolar concentrations. It was found that the presence of aromatic group connected to the nitrogen atom at first position of the uracil ring by a short linker is crucial for activity against RT. Some of the synthesized compounds were found to be potent inhibitors of HIV-1 RT mutant forms and were more active than approved antiretroviral drug nevirapine. Structure-activity relationships were described for the synthesized compounds. The lead compound of the series – 6-[(benzyloxy)methyl]-1-[(3,5-dichlorobenzyloxy)methyl]uracil – was docked into the structure of HIV-1 wild type RT complexes with different non-nucleoside inhibitors deposited in Protein Data Bank (PDB). It was found, that the studied compound can form hydrogen bonds with aminoacid residues at positions 101 and 103 of the enzyme, which can contribute to activity against RT.

Keywords: uracil derivatives, HIV, HIV-1 reverse transcriptase, non-nucleoside inhibitors.

Введение

Диарилпроизводные пиримидиновых гетероциклов являются интересным классом органических соединений, обладающих биологической активностью различных типов. Среди них известно множество соединений, способных ингибировать репродукцию оболочечных вирусов, таких как вирус гепатита С [7] и в особенности вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1) [4; 8]. Одними из наиболее интересных объектов для

введения ароматических остатков является урацил и его производные благодаря разнообразию синтетических методологий, позволяющих проводить их функционализацию.

Ранее нами был описан синтез производных урацила, содержащих ароматические фрагменты, связанные короткими мостиковыми фрагментами с гетероциклическим ядром в положениях 1 и 6 [1] (рис. 1).

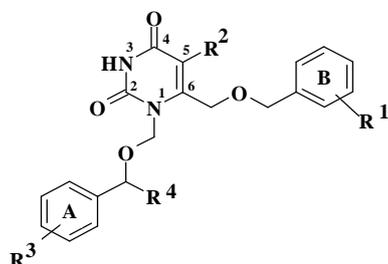


Рисунок 1 – Общая структура 1,6-бис[(бензилокси)метил]производных урацила.

Целью настоящего исследования является изучение активности в отношении обратной транскриптазы ВИЧ-1 и ряда ее мутантных форм, содержащих аминокислотные замены в участке связывания нуклеозидных ингибиторов, а также анализ закономерностей «структура-активность» в ряду 1,6-бис[(бензилокси)метил]производных урацила.

Материалы и методы

В работе использовались следующие материалы: [α - 32 P]dATP (5000 Ки/моль) фирмы «Изотоп» (Россия), 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (Promega, США), целлюлозные фильтры Whatman 3MM (Whatman, Великобритания). Все остальные реактивы максимальной чистоты были приобретены у компаний Sigma-Aldrich или Fluka. Активированная ДНК была получена из ДНК спермы лосося (Pharmacia Biotech, США) обработкой ДНКазой поджелудочной железы быка (Fermentas, Литва), как описано в работе [2].

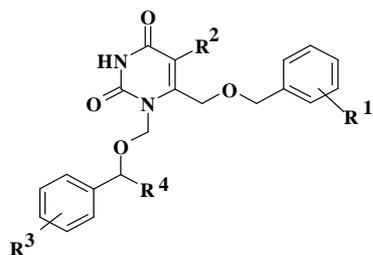
Определение активности ОТ ВИЧ-1 в системе активированной ДНК. Стандартная реакционная смесь (20 мкл) содержала 150 мкг/мл активированной ДНК, 0,05 мкг ОТ ВИЧ-1, 3 мкМ АТФ, по 30 мкМ остальных нуклеозид-5'-трифосфатов, 0,02 МБк [α - 32 P]dATP в буфере для измерения активности ОТ ВИЧ-1 (50 мМ Трис•НСl, рН 8,1, 10 мМ MgCl₂ и 200 мМ КСl). В экспериментах по исследованию ингибиторных свойств соединения вносили в реакционную смесь в виде растворов в диметилсульфоксиде до конечной концентрации последнего, равной 10%, при этом к контрольным реакциям прибавляли аналогичный объем чистого ДМСО. Реакцию инициировали прибавлением обратной транскриптазы и инкубировали в течение 20 мин при 37 °С, затем наносили пробы на фильтры (1x1 см) Whatman 3MM, пропитанные 1 мкл 0,5 М раствора ЭДТА. Фильтры отмывали от не включившегося в ДНК меченого нуклеотида 5 x 25 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты в

