

## Дизайн потенційних інгібіторів транскрипції на основі похідних 6-аза-цитозину та 6-аза-ізоцитозину.

### Неемпіричний квантово-хімічний структурний аналіз, синтез та фізико-хімічні дослідження

Л. Г. Пальчиковська, М. О. Платонов, І. В. Алексєєва, А. Д. Швед

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

*Вперше квантово-хімічним методом ab initio на рівні теорії B3LYP/6-31G(d,p)//HF/6-31G(d,p) виявлено високий ступінь ізомерії — таутомерної та конформаційної мінливості амінопохідних 6-аза-ізоцитозину. Цей факт дозволяє припустити «універсальний» характер останніх, тобто здатність утворювати пари як із канонічними пуриновими, так і піримідиновими основами. Методом направлено синтезу, спираючись на теоретичний конформаційний аналіз, реалізовано спрямований дизайн потенційних інгібіторів ферментів біосинтезу нуклеїнових кислот на основі функціонально заміщених 3- та 5-похідних ас-триазину. Експериментально визначено, що електроноакцепторні властивості арильного фрагмента синтезованих сполук «провокують» суттєвий зсув центрів підвищеної електронної густини молекул ас-триазинів, що сприяє досить вільній міграції NH-протонів та безпосередньо впливає на таутомерний статус ас-триазинів.*

**Вступ.** Розширення арсеналу лікарських засобів є чи не єдиним шляхом ефективного вирішення проблеми множинної стійкості нових мутантних форм збудників інфекцій до сучасних терапевтичних препаратів.

Азотовмісні гетероциклічні основи, у тому числі пуринові та піримідинові, вважаються ефективними фармакофорами і входять до складу сучасних ліків [1, 2]. Завдяки хімічним перетворенням вищезгаданих основ створено низку нуклеозидних та нуклеозидних інгібіторів, які пригнічують ферментні системи біосинтезу та функціонування нуклеїнових кислот (НК) [3, 4].

Останнім часом виникла нова хвиля інтересу

до нуклеозидних інгібіторів — модифікованих піримідинів, особливо їхніх 6-ариламінопохідних [5—11].

Молекулярні механізми дії цих інгібіторів запропоновано в роботах [5, 8—11], авторами яких показано, що 6-ариламіно(гідрazo)піримідини утворюють неканонічні пари з цитозином ДНК матриці, конкуруючи за зв'язування з пуриновими нуклеотидами, тоді як арильний радикал (гідрофобний фрагмент) інгібітора взаємодіє з «рецептором» полімерази у сайті dNTP-пізнавання, утворюючи та фіксуючи потрійний непродуктивний комплекс.

Метою цієї роботи було конструювання потенційних нуклеозидних інгібіторів на платформі азапіримідинових основ (триазини з оксо-, тіоксо-і аміногрупами), які є основними антиметаболітами

та біоізостерами природних піримідинів і можуть імітувати їх у біохімічних системах живої клітини [11—13]. Квантово-хімічні розрахунки ізольованих молекул триазинів та їхніх асоціатів з канонічними основами є правомірними, оскільки перебіг ферментативних процесів передбачає лише каталітично необхідні кількості води (1—2 молекули), тобто такі умови подібні до гідрофобних умов реакцій у газовій фазі [18].

Неемпіричний квантово-хімічний конформаційний аналіз, проведений на високому рівні теорії, дозволив відібрати структурні моделі найвигідніших конфігурацій інгібіторів, подальший синтез яких та спектроскопічні і біологічні дослідження дали відповідь щодо їхніх властивостей.

**Матеріали і методи.** В роботі використано: аміни фірми «Merck» (Німеччина) із вмістом основної сполуки 97—99 %, абсолютизовані розчинники вітчизняного виробництва — ізопропанол (i-PrOH), етанол (EtOH), диметилформамід (DMF). Перебіг реакції та чистоту отриманих речовин контролювали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках «Merck» у системах метанол:хлороформ (1:9), ізопропанол:аміак:вода (7:1:2).

Температуру топлення сполук визначали на приладі Боетіуса (Німеччина).

Спектри ЯМР записували на спектрометрі «VARIAN»-300 (США) в DMSO-d<sub>6</sub> з використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту. УФ спектри поглинання розчинів сполук реєстрували на спектрофотометрі Specord UV-VIS («Carl Zeiss», Німеччина). Вихідні сполуки 3-бензилмеркапто-6-метил-1,2,4-триазин-5(4H)-он та 5-метилмеркапто-1,2,4-триазин-3(2H)-он одержано за методиками [14—16].

*Напівемпіричні квантово-хімічні розрахунки* проводили за методом РМ3, неемпіричні — методом *ab initio* на рівні теорії B3LYP/6-31G(d, p)//HF/6-31G(d, p). Використано програмний пакет GAMESS (US) [17].

*Загальна методика отримання N-заміщених похідних 5-метил-6-аза-ізоцитозину.* Суміш 2,34 г (10 ммоль) 3-бензилмеркапто-6-метил-1,2,4-триазин-5(4H)-ону та 18 ммоль аміну розчиняли у 35 мл етанолу (або ізопропанолу) та кип'ятили протягом декількох годин. Продукт реакції видаляли фільтруванням. Кристалізацію проводили з суміші розчинників.

*Загальна методика отримання N-заміщених 6-азацитозину.* До розчину 1,45 г (10 ммоль) 5-метилмеркапто-1,2,4-триазин-3(2H)-ону в 10 мл

i-PrOH додавали розчин 15 ммоль амінокомпоненти в 10 мл того ж розчинника. Синтез проводили при температурі 80 °С, контроль за перебігом реакції здійснювали за допомогою ТШХ. Після завершення синтезу реакційну суміш охолоджували до температури 0 °С. Осад, що утворився, фільтрували, висушували та перекристалізовували із зручного розчинника. Фізико-хімічні характеристики одержаних сполук наведено в табл. 1 і 2.

**Результати і обговорення.** Наші зусилля були спрямовані на конструювання похідних 6-азапіримідинів, які за біологічними властивостями були б подібні до дії 6-ариламінопіримідинів. Потрібно було з'ясувати, чи здатні функціонально заміщені триазини утворювати міцні водневі (H) зв'язки з матричною основою, а фармакофорні замісники — мати склад, будову та просторову орієнтацію, ізоморфну «кишені» ферменту для розміщення і утримання ароматичного домену.

