

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.113.7

ЛИГАНДЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ОПРЕДЕЛЕННЫМ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ ПАР ОСНОВАНИЙ ДНК. XIX. СИНТЕЗ,
СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ, ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ
И БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ
СИММЕТРИЧНЫХ ДИМЕРНЫХ ТРИСБЕНЗИМИДАЗОЛОВ $DB_3(n)$

© 2023 г. А. Ф. Арутюнян^а, А. А. Костюков^б, С. П. Королёв^{с, д}, М. Б. Готтих^{с, д}, О. Ю. Сусова^е,
Д. Н. Калюжный^а, А. Л. Жузе^{а, *}

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, 119991 Россия

^бИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук,
Москва, 119334 Россия

^сХимический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119991 Россия

^дНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^еИнститут канцерогенеза Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина,
Москва, 115478 Россия

*e-mail: zhuze@eimb.ru

Поступила в редакцию 02.08.2022 г.

После доработки 02.11.2022 г.

Принята к публикации 03.11.2022 г.

Синтезирована серия новых флуоресцентных узкобороздочных лигандов $DB_3(n)$ и охарактеризованы свойства этих лигандов. Соединения $DB_3(n)$ на основе димерных трисбензимидазолов обладают способностью связываться с АТ-участками ДНК. Синтез $DB_3(n)$, трисбензимидазольные фрагменты которых связаны олигометиленовыми линкерами разной длины ($n = 1, 5, 9$), основан на конденсации мономерного трисбензимидазола MB_3 с α, ω -алкилдикарбоновыми кислотами. $DB_3(n)$ в субмикромольной концентрации (0.20–0.30 мкМ) оказались эффективными ингибиторами каталитической активности интегразы ВИЧ-1. Обнаружено, что $DB_3(n)$ ингибирует каталитическую активность ДНК-топоизомеразы I в низких микромолярных концентрациях.

Ключевые слова: ДНК, специфичный к последовательности узкобороздочный лиганд, флуоресцентные димерные трисбензимидазолы $DB_3(n)$, спектральные методы, интегразы ВИЧ-1, ДНК-топоизомераза I

DOI: 10.31857/S0026898423030023, EDN: CGXJLT

ВВЕДЕНИЕ

Создание и изучение низкомолекулярных соединений, сайт-специфически узнающих нуклеотидные последовательности в дцДНК, остается одной из актуальных проблем биоорганиче-

ской химии и молекулярной биологии, поскольку химиотерапевтическая активность большинства из существующих противоопухолевых препаратов зависит от аффинности и селективности их взаимодействия с ДНК. В перспективе подобные молекулярные инструменты могут использоваться для изучения и контроля экспрессии конкретных генов. Создание таких мишень-направленных низкомолекулярных соединений представляет важную фармакологическую задачу.

Низкомолекулярные сайт-специфические соединения, способные образовывать нековалентные комплексы с ДНК, можно разделить на две группы в зависимости от механизма их взаимодействия с ДНК: интеркаляторы и соединения,

Сокращения: топо-I – ДНК-топоизомераза I; ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека типа I; ссДНК – суперскрученная ДНК; релаксирДНК – релаксированная ДНК; PBS – фосфатно-солевой буфер; IC_{50} – 50%-ная ингибирующая концентрация; НВТУ – (2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат; Вос-GlyOH – *N*-третбутилоксикрбонилглицин; *i*-BuOC(O)Cl – изобутилхлорформат; NMM – *N*-метилморфолин; DMF – *N,N*-диметилформамид; DIPEA – *N,N*-диизопропилэтиламин.

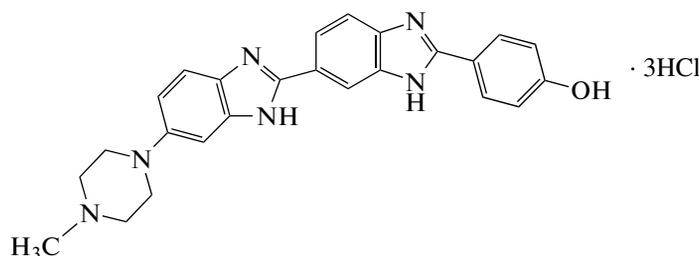


Рис. 1. Химическая структура Hoechst 33258.

