© Коллектив авторов, 2015

С. В. Печинский[1], *А. Г. Курегян*[1], *А. А. Озеров*[2], *М. С. Новиков*[2]

ДИЗАЙН НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА, ОБЛАДАЮЩИХ ИНГИБИТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ МУТАНТА K103N/Y181C ВИЧ-1

[1] Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ГБОУ ВПО “Волгоградский государственный медицинский университет” МЗ РФ, Пятигорск, Россия.
[2] ГБОУ ВПО “Волгоградский государственный медицинский университет” МЗ РФ, Волгоград, Россия.

Осуществлен дизайн новых высокоактивных N^1-замещенных производных урацила из класса ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1. На основании полученных данных зависимости структура – активность построена компьютерная модель ингибирующей активности обратной транскриптазы мутанта K103N/Y181C ВИЧ-1. Синтезированы новые соединения, превосходящие по своей активности невирапин.

Ключевые слова: анти-ВИЧ-1 активность; мутантные штаммы; ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы; производные урацила; молекулярный докинг.

Несмотря на огромные усилия, предпринимаемые мировым научным сообществом, проблема лечения инфекции ВИЧ-1 остается одной из наиболее значимых в современной медицине. Более 35 млн человек во всем мире, в том числе более 700 тыс. в России [1], инфицированы ВИЧ-1 и нуждаются в высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ), которую могут обеспечить 6 классов лекарственных препаратов: нуклеозидные (нуклеотидные) (НИОТ) и ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ), а также ингибиторы протеазы, интегразы, слияния и антагонисты CCR5 рецепторов [2, 3].

Целью настоящего исследования является направленный поиск новых высокоактивных ННИОТ в отношении мутанта K103N/Y181C ВИЧ-1.

Преимуществом ННИОТ является их высокая противовирусная активность, однако существенный недостаток состоит в быстром появлении резистентных мутантов, которые возникают ввиду невысокой точности транскрипции обратной транскриптазой вирусной ДНК с РНК. Мутации приводят к изменениям, в том числе и в активном сайте связывания ННИОТ, что обусловливает снижение эффективности, а иногда и возникновение резистентности [4]. Одна из наиболее распространенных и клинически значимых — это двойная мутация K103N/Y181C ВИЧ-1, возникающая при применении ННИОТ, что приводит к снижению в несколько раз эффективности таких препаратов, как невирапин и эфавиренц. Эта мутация характеризуется заменой аспарагина в положении 103 на лизин и цистеина на тирозин в положении 181, что приводит к изменению конфигурации активного центра связывания НИИОТ [5].

Одним из наиболее эффективных методов компьютерного моделирования взаимодействия лиганда с белком является молекулярный докинг, который позволяет количественно оценивать силу такого взаимодействия. В исследованиях использовали программу ArgusLab, GA Dock, разработанную Mark Thompson, Planaria Software Seattle [6], WA, оптимизацию пространственной структуры лиганда выполняли полуэмпирическим методом PM3 с помощью программного комплекса GAMESS [7]. Такое сочетание позволило добиться наиболее точного моделирования взаимодействия лиганд — белок.

За основу была взята компьютерная модель взаимодействия экспериментального вещества, близкого по строению к исследуемым соединениям, с обратной транскриптазой двойного мутанта K103N/Y181C, построенная на основании кристаллографического снимка с величиной разрешения 2,9 Å (PDB код: 4H4O) [8]. Сопоставление полученных прогнозов проводили с результатами скрининга ряда производных урацила in vitro на клеточных культурах человеческих Т-лимфоцитов МТ-4, инфицированных штаммом двойного мутанта K103N/Y181C ВИЧ-1 [9].

Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C полученных соединений регистрировали на спектрометре Bruker AMXIII-400 в растворе ДМСО-d_6, внутренний стандарт ТМС. Интерпретацию спектров осуществляли с помощью лицензионной программы ACD/HNMR PredictorPro 3.0 фирмы Advanced Chemistry Development (Канада). Анализ методом ТСХ проводили на пластинах “Sorbfil”, элюент — 2-пропанол, проявитель — пары йода.

Температуры плавления полученных соединений измерены в стеклянных капиллярах на приборе Mel-Temp 3.0 (Laboratory Devices Inc., США).