Як модельні було обрано структури триазинових молекул, що містили арил- та ариалкільні залишки у положеннях 3 та 5 гетероциклу (N-феніл- та N-бензилпохідні 6-азацитозину (6-aza-Cyt), 6-аза-ізоцитозину (6-aza-isoCyt) і 5-метил-6-аза-ізоцитозину (5Me-6-aza-isoCyt)). Зауважимо, що такий позиційний вибір забезпечує найширший діапазон донорсько-акцепторних центрів для H-зв'язування.

Геометрії вищезазначених сполук оптимізували напівемпіричними та неемпіричними квантово-хімічними методами.

До квантово-хімічних розрахунків залучали не лише сконструйовані базові молекули, але і їхні таутомерні форми. Останні моделювали для виявлення найоптимальнішої геометрії молекули при утворенні пари з природною основою. Отриманий енергетичний ряд має дати уявлення про поведінку субстанції, а саме — про свободу її таутомерної та просторової інтерконверсії [19].

За даними квантово-хімічного аналізу, одержаними з використанням неемпіричного методу, бензиламінопохідне 6-aza-isoCyt займає особливе місце у низці досліджуваних структур.

Вісім енергетично найвигідніших його ізомерів (рис. 1, 7 (*a*—*z*; *a*\*—*z*\*)) мають невеликі значення відносних енергій, які знаходяться в межах 0—1,7 ккал/моль. Ряд містить чотири прототропних таутомери та їхні чотири поворотних конформери, що відрізняються орієнтацією бензильного фрагмента відносно зв'язку C3-екзо-N3. На нашу думку, насамперед, мобільна електронна будова моле-

Таблиця 1

Фізико-хімічні характеристики синтезованих 3-меркапто- та 3-амінозаміщених похідних 6-метил-1,2,4-триазин-5(4Н)-ону

Сполука	Вихід, %	t <sub>топл</sub> , °С	УФС у метанолі, λ <sub>пак</sub> , нм (ε)	<sup>1</sup> Н ЯМР, хімічний зсув, δ (м. ч.)				
				N <sub>2</sub> H	N <sub>3</sub> <sup>екзо</sup> H	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	Інші протони
2	90	192—194	224 (21800), 294 (6200)	13,610 с	—	4,42 с	2,140 с	7,35 м
3	87	325—329	200 (25200), 241 (4800)	11,678*	6,517 (2H)	—	2,030 с	—
4	80	314—315	205 (8500), 247 (6700)	11,747 с	8,959 с	—	2,079 с	7,5 д; 7,3 т; 7,0 т
5	70	295—300	213 (6975), 259 (7900)	11,705 с	8,860 с	—	2,301 с; 2,072 с	7,358 д; 7,077 д
6	67	308—311	212 (14120), 260 (16100)	11,879 с	9,146 с	—	2,084 с	7,549 д; 7,277 д
7	82	275—278	220 (11300), 246** (4400)	11,710 с	7,204 уш	4,44 т	2,020 с	7,3+7,215 м
8	75	238—241	218 (10700), 250** (5640)	11,923 с	7,352 д	4,449 т	2,021 с	8,437 д; 7,246 д
9	50	252—255	220 (10570), 247** (5730)	11,450 с	6,743 с	3,41 т	2,012 с	3,91—3,71 м; 1,86—1,52 м

Примітка. \*Протон, що обмінюється; \*\*прихований максимум (плече); с — синглет; д — дублет; т — триплет; м — мультиплет; уш — уширений синглет; t<sub>топл</sub> сполук: 3 — > 300 °С [23], 4 — 317 °С [20], 7 — 280 °С [15].

кули, яка сприяє досить вільній міграції протона і відбивається у значній зміні величин дипольного моменту кожного ізомеру, та присутність метилевої ланки біля замісника, яка збільшує нежорсткість молекули в цілому, — це саме ті чинники, що обумовлюють легкість її таутомерних та стеричних перетворень.

Що стосується інших представників амінозаміщених як 6-aza-isoCyt, так і 6-azaCyt, то такого широкого спектра енергетично близьких ізомерів не спостерігається ані для бензиламіно-, ані для феніламінопохідних 6-аза-основ. Для феніламінопохідних 6-aza-isoCyt маємо п'ять ізомерів (рис. 1, 4a—4z), у тому числі чотири прототропних таутомери і один поворотний конформер таутомера 4a, у діапазоні значень відносних енергій від 0 до 4,2 ккал/моль, відносна енергія трьох інших таутомерів (4b\*—4z\*) перевищує 7 ккал/моль.

Феніламіно- (11a, 11b; 11a\*, 11b\*) та бензиламіно- (12a, 12b; 12a\*, 12b\*) похідні 6-azaCyt утворюють по чотири ізомери (два прототропних таутомери і два поворотних конформери) у межах значень відносної енергії від 0 до 3 ккал/моль з наступним суттєвим її підвищенням (9,5 та 7,5 ккал/моль відповідно).

Переважає більшість отриманих таутомерів має позиційне розміщення донорських і акцепторних центрів відповідно піримідиновим основам і лише два таутомери — 4z\* та 7b — імітують гуанозин, причому поворотний конформер 4z\* є високоенергетичним конформером до прототропного таутомеру 4z, який є останнім у цій низці таутомерів.

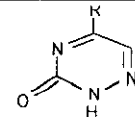
У цілому, найвигідніші таутомерні форми (структурно і енергетично) досліджуваних сполук у більшості випадків реалізуються завдяки міграції атома водню між атомами азоту, утворюючи, у тому числі, молекули *para*-хіноїдної структури (4b та 7a\*).

Енольні таутомери, за даними розрахунків, виявилися менш поширеними серед інших.

Нижче обговорюється синтез амінозаміщених похідних 6-aza-isoCyt і 6-azaCyt та їхня будова.

Загальним методом введення функціональних груп в електрондефіцитні положення триазинового кільця є активоване нуклеофільне заміщення атома водню або реакційноздатних груп. Що стосується синтезу 3(5)-амінотриазинів, то їх одержують, зазвичай, обміном метилмеркапто-, метокси- або метилсульфонільної груп [20].