течение 5 мин каждый, 25 мл этилового спирта и сушили на воздухе. Сорбированную на фильтрах радиоактивность измеряли по методу Черенкова в счетчике Intertechnique Liquid Scintillation Counter SL-4000. Расчет констант ингибирования проводили по методу Диксона для неконкурентного типа ингибирования [6].

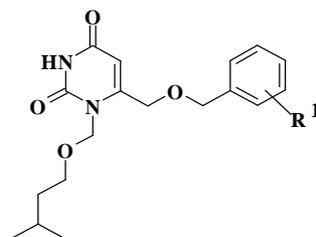
Результаты и их обсуждение

Анализ результатов исследования биологической активности синтезированных соединений – 1,6-бис[(бензилокси)метил]производных урацила **1-14** и их N¹-1-(3-метилбутокси)метильных аналогов **15-16** позволил выявить закономерности «структура-активность» в данном ряду веществ. Наиболее активным в отношении обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1 дикого типа оказался 6-[(бензилокси)метил]-1-[(3,5-дихлорбензилокси)-метил]урацил (**10**), ингибировавший на 50% активность фермента в концентрации 0,62 мкМ и превосходивший «родоначальное» соединение ряда (**1**) по активности более, чем в два раза. Введение метильных заместителей в положения 3 и 5 цикла А (**11**), а также цианогруппы в положение 4 данного фрагмента (**12**) приводило к снижению активности, в то время как введение заместителей в положение 4 ароматического фрагмента В практически не оказывало значимого влияния на активность (**2-3**). Введение атомов галогенов в положение 5 гетероцикла (**5-9**) во всех случаях снижало активность по отношению к 5-незамещенным аналогам. Разветвленные [(1-фенилэтокси)метил]производные (**13-14**) не проявили активности в отношении ОТ, а алифатические аналоги (**15-16**) показали на порядок более низкую активность, чем ароматические производные. Их константы ингибирования составили 33,4 и 50,4 мкМ, соответственно (таблица 1).

Таблица 1 – Активность соединений **1-16** в отношении ОТ ВИЧ-1 дикого типа



1-14



15-16

Соед.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	K _i (μM)
1	H	H	H	H	1,4
2	4-Cl	H	H	H	1,66
3	4-CH ₃	H	H	H	2,13
4	3,5-Cl ₂	H	H	H	ND*
5	H	Cl	H	H	8,0
6	H	Br	H	H	15
7	4-Cl	Br	H	H	16,9
8	4-CH ₃	Br	H	H	12,9
9	H	I	H	H	8,43
10	H	H	3,5-Cl ₂	H	0,62
11	H	H	3,5-(CH ₃) ₂	H	1,67
12	H	H	4-CN	H	50
13	H	H	H	CH ₃	>100
14	4-Cl	H	H	CH ₃	>100
15	H	-	-	-	33,4
16	4-Cl	-	-	-	50,4
Невирапин					7,2

* активность не определена

K_i (константа ингибирования) – концентрация ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы, обеспечивающая подавление активности фермента на 50%.