Общая методика синтеза производных урацила

2,4-ди(триметилсилилокси)пиримидин в количестве 20 – 25 ммоль, полученный из урацила, тимина или 6-метилурацила путем кипячения в избытке гексаметилдисилазана, нагревают с эквимолярным количеством соответствующего 1-бром-2-(2-бензоилфенокси)-этана или 1-бром-2-(2-бензилфенокси)этана при температуре 160 – 170 °C в течение 2 ч, охлаждают, обрабатывают смесью, состоящей из 40 мл этилацетата и 10 мл 2-пропанола, перемешивают 30 мин при комнат-

ной температуре, фильтруют и упаривают. Остаток перекристаллизовывают из 2-пропанола или его смеси с диметилформамидом (1:1) и получают соединения **I** – **XIX** (таблица), выход конечного продукта составил 62 – 83 % [10].

Экспериментальная биологическая часть

Исследование анти-ВИЧ-1 активности *in vitro* проводили в культуре CEM-SS-клеток, которые суспендировали в культуральной среде в количестве 10^5 клеток/мл и инфицировали штаммом двойного мутанта K103N/Y181C ВИЧ-1. Немедленно, после инфицирования, вносили растворы, содержащие различные концентрации исследуемого вещества в ДМСО, и инкубировали в течение 4 сут при температуре 37 °C. Число живых клеток устанавливали по окончании инкубации при помощи бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия, при этом определяли концентрацию вещества, которая на 50 % защищала CEM-SS-клетки от цитопатического эффекта ВИЧ-1 (EC_{50}), точность определения составила не менее 10 % [11].

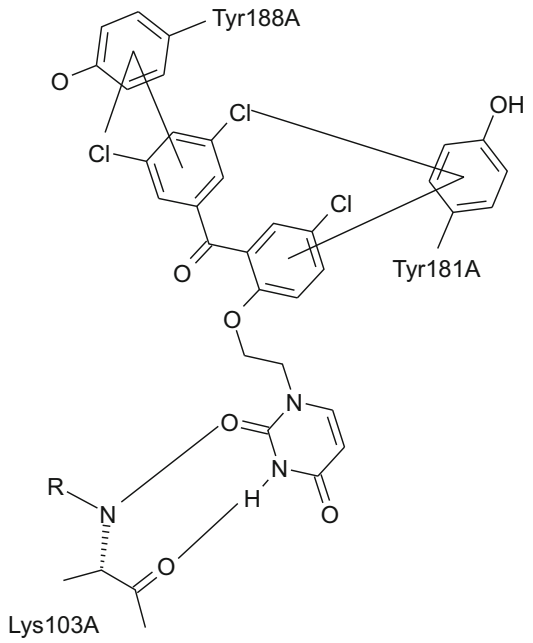


Рис. 1. Расположение соединения **XVI** в активном центре обратной транскриптазы

Результаты и их обсуждение

Большинство клинически значимых мутаций приводит к изменению последовательности аминокислот именно в активном центре связывания, поэтому при поиске новых соединений необходимо учитывать их гибкость, то есть возможность “покачивания” и “перемещения” структурных фрагментов молекулы. Такая концепция “стратегической гибкости” позволяет вести поиск потенциально активных соединений относительно большого количества мутаций. Поиск высокоактивной структуры проводили на основе N^1-замещенных производных урацила, которые ранее продемонстрировали выраженную активность в отношении “дикого” штамма и различных мутантных штаммов ВИЧ-1 [9, 11].

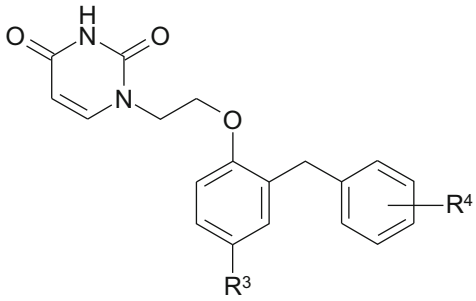
На первом этапе были исследованы соединения, которые использовали для корректировки модели в качестве обучающей выборки. Результаты исследования их анти-ВИЧ-1 активности *in vitro* использовали для проверки корректности построенной компьютерной модели, описывающей взаимодействия лиганда с белком. При построении компьютерной модели было установлено, что наиболее значимым является связывание ингибитора с аминокислотой лизин 103, которое происходит за счет наличия в структуре урацила. Моделирование взаимодействия лиганд-белок выявило, что необходимо учитывать не только гибкость лиганда, но и гибкость белка, которая играет значительную роль. Установлено, что структура белка адаптируется к действию лиганда и может образовывать комплементарную форму, при этом границы кармана связывания “окружают” ингибитор. Локальные изменения в структуре белка могут объяснить взаимодействие лиганда с тирозином в положении 188, которые компенсируют потери гидрофобного взаимодействия, вызванного мутацией Y181C. Это взаимодействие является вторым ключевым фактором связывания белок – лиганд. Внесение в модель факторов гибкости как лиганда, так и белка позволило существенно повысить точность прогноза, а также разработать стратегию дизайна новых высокоактивных соединений этой группы. Расположение соединения **XVI** в активном центре обратной транскриптазы показано на рис. 1.