Таблиця 2  
Спектральні характеристики амінозаміщених-6-азацитозину



10-24

№ по рядку	R	УФС (H <sub>2</sub> O), нм	<sup>1</sup> H ЯМР, δ, м. ч.	
			Протони триазинової основи	
			N2H	N4H, N5 <sup>екзо</sup> H
10	Hβ-N-Hα	258; 205	11,97 с	7,685 Hα; 7,734 Hβ
11		308; 237; 212	12,25 с	10,25 с
12		269	11,739 с	8,632 с
13		309; 238; 213	12,15 с	10,101 с
14		310; 235; 209	12,070 с	10,070 с
15		310; 236; 207	12,193 с	10,275 с
16		304; 208	12,374;	10,560 с
17		277; 208	12,374 с	10,560 с
18		283; 204	11,994 с	9,481 с
19		290; 208	12,214 с	10,313 с
20		265	11,850с	8,65 уш
21*		331; 265	8,051	8,032 с
22		306	12,33 с	10,713 с
23		269; 215	11,795 с	8,240 уш
24		272; 205	10,91 с	7,30 уш

Примітка. Уш — уширений синглет; с — синглет; 21\* — аміно-енольний таутомер.

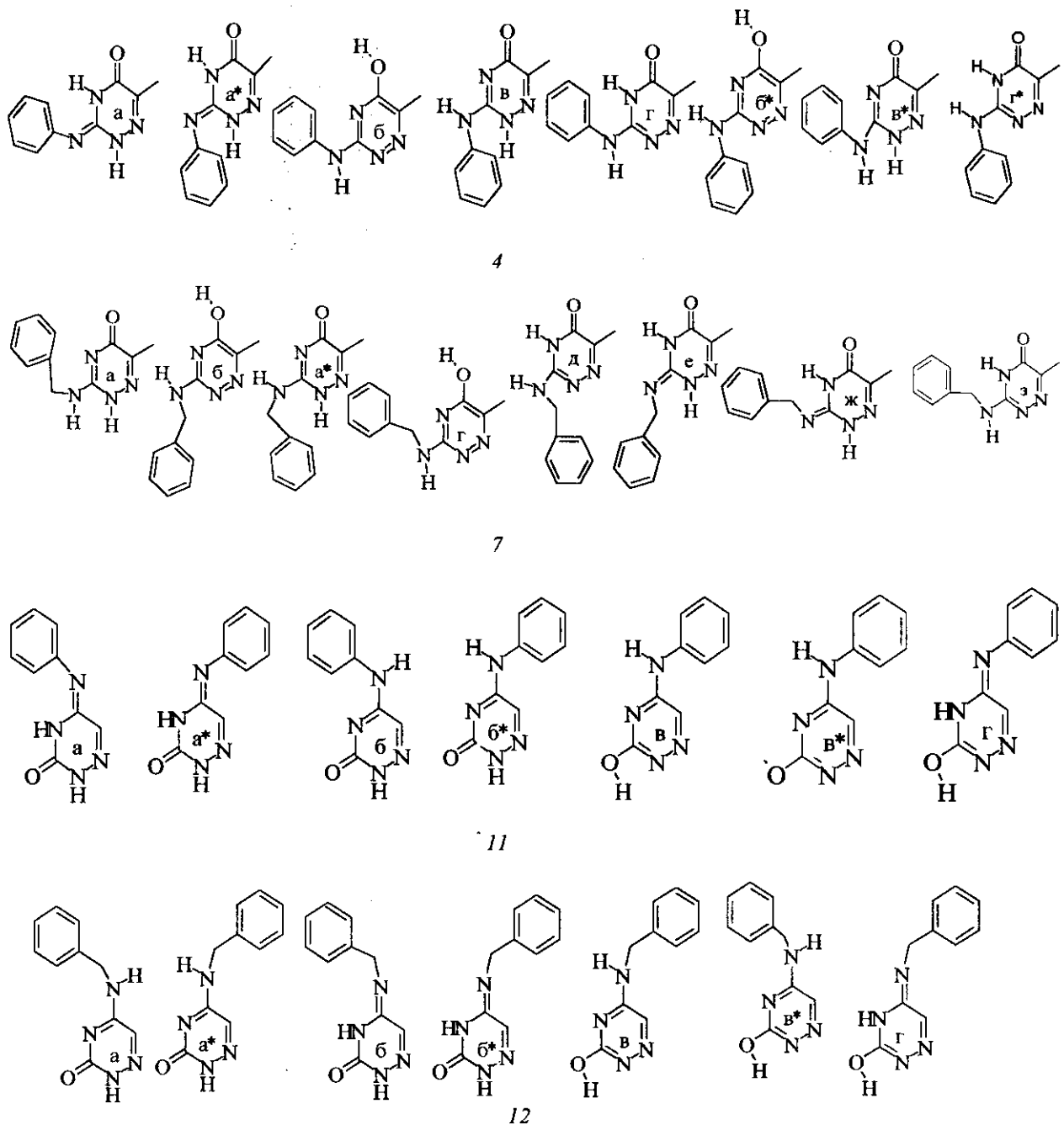


Рис. 1. Низькоенергетичні прототропні таутимери модельних сполук 4, 7, 11 та 12, отримані неемпіричним квантово-хімічним методом *ab initio* на рівні теорії V3LYP/6-31G(d, p)//HF/6-31G(d, p). Зірочкою позначено поворотні конформери відповідних прототропних таутимерів

На відміну від заміщення в положенні 5 гетероциклу, де застосовується саме обмін метилмеркапто-групи [15], реакція у положенні 3 проходить значно повільніше, навіть за жорстких температур-

них умов [14, 23], і ускладнюється утворенням побічних продуктів за рахунок розкриття гетероциклу під дією амінів, особливо у водному середовищі. Щоб уникнути вищезазначених ускладнень