связывающиеся в широкой либо в узких бороздках двойной спирали. Наша работа посвящена синтезу и изучению свойств лигандов, связывающихся с дцДНК по узкой бороздке, к которым относятся узкобороздочные лиганды, в том числе антибиотики нетропсин и дистамицин А, флуоресцентные красители Hoechst 33258 и DAPI, а также беренил и подобные диамидины [1, 2]. Существует прямая зависимость между биологической активностью этих лигандов и прочностью их комплекса с АТ-последовательностями в узкой бороздке. Узкая бороздка ДНК важна для функционирования большого числа ДНК-зависимых ферментов и аллостерической регуляции транскрипционных факторов. Поэтому она представляет собой наиболее удобную мишень для проявления биологической активности синтетических терапевтических препаратов и соединений, способных специфически взаимодействовать с ДНК [3]. К числу таких перспективных соединений относятся производные бензимидазола. Бензимидазол, структурно родственной пуриновым основаниям ДНК, обнаружен в биологически значимом природном соединении – витамине В₁₂ [4]. Производные бензимидазола проявляют широкий диапазон биологической активности [5–8]. Кроме того, бисбензимидазолы интенсивно изучают в качестве узкобороздочных агентов [9, 10], а замещенные производные бензимидазола нашли применение в различных терапевтических областях. Кегі и соавт. [11] опубликован всесторонний обзор текущих разработок соединений на основе бензимидазола во всем спектре приложений медицинской химии в качестве противоопухолевых, антибактериальных, противогрибковых, противовоспалительных, обезболивающих, анти-ВИЧ, антиоксидантных, противодиабетических, противотуберкулезных, антигистаминных, противомаларийных и других лекарственных средств.

Наша работа посвящена синтезу и изучению АТ-специфичных узкобороздочных лигандов на основе бисбензимидазольного красителя Hoechst 33258 (рис. 1), широко используемого в цитологии в качестве ДНК-специфичной флуоресцентной метки [12].

Так называемые узкобороздочные лиганды в значительной степени лишены недостатков, свойственных традиционным биологически активным препаратам на основе алкилирующих агентов и интеркаляторов. Они, в частности, не повреждают ДНК, не вызывают значительного искажения ее пространственной структуры и не проявляют мутагенного эффекта.

Нами осуществлен синтез флуоресцентного мономерного трисбензимидазола МВ₃. На его основе получены димерные трисбензимидазолы DB₃(*n*), где *n* – число метиленовых групп в линкере, соединяющем два трисбензимидазольных блока (рис. 2), и изучены их физико-химические и биологические свойства.

Структура линкеров, содержащих олигометиленовые группы, конформационно подвижна. Она обладает низким сродством к сахарофосфатному остову и основаниям ДНК. Это позволяет молекулам DB₃(*n*) принимать форму, изоспиральную узкой бороздке ДНК, благодаря чему они способны взаимодействовать с ДНК как бидентантные лиганды, связываясь с двумя сайтами (каждый из трех АТ-пар), разделенных двумя и более парами любых нуклеотидов (рис. 3).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. В работе использовали: НВТУ, NMM, *N*-метилморфолин, DMSO (“Alfa Aesar”, США); диизопропилэтиламин (“Fluka”, Германия); ундекандиовую кислоту, 4-аминобензонитрил (“Merck”, Германия); пимелиновую кислоту, изобутилхлорформиат, 1-метилпиперазин (“Acros Organics”, Бельгия); Вос-глицин, DMF, AcOH, AcOEt, EtOH, MeOH, *i*PrOH (“Рехим”, Россия). Растворы веществ в органических растворителях сушили над Na₂SO₄. Растворители упаривали на ротаторном испарителе в вакууме водоструйного насоса, как правило, при 40–50°C. Вещества высушивали в вакууме над P₂O₅ и NaOH. Температуры плавления определяли на приборе Voethius (Германия) и не исправляли. Гидрирование проводили над 10% Pd/C (“Merck”) при атмосферном давлении и комнатной температуре до прекращения поглощения водорода.