Анализ ингибиторной активности соединений **1-3** и **10-11** в отношении ряда мутантных форм ОТ показал, что исследуемые вещества оказываются на 1-2-порядка менее активными в отношении всех исследуемых типов фермента в сравнении с ОТ дикого типа. Исследованные вещества превосходили по активности используемый в клинической практике антиретровирусный препарат невирапин (Viramune®) в отношении одиночных мутантов и двойного мутанта K103N/Y181C, однако значительно уступали эфавиренцу по действию на те же формы ОТ. Наиболее благоприятный профиль резистентности по совокупности данных продемонстрировал 6-[(бензилокси)метил]-1-[(3,5-дихлорбензилокси)-метил]урацил (**10**). Интересной особенностью данного соединения явилась высокая активность в отношении ОТ с мутацией G190A, превышающая таковую для невирапина

более чем в 217 раз. Следует также отметить, что наиболее выраженную активность в отношении одного из важнейших клинических одиночных мутантов вируса Y181C показало соединение **2**, превышая эффективность невирапина более чем в 440 раз. Лидером по активности в отношении двойного мутантного изолята вируса K103N/Y181C стал 1-[[бензилокси)метил]-6-[(4-хлорбензилокси)метил]урацил (**2**) (таблица 2).

Таблица 2 – Активность соединений **1-3** и **10-11** в отношении мутантных вариантов ОТ ВИЧ-1

ОТ ВИЧ-1	1	2	3	10	11	Невирапин	Эфавиренц
дикий тип	1,4	1,66	2,13	0,62	1,67	7,2	0,01
L100I	189	69	77	51	125	273	0,08
K103N	56	51	67	38	124	>2000	0,58
V106A	123	105	67	41	131	>2000	0,05
Y181C	60,6	4,5	10	26	109	>2000	0,03
G190A	>140	>166	>213	9,2	41	>2000	0,06
K103N/Y181C	>140	61	67	>62	>167	>2000	0,14

K_i (константа ингибирования) – концентрация ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы, обеспечивающая подавление активности фермента на 50%.

Для рационализации полученных данных был проведен молекулярный докинг некоторых из полученных соединений в структуру комплексов ОТ с известными ННИОТ, депонированными в Банке данных белков (PDB-коды **3C6T** и **4N4M**) [3; 5]. Наибольшее отрицательное значение свободной энергии связывания лидера в ряду производных 1,6-бис[[бензилокси)метил]урацила (соединение **10**) было достигнуто в случае комплекса **3C6T** (исходный лиганд - 2-[3-хлор-5-(3-хлор-5-цианофенокси)фенокси]-N-(2-хлор-4-сульфамил-фенил)ацетамид). Обнаружено близкое соответствие расположения 3,5-дихлорбензильного фрагмента соединения **10** и цикла А исходного диарилэфирного ННИОТ. Согласно результатам докинга, данный фрагмент образует π -стэкинг-взаимодействия с остатками аминокислот Y181, Y188 и W229. Благоприятный эффект от введения *мета*-заместителей на ингибирование активности фермента может быть связан с продвижением цикла А глубже в область гидрофобного кармана, формируемую ароматическими аминокислотными остатками, а также образованием дополнительных Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий с остатками L234 и F227 [5; 9]. Отрицательное влияние атомов галогенов в положении 5 на активность может объясняться электростатическим отталкиванием между ними и атомом кислорода мостиковой цепочки в положении 6, приводящем к изменению оптимальной конформации последней. Атом кислорода амидной группы остатка урацила способен к формированию водородной связи с NH-фрагментом остатка K103, при этом расстояние

между центрами атомов O и N оценивается в 3,2 Å, что несколько больше (2,8 Å) расстояния между атомом кислорода карбонильной группой оксиацетамидного фрагмента модельного ингибитора и атомом азота в том же аминокислотном остатке фермента, однако не превышает дистанцию Ван-дер-Ваальса. Согласно результатам докинга, возможно также формирование дополнительной водородной связи между атомом азота в амидном фрагменте урацила (N³) и амидным функцией остатка K101 (рисунок 2).