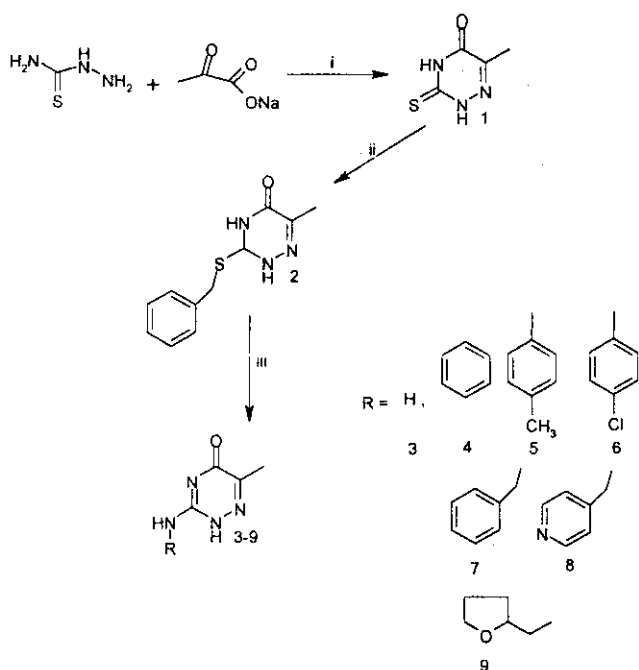


Рис. 2. Загальна схема синтезу N-амінозаміщених 5-метил-6-аза-ізоцитозину: *i* — 2н. NaOH, 60 °С, 4 г; *ii* — 2н. NaOH, хлористий бензил (1,5 екв.), 80 °С, 3 г; *iii* — ізопропанол, 1,8 екв. аміну, 80 °С

вихідною речовиною для серії 3-амінозаміщених триазинів нами визнано за доцільне застосування бензилмеркаптопохідного 2 (рис. 2), яке на відміну від 3-метилмеркаптотриазину більш зручне для подальших перетворень. Вдалий вибір вихідної речовини дозволив синтезувати 3-амінопохідні триазину (3—9) з відносно високими виходами. Одержані сполуки — кристалічні, безбарвні, з високою температурою топлення, стабільні при зберіганні, розчинність у воді та спиртах обмежена. Їхню будову визначено методами УФ та <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопії.

З аналізу спектральних даних синтезованих сполук впливає, що перебудова електронної структури у молекулах 3-амінозаміщених триазинів 3—9 відносно вихідної сполуки 2 призводить до суттєвих змін у ЯМР та УФ спектрах, які слугують джерелом інформації про таутомерний статус сполук. На основі зіставлення величин хімічних зсувів амінопротонів триазинового кільця і протонів екзо-NH-груп (похідні 3—9) з літературними даними [20] можна припустити, що вищезгадані сполуки існують у формі *para*-хіноїдних таутомерів (табл.

1). Для похідних 7—9 це припущення значно вірогідніше, оскільки сигнал метиленової групи у складі N3-замісника розщеплений *екзо*-амінопротоном. Останній реєструється у вигляді триплету, що виключає іміноформу таутомерів 7z та 7z\*.

Вивчення УФ спектрів розглянутих сполук також свідчить на користь їхньої хіноїдної будови. Основна смуга поглинання амінопохідних 2—9 знаходиться поблизу максимуму незаміщеного 6-*aza*-isoCyt або має прихований максимум у районі 250 нм, що збігається з даними для 3-амінопохідних триазин-нуклеозидів з фіксованою *para*-хіноїдною структурою [21].

Електронні спектри поглинання 5-амінозаміщених триазинів (сполуки 10—24, табл. 2) радикально відрізняються від спектрів їхніх позиційних ізомерів, що розглядалися вище. 5-Арилзамісники суттєвіше, ніж арилалкільні радикали, впливають на електронну структуру хромофору, значно зсуваючи основну смугу поглинання відносно незаміщеного триазину 10 у довгохвильову область (277—331 нм). Така розбіжність у значеннях максимумів поглинання пояснюється впливом природи і положення замісника у фенільному радикалі. У арилалкільних амінопохідних, де метиленова група є бар'єром перерозподілу електронної густини між сусідніми циклами, зсув довгохвильової смуги поглинання зменшується і дорівнює 5—14 нм. У спектрах <sup>1</sup>H ЯМР сигнал протона вторинної аміногрупи зазнає значного зсуву також залежно від природи замісника. Дезекрануюча дія фенільного радикала (сполуки 11, 13—19) спричиняє зміщення сигналу амінопротона в слабке поле (9,5—10,7 м. ч.) більше, ніж дія арилалкільного замісника (сполуки 12, 20, 23 і 24), що узгоджується з літературними даними [13]. Про присутність значної долі енольного або хіноїдного таутомеру можна стверджувати лише у випадку сполуки 21, теоретичні розрахунки для якої збігаються з експериментальними даними (див. спектри <sup>1</sup>H ЯМР).

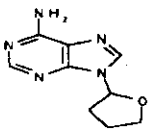
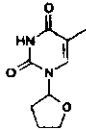
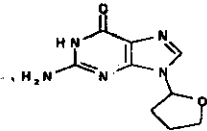
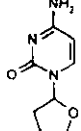
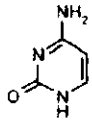
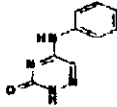
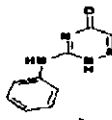
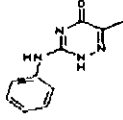
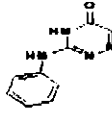
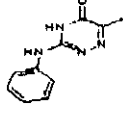
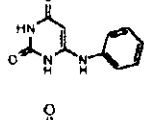
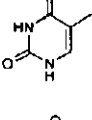
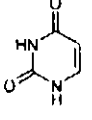
Таким чином, експериментально підтверджено, що структури одержаних N3(5)-амінозаміщених триазинів належать до родини відповідних теоретично розрахованих низькоенергетичних таутомерів.

Наступним етапом теоретичної роботи було конструювання комплементарних, водневозв'язаних пар 6-аза-основ з канонічними основами.