Модель, построенная на закономерности между ингибирующим действием и энергией докинга, не во всех случаях позволяла проводить адекватный прогноз. Это было связано с тем, что даже небольшое изменение структуры молекулы ингибитора иногда приводило к полной потере ингибирующей активности, поэтому для прогноза было предложено использовать многофакторную скоринговую функцию. Она включала в себя оценку не только энергии докинга, но и большего количества факторов, среди которых длина и количество водородных связей, липофильность лиганда, угол отклонения заместителя при атоме азота N^1 от плоскости урацила, а также гибкость взаимодействия лиганд — белок, которое оценивали по изменению длины связей в области взаимодействия (рис. 1). Расчет многофакторной скоринговой функции выполняли по формуле:

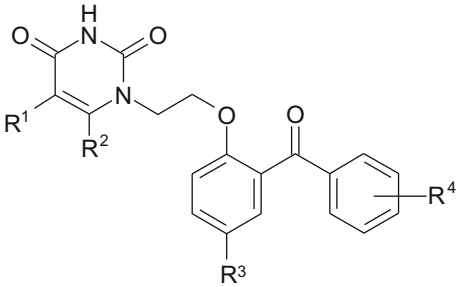
$$S = k_1F_1 + k_2F_2 + \ldots + k_nF_n,$$

где k — значение коэффициента, показывающего степень влияния на взаимодействие лиганд — белок; F — фактор, влияющий на взаимодействие лиганд — белок.

По результатам эксперимента проводили ранжирование факторов, каждому фактору присваивалось максимальное значение баллов, исходя из степени их влияния на процесс связывания лиганд — белок. Степень влияния факторов, а также его выражение в бал-



I – VI



VII – XIX

Рис. 2. Структурные формулы исследованных N^1-замещенных производных урацила

лах устанавливали по результатам анализа обучающей выборки, включающей в себя соединения **I – XIV** (таблица). Такой подход учета степени влияния различных факторов на ингибирующие свойства лиганда позволил существенно повысить точность прогнозов разработанной модели. На основании прогнозов разработанной модели были изучены соединения **XV – XIX** (таблица, рис. 2). В качестве препаратов сравнения использовали невирапин и эфавиренц.

Для поиска новых высокоактивных ННИОТ была изучена взаимосвязь между структурой и активностью различных кандидатов с помощью компьютерного моделирования. Понимание того, как изменение структуры влияет на способность веществ ингибировать обратную транскриптазу, поможет в создании новых высокоактивных соединений этой группы.

В результате проведенных исследований установлено, что использование для прогноза активности многофакторной скоринговой функции повышает точность прогноза по сравнению с использованием энергии докинга. Например, для изученных на втором этапе соединений **XV – XIX** расчет по энергии докинга не позволил спрогнозировать резкое падение активности для соединений **XV** и **XVII**, тогда как при использовании многофакторной скоринговой функции прогноз был очень близок к результатам *in vitro*.

Компьютерная модель на основании многофакторной скоринговой функции позволила с высокой точностью спрогнозировать ингибирующие свойства еще не синтезированных соединений. Синтез этих соединений и тесты *in vitro* подтвердили прогноз модели. Такой подход виртуального скринига еще не синтезированных соединений позволяет существенно сократить время поиска новых высокоактивных веществ, а также расширить понимание взаимосвязи структура — активность. Этот подход особенно актуален при разработке противовирусных препаратов в связи со стремительным возникновением резистентных штаммов.