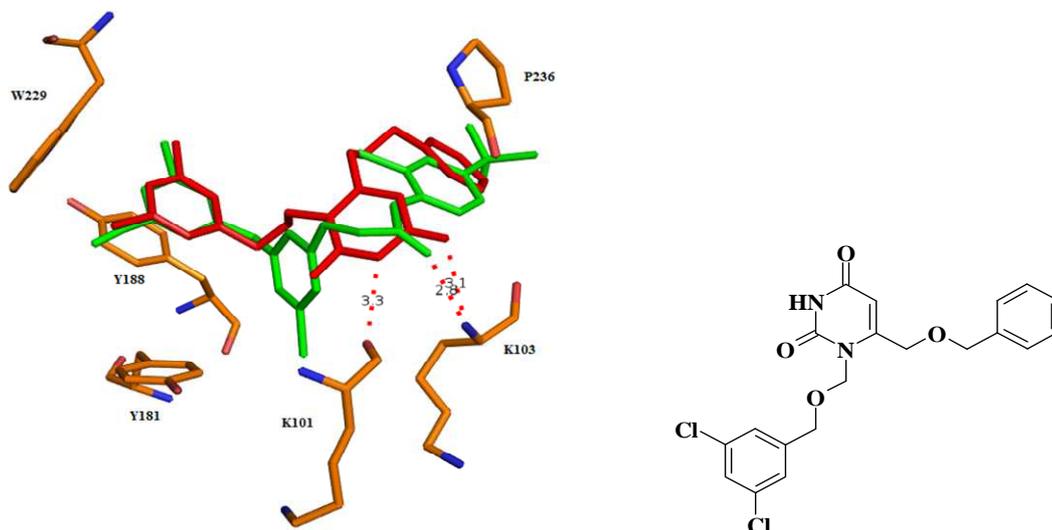


Рисунок 2 – Возможная конформация 6-[(бензилокси)метил]-1-[(3,5-дихлорбензилокси)метил]урацила (**10**, выделен красным) в наложении с диарилэфирным ННИОТ (PDB-код **3С6Т**, выделен зеленым) в аллостерическом сайте ОТ дикого типа ВИЧ-1

Выводы

Среди производных 1,6-бис[(бензилокси)метил]урацила были обнаружены высокоактивные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1, проявляющие активность на субмикромольном уровне. Полученные соединения являются перспективными для дальнейшего изучения и внедрения в практику.

Настоящая работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 13-04-01391).

Список литературы

1. Синтез 1,6-бис[(бензилокси)метил]производных урацила и их 1-алкоксиметильных аналогов / А.Н. Гейсман [и др.] // Фундам. исслед. – 2013. – № 10-15. – С. 3477-3480.

2. Action of pancreatic DNase: requirements for activation of DNA as a template-primer for DNA polymerase / E. Baril [et al.] // *Nucleic Acid Res.* – 1977. – Vol. 4, № 8. – P. 2641-2654.
3. Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptase with picomolar inhibitors reveal key interactions for drug design / K.M. Frey [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 134, № 48. – P. 19501-19503.
4. Diphenyl ether non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors with excellent potency against resistant mutant viruses and promising pharmacokinetic properties / Z.K. Sweeney [et al.] // *ChemMedChem.* – 2009. – Vol. 4, № 1. – P. 88-99.
5. Discovery of 3-{5-[(6-amino-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl)methoxy]-2-chloro-phenoxy}-5-chlorobenzonitrile (MK-4965): a potent, orally bioavailable HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor with improved potency against key mutant viruses / T.J. Tucker [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51, № 20. – P. 6503-6511.
6. Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constant // *Biochem. J.* – 1953. – Vol. 55, № 1. – P. 170-171.
7. High potency improvements to weak aryl uracil HCV polymerase inhibitor leads / P. Donner [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 23, № 15. – P. 4367–4369.
8. Picomolar inhibitors of HIV reverse transcriptase featuring bicyclic replacement of a cyanovinylphenyl group / W.-G. Lee [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – Vol. 135, № 44. – P. 16705-16713.
9. Structural basis for the improved drug resistance profile of new generation benzophenone non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors / J. Ren [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51, № 16. – P. 5000-5008.

Рецензенты:

Ганичева Л.М., д.фарм.н., доцент кафедры управления и экономики фармации, медицинского и фармацевтического товароведения Волгоградского государственного медицинского университета, г. Волгоград.

Симонян А.В., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической технологии и биотехнологии Волгоградского государственного медицинского университета, г. Волгоград.