Спираючись на результати напівемпіричних розрахунків методом PM3 (табл. 3), з'ясовано, що похідні як 6-*aza*Cyt, так і 6-*aza*-isoCyt утворюють

Таблиця 3

Значення ентальпій водневого зв'язування (ккал/моль) у модельних парах природних нуклеозидів з канонічними основами, похідними 6-аза-основ та 6-феніламіноурацилом (за даними розрахунків методом РМ3)

ОСНОВА	Нуклеозид			
				
	7,59	7,8	12,27	9,14
	6	4,62	12,5	8,6
	7,16	3,06	11,735	2,03
	11,16	7,53	16,27	6,48
	9,49	7,82	12,4	14,62
	9,99	7,81	12,75	14,18
	7,87	6,82	10,75	12,51
	6,11	4,47	6,72	5,37
	6,12	4,45	6,82	5,29

найміцніші Н-зв'язані комплекси з гуаніном. За даними конформаційного аналізу партнерів, найвищу енергію міжмолекулярної взаємодії мають похідні 6-аза-isoCyt, яка навіть перевищує енергію

Н-зв'язування класичного інгібітора 6-ариламіноурацилу з гуаніном.

Для підтвердження та уточнення цих даних було проведено квантово-хімічні розрахунки не-

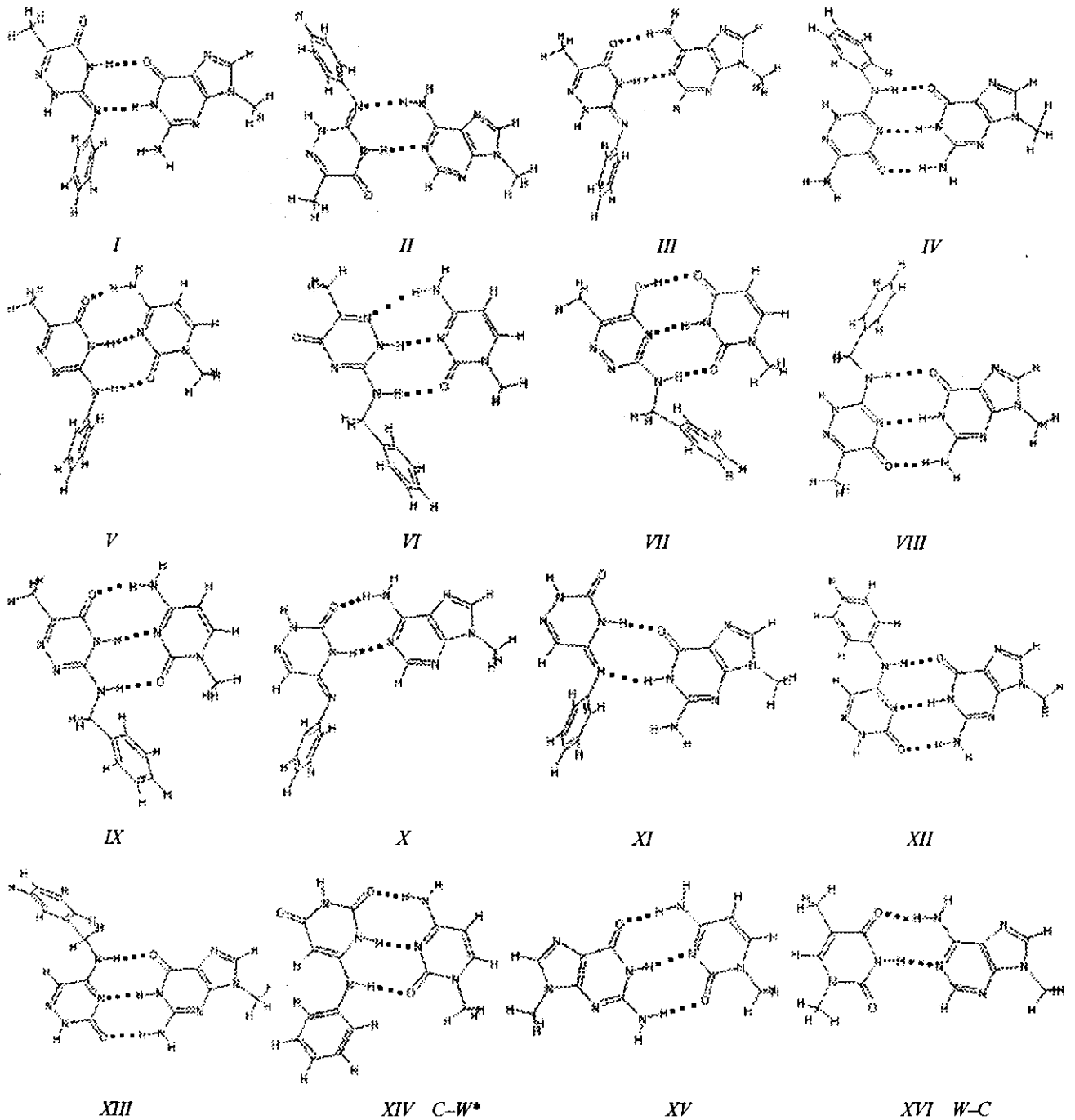


Рис. 3. Структурні та енергетичні характеристики водневозв'язаних пар канонічних основ з похідними 6-azaCyt та 6-aza-isoCyt. Геометрія пар оптимізована на рівні теорії V3LYP/6-31G(d, p)//HF/6-31G(d, p); W-C — Вотсон-Криківська пара; C-W\* — Козареллі-Райтовська пара;  $\Delta E$  — енергія міжмолекулярної взаємодії (ккал/моль); Н-зв'язки позначено пунктиром; суперпозиційну поправку не враховано: I —  $\Delta E = 15,8$ ;  $d = 7,80$  D; II —  $\Delta E = 15,66$ ;  $d = 2,0$  D; III —  $\Delta E = 17,50$ ;  $d = 7,8$  D; IV —  $\Delta E = 31,77$ ;  $d = -2,6$  D; V —  $\Delta E = 40,07$ ;  $d = 10,51$  D; VI —  $\Delta E = 22,43$ ;  $d = 13,6$  D; VII —  $\Delta E = 7,72$ ;  $d = 8,5$  D; VIII —  $\Delta E = 26,24$ ;  $d = 3,9$  D; IX —  $\Delta E = 28,0$ ;  $d = 9,9$  D; X —  $\Delta E = 15,29$ ;  $d = 6,8$  D; XI —  $\Delta E = 16,79$ ;  $d = 7,8$  D; XII —  $\Delta E = 29,67$ ;  $d = 2,7$  D; XIII —  $\Delta E = 29,33$ ;