Активность N^1-замещенных производных урацила в отношении мутанта K103N/Y181C ВИЧ-1 *in vitro* **и** *in silico*

Соединение	R^1	R^2	R^3	R^4	EC_{50}, μM	Энергия докинга, ккал/М	Количество баллов по многофакторной скоринговой функции
I	H	H	Me	H	–	–	–
II	H	H	Me	3-Me	–	–	–
III	H	H	Me	3,5-Me_2	–	–	–
IV	H	H	Cl	3,5-Me_2	> 200	— 10,314	224
V	H	H	Br	3,5-Me_2	–	— 8,235	–
VI	H	H	Me	H	> 357	— 9,016	82
VII	H	H	F	H	171	— 11,420	301
VIII	H	H	Cl	H	> 337	— 10,642	96
IX	H	H	Br	H	> 301	— 9,859	154
X	H	H	Cl	3-Me	52	— 13,536	877
XI	H	H	Me	3,5-Me_2	> 179	— 10,899	278
XII	H	H	Cl	3,5-Me_2	> 313	— 9,802	103
XIII	H	H	Br	3,5-Me_2	> 282	— 9,011	178
XIV	H	H	Br	3,5-Me_2	24,8	— 14,372	1564
XV	H	H	Cl	3,5-F_2	> 307	— 14,840	132
XVI	H	H	Cl	3,5-Cl_2	1,13	— 16,537	11516
XVII	H	H	Cl	3,5-Br_2	> 237	— 13,204	206
XVIII	Me	H	Cl	3,5-Me_2	4,09	— 15,155	8018
XIX	H	Me	Cl	3,5-Me_2	4,09	— 15,206	8102
Невирапин	–	–	–	–	> 15	— 14,023	2097
Эфавиренц	–	–	–	–	0,56	— 17,227	13388

ЛИТЕРАТУРА

1. HIV / AIDS.: http: // www.who.int / topics / hiv aids / en.
2. T. L. Hartman, R. W. Buckheit, *Mol. Biol. Int.*, 1 – 17 (2012).
3. D. Li, P. Zhan, E. De Clercq, and X. Liu, *J. Med. Chem.*, **55**, 3595 – 3613 (2012).
4. J. E. Gallant, *Int. AIDS Soc. USA Top. HIV Med.*, **13**(5), 138 – 142 (2005).
5. K. Das, J. D. Bauman, A. D. Clark, et al., *Nat. Acad. Sci. USA*, **105**(5), 1466 – 1471 (2008).
6. ArgusLab, GA Dock [электронный ресурс]; Режим доступа: http: // www.arguslab.com / arguslab.com / ArgusLab.html.
7. GAMESS [электронный ресурс]; Режим доступа: http: // www.msg.chem.iastate.edu / gamess / download.html.
8. K. M. Frey, M. Bollini, A. C. Mislak, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 19501 – 19503 (2012).
9. M. S. Novikov, O. N. Ivanova, A. V. Ivanov, et al., *Bioorg. Med. Chem*, **19**, 5794 – 5902 (2011).
10. А. А. Озеров, М. С. Новиков, А. И. Луганченко и др., *Волгоградск. научно-мед. журн.*, № 4, 15 – 18 (2012).
11. R. W. Buckheit, E. L. White, V. Fliakas-Boltz, et al., *Antimicrob. Agents Chemother*, **43**, 1827 – 1834 (1999).

Поступила 22.07.14

DESIGN AND SYNTHESES OF NEW URACIL DERIVATIVES POSSESSING INHIBITORY ACTIVITY WITH RESPECT TO REVERSE TRANSCRIPTASE OF RESISTANT HIV-1 MUTANT

S. V. Pechinskii[1], A. G. Kuregyan[1], A. A. Ozerov[2], and M. S. Novikov[2]

[1] Pyatigorsk Medico-Pharmaceutical Institute, Branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, 357532 Russia.

[2] Volgograd State Medical University, Volgograd, 400131 Russia.

We have designed and synthesized a series of new, highly active N^1-substituted uracil derivatives representing non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) of HIV-1. Using the obtained data about structure – activity relationship, a computer model of the inhibitory activity with respect to reverse transcriptase of K103N/Y181C HIV-1 mutant has been constructed. On this basis, new compounds have been synthesized with NNRTI activity exceeding that of nevirapine.

Keywords: anti-HIV-1 activity; mutant strains; non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; uracil derivatives; molecular docking.