Таблиця 4

Дані неемпіричних квантово-хімічних розрахунків на рівні теорії  $V3LYP/6-31G(d, p)/HF/6-31G(d, p)$  прототропних таутомерів модельних сполук ( $\Delta E$  — відносна енергія, ккал/моль;  $d$  — дипольний момент, D)

Таутомери	$\Delta E$	$d$
Сполука 4		
<i>a</i>	0,00	0,8
<i>a*</i>	0,29	2,2
<i>b</i>	3,90	3,0
<i>b*</i>	7,32	3,4
<i>v</i>	4,07	2,9
<i>v*</i>	11,22	3,3
<i>z</i>	4,10	5,6
<i>z*</i>	13,42	6,3
Сполука 7		
<i>a</i>	0,00	6,6
<i>a*</i>	0,47	7,2
<i>b</i>	0,43	3,6
<i>b*</i>	0,61	3,7
<i>v</i>	0,67	4,9
<i>v*</i>	1,70	5,5
<i>z</i>	0,74	2,5
<i>z*</i>	1,00	0,7
Сполука 11		
<i>a</i>	0,00	0,4
<i>a*</i>	0,68	2,0
<i>b</i>	0,86	5,0
<i>b*</i>	2,62	6,2
<i>v</i>	9,51	4,3
<i>v*</i>	11,47	6,7
<i>z</i>	19,62	2,0
Сполука 12		
<i>a</i>	0,00	5,9
<i>a*</i>	0,25	5,9
<i>b</i>	1,66	1,0
<i>b*</i>	2,70	2,3
<i>v</i>	7,14	4,1
<i>v*</i>	7,48	3,9
<i>z</i>	21,6	1,9

Примітка. Зірочкою позначено поворотний конформер відповідного прототропного таутомеру.

емпіричним квантово-хімічним методом *ab initio* на рівні теорії  $V3LYP/6-31G^{**}/HF/6-31G^{**}$ , який дає цілком прийнятне узгодження з експериментальними даними [17] і не потребує значних обчислювальних ресурсів та часу.

На рис. 3 представлено низку водневозв'язаних пар, утворених модифікованими триазинами і канонічними основами.

Для моделювання міжмолекулярної взаємодії відбирали низькоенергетичні форми таутомерів (за винятком стереоізомеру  $4z^*$ ) з просторово найвигіднішим і найзручнішим для Н-зв'язування розміщенням донорських і акцепторних центрів, а також гідрофобного фрагмента у молекулах модельних амінопохідних (4, 7, 11, 12) 6-аза-основ. Відносна енергія утворення комплексів, за винятком пари VII, свідчить про реальну можливість їхнього існування. Пари, утворені двома водневими зв'язками (I—III, X, XI), мають значення  $\Delta E$  у межах 15—18 ккал/моль, що відповідає енергії стабілізації пари А:Т(У) (10,8—14,4 ккал/моль [24]).

Для пар, утворених трьома водневими зв'язками (IV, VI—IX, XII, XIII), величина  $\Delta E$  знаходиться в межах 22—32 ккал/моль, що відповідає або перевищує значення енергії пари С:G (23—28 ккал/моль [24—25]), а пара V має винятково високу енергію міжмолекулярної взаємодії, яка дорівнює 40 ккал/моль.

Слід зазначити, що коли тип водневого зв'язка повністю збігається з існуючим у канонічній парі G:C (XV), енергія взаємодії найбільша, незважаючи на те, яку конфігурацію має пара — Вотсон-Криківську (V, VI, IX, XII, XIII) чи перевернуту Вотсон-Криківську (IV, VI, VII, X), просторове розміщення гідрофобного фрагмента у комплексах (V, VI і IX) відповідає положенню арильного замісника у парі Козареллі-Райта (XIV).

Таутомери аза-основ 4b і 11b, які утворюють комплекси, що імітують А:Т взаємодію, здатні і до неканонічного спарювання (так звані wobble-пари II, III, XI). Енергія їхнього Н-зв'язування дорівнює або перевищує верхню межу значень енергії канонічної А:Т пари, орієнтація гідрофобного фрагмента у парах III і XI відповідає шуканій. Wobble-пари, що входять до цієї низки, ілюструють значну ймовірність існування подібних структур за певних гідрофобних умов локального оточення.

Більшість амінозаміщених триазинов, залучених до утворення пар, надають перевагу Н-зв'язуванню з канонічними пуринами (рис. 2). Проте

N3-бензиламінопохідне **7** (у формі таутомерів **7a**; **7a\***; **7b**; **7в**) може виступати в ролі універсальної основи, взаємодіючи як з піримідинами (**VI**, **VII**, **IX**), так і з пуринами (**VIII**), що, на наш погляд, є наслідком низького енергетичного дефекту інтерконверсії таутомерів (наприклад, перехід **7a\*** у **7в**, тобто перенесення протона з положення N2 у N3 «коштує» всього лише 0,2 ккал/моль (табл. 4).

Таким чином, поєднання теоретичних та експериментальних досліджень виявило (у відповідності з поставленим завданням), що 3-амінопохідні 6-*aza-iso*Cyt найбільше відповідають властивостям 6-ариламіноурацилу.

Два таутомери феніл- та бензиламінопохідних 6-*aza-iso*Cyt із низки розрахованих — **4z\*** та **7в** — за своєю комплексотвірною здатністю подібні вищезгаданому інгібітору полімераза. Імітуючи пуринову основу, вони утворюють доволі міцні водневі зв'язки з цитозином — відносна енергія комплексів дорівнює 40,07 (**V**) та 28,0 ккал/моль (**IX**).

Моделювання суперпозиції пар **XIV** і **V** виявило повне суміщення обох циклів — як фенільного, так і триазинового (рис. 4, див. вклейку). Щодо суперпозиції пари **XIV** та пари **IX**, утвореної цитозином і бензиламінопохідним **7z**, то суміщення не повне за рахунок відхилення фенільного ядра пари **IX** відносно фенільного ядра 6-амінофенілурацилу (**XIV**) на кут близько 40°. Враховуючи більшу рухливість бензильного замісника таутомеру **7z**, ми вважаємо, що ця розбіжність не є критичною для відтворення біологічної активності.

Усі одержані сполуки пройшли тестування на модельній системі транскрипції *in vitro*. Отримані результати виявили вибіркочну концентраційно залежну пригнічуючу дію досліджуваних речовин на синтез РНК (матеріали біологічних досліджень буде викладено окремо).

Отже, одержані нами дані теоретичних квантово-хімічних розрахунків модельних структур у достатній мірі збігаються з експериментальними результатами. Високий ступінь таутомерної та стеричної інтерконверсії, виявлений у похідних 6-*aza-iso*Cyt, свідчить про значну структурну нежорсткість сполук цього ряду. Ці властивості дозволяють утворювати неканонічні Н-зв'язки з канонічними основами ДНК [18, 25] і можуть бути враховані при конструюванні так званих «універсальних основ», що здатні пригнічувати ферментні системи біосинтезу та функціонування НК.

**Висновки.** Вперше квантово-хімічним методом *ab initio* на рівні теорії B3LYP/6-31G(d, p)//HF/6-

31G(d, p) здійснено вичерпний конформаційний аналіз низькоенергетичних прототропних таутомерів модельних структур 3(5)-амінопохідних 1,2,4-триазинів.

Виявлено, що останні можуть виступати в ролі «універсальних основ», утворюючи Н-асоціати з канонічними піримідинами з енергією міжмолекулярної взаємодії, що дорівнює, а в деяких випадках і перевищує відповідну енергію для канонічної пари G:C.

За допомогою методів направленої синтезу, спираючись на теоретичний конформаційний аналіз, реалізовано спрямований дизайн нових інгібіторів ферментів біосинтезу нуклеїнових кислот на основі функціонально заміщених 3- та 5-похідних ас-триазинову.

Експериментально визначено, що електроноакцепторні властивості арильного фрагмента синтезованих сполук «провокують» значну рухливість центрів найвищої електронної густини молекул, що сприяє досить вільній міграції NH-протонів, яка суттєво впливає на таутомерний статус ас-триазинов.

Експериментально доведено, що теоретично розраховані низькоенергетичні таутомерні форми 6-аза-основ можуть існувати в рівноважному стані і реалізуватися в залежності від безпосереднього оточення і умов середовища.

Суперпозиція структур Н-комплексів канонічних основ з відібраними таутомерами амінозаміщеного 6-аза-ізо-цитозину зі структурою пари відомого інгібітора 6-ариламінопіримідину з цитозином підтвердила їхню тотожність, що дає підстави сподіватися і на подібність молекулярного механізму їхньої біологічної дії.

Результати квантово-хімічних розрахунків показали, що найвищу спорідненість до канонічного С має високоенергетичний поворотний конформер феніламіно-6-аза-ізо-цитозину. Ці дані не виключають як суттєву вірогідність домінування мінорного конформера, так і його участь у Н-зв'язуванні з основами за певних гідрофобних умов локального оточення.

Автори щиро вдячні доктору Д. М. Говорунові (ІМБіГ НАН України) за плідне обговорення матеріалів дослідження та О. О. Судакову і Ю. В. Бойку (Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Інформаційно-обчислювальний центр) — за користування 26-процесорним кластером для проведення комп'ютерних розрахунків.

L. H. Paľchykovska, M. O. Platonov, I. V. Alexeeva, A. D. Shved

Design of the potential transcription inhibitors based on the 6-azacytosine and 6-aza-iso-cytosine. Nonempirical quantum chemical analysis, synthesis and physico-chemical studies

#### Summary

High tautomeric and conformation variability of the 6-aza-iso-cytosine aminoderivatives has been first found by the *ab initio* quantum chemical method on the B3LYP/6-31G(d, p)//HF/6-31G(d, p) theory level. This fact allows suggesting «universal nature» of these aminoderivatives, i. e. their ability to form pairs with both purine and pyrimidine canonic nucleic bases. Proceeding from the theoretical conformation analysis based on the functionally substituted 3- and 5-aminoderivatives as-triazine through the target synthesis the design of the potential inhibitors of NA synthesis was performed. The electronoacceptor properties of the aryl fragment in the synthesized compounds were experimentally found to induce the significant displacement of the high electronic density centers within as-triazine molecule that promotes rather free migration of the NH-proton thus contributing directly to its tautomeric status.

Л. И. Пальчиковская, М. О. Платонов, И. В. Алексеева, А. Д. Швед

Дизайн потенциальных ингибиторов транскрипции на основе производных 6-азацитозина и 6-аза-изоцитозина. Неэмпирический квантово-химический структурный анализ, синтез и физико-химические исследования

#### Резюме

Впервые квантово-химическим методом *ab initio* на уровне теории B3LYP/6-31G(d, p)//HF/6-31G(d, p) выявлена высокая степень таутомерной и конформационной изменчивости у аминокислотных производных 6-аза-изоцитозина. Этот факт позволяет предположить их «универсальный характер», т. е. способность образовывать пары как с каноническими пуриновыми, так и пиримидиновыми основаниями. Методами направленного синтеза, опираясь на теоретический конформационный анализ, осуществлен дизайн потенциальных ингибиторов ферментов синтеза нуклеиновых кислот на основе функционально замещенных 3- и 5-производных *as*-триазина. Экспериментально установлено, что электроноакцепторные свойства арильного фрагмента синтезированных соединений индуцируют значительное смещение центров повышенной электронной плотности в молекуле *as*-триазина, что способствует достаточно свободной миграции NH протона, тем самым оказывая непосредственное влияние на его таутомерный статус.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Наукові основи розробки лікарських препаратів: Матеріали наукової сесії відділення хімії НАН України.—Харків: Основа, 1998.—522 с.
2. Kukhanova M., Kravetsky A., Prusoff W., Cheng Y.-C. Design of anti-HIV compound: nucleoside to nucleoside 5-triphosphate analogs. Problems and perspectives // *Curr. Pharm. Desing.*—2000.—6.—P. 585—598.
3. Gaubert G., Gosselin G., Eriksson S., Vita A., Maury G. Unnatural enantiomers of 5-azacytidine analogues; syntheses

- and enzymatic properties // *Nucleosides, Nucleotides and Nucl. Acids.*—2001.—20, N 4—7.—P. 837—840.
4. De Clercq E., Andrei G., Snoeck R., De Bolle L., Naesens L., Degreve B., Balzarini J., Zhang Y., Schols D., Leysen P., Ying C., Neyts J. Acyclic/carbocyclic guanosine analogues as anti-herpesvirus agents // *Nucleosides, Nucleotides and Nucl. Acids.*—2001.—20, N 4—7.—P. 271—286.
  5. Cozzarelli N. R., Low R. L. Mutational alteration of *Bacillus subtilis* DNA polymerase III to hydroxyphenylazopyrimidine resistance: polymerase III is necessary for DNA replication // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1973.—51, N 1.—P. 151—157.
  6. Tarantino P. M., Zhi C., Gambino J. J. 6-Anilinoaracil-based inhibitors of *Bacillus subtilis* DNA polymerase III: antipolymerase and antimicrobial structure-activity relationships based on substitution at uracil N3 // *J. Med. Chem.*—1999.—42.—P. 2035—2040.
  7. Ali A., Aster S. D., Graham D. W., Patel G. F., Gayle E., Taylor G. E., Tolman R. L., Painter R. E., Silver L. L., Young K., Ellsworth K., Geissler W., Harris G. S. Design and synthesis of novel antibacterial agents with inhibitory activity against DNA polymerase III // *Bioorg. and Med. Chem. Lett.*—2001.—7.—P. 1—4.
  8. Wright G. E., Brown N. C. Inhibition of *Bacillus subtilis* DNA polymerase III by arylhydrazinopyrimidines // *Biochim. et biophys. acta.*—1976.—432.—P. 37—48.
  9. Wright G. E., Baril E. F., Brown N. C. Butylanilinoaracil: a selective inhibitor of HeLa cell DNA polymerase alpha // *Nucl. Acids Res.*—1980.—8, N 1.—P. 99—109.
  10. Wright G. E., Baril E. F., Brown V. V., Brown N. C. Design and characterization of N<sup>2</sup>-arylamino-purines which selectively inhibit replicative DNA synthesis and replication-specific DNA polymerases: guanine derivatives active on mammalian DNA polymerase alpha and bacterial DNA polymerase III // *Nucl. Acids Res.*—1980.—10, N 14.—P. 4431—4440.
  11. Костина В. Г., Лысенко Н. А., Алексеева И. В. Синтез амидов 3-[3,5-диоксо-2,3,4,5-тетрагидро-1,2,4-триазинил-6]-пропанкарбоновой кислоты // *Укр. хим. журн.*—2003.—69, № 1—2.—С. 112—119.
  12. Bartova M., Ryba M., Jedlickova Z., Novotny L., Hrebabecky H., Beranek J. Growth inhibition of *E. coli* B by nucleoside analogs // *Collect. Czech. Chem. Commun.*—1983.—48, N 7.—P. 2088—2095.
  13. Алексеева И. В., Пальчиковская Л. И., Харченко С. Н., Башта Е. В., Платонов М. О., Костина В. Г., Усенко Л. С., Лысенко Н. А., Малько В. А. Новые производные 6-азаурацила — амиды триазинкарбоновых кислот: синтез и их антимикробная активность // *Біополімери і клітина.*—2002.—18, № 3.—С. 237—242.
  14. Gut J., Prystas M., Jonas J. Nucleic acid components and their analogues. X. Methyl derivatives of 6-azauracil thioo analogues // *Collect. Czech. Chem. Commun.*—1961.—26.—P. 986—997.
  15. Doleschall G. 1,2,4-triazines and condensed derivatives, I. Selective aminolysis of the carbonyl group of 3-methylthio-6-methyl-1,2,4-triazine-5(2H)-one // *Acta chim. acad. sci. hung.*—1967.—53, N 3.—P. 305—310.
  16. Alexeeva I., Palchikovskaya L., Shalabay A., Nosach L., Zhovnovataya V., Povnitsa O., Dyachenko N. S. N4-Amino acid derivatives of 6-azacytidine: Structure-activity relationship // *Acta biochim. pol.*—2000.—47, N 1.—P. 95—101.
  17. Schmidt M. W., Baldrige K. K., Boatz J. A., Elbert S. T., Gordon M. S., Jensen J. J., Koseki S., Matsunaga N., Nguen K. A., Su S., Windus T. L., Dupuis M., Montgomery J. A.

- The general atomic and molecule electronic structure system // *J. Comput. Chem.*—1993.—14.—P. 1347—1363.
18. *Dewar M. J. S., Storch D. M.* Alternative view of enzyme reactions // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82, N 8.—P. 2225—2229.
19. *Говорун Д. М.* Протогруппна таутомерія азотистих основ: новий погляд на стару проблему // *Біополімери і клітина.*—1997.—13, № 3.—С. 191—196.
20. *Mansour A. K., Ibrahim Y. A.* The behaviour of some derivatives of 1,2,4-triazine toward diazomethane, amines, ethyl monobromoacetate and tetra-O-acety-1- $\alpha$ -D-glucopyranosyl bromide // *J. Pract. Chemie.*—1973.—315, N 2.—P. 221—226.
21. *Hrebabesky H., Beranek J.* Reaction of 2,2'-anhydro-1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-6-azauracile, 4-chloropyrimidine and 6-chloropurine with amino acids // *Collect. Czech. Chem. Commun.*—1984.—N 11.—P. 2689—2697.
22. *Mitchell W. L., Hill M. L., Newton R. F., Ravenscroft P., Scopes D. I. C.* Synthesis of C-nucleoside isosteres of 9-(2-hydroxy-ethoxymethyl)guanine (Acyclovir) // *J. Heterocyclic Chem.*—1984.—21.—P. 697—699.
23. *Pitha J., Fiedler P., Gut J.* Nucleic acids components and their analogues. LXXXII. The fine structure of 6-aza-isocytosine and its derivatives // *J. Coll. Czech. Chem. Commun.*—1966.—31, N 5.—P. 1864—1871.
24. *Lai C.-C., Shen C.-C., Hu C.-H.* A Comparative Study of Hydrogen Bonding Using Density Functional Theory // *J. Chinese Chem. Soc.*—2001.—48.—P. 145—152.
25. *Веркин Б. И., Янсон И. К., Суходуб Л. Ф., Теплицкий А. Б.* Взаимодействие биомолекул. Новые экспериментальные подходы и методы.—Киев: Наук. думка, 1985.—164 с.

УДК 547.874:541.427  
Надійшла до редакції 27.11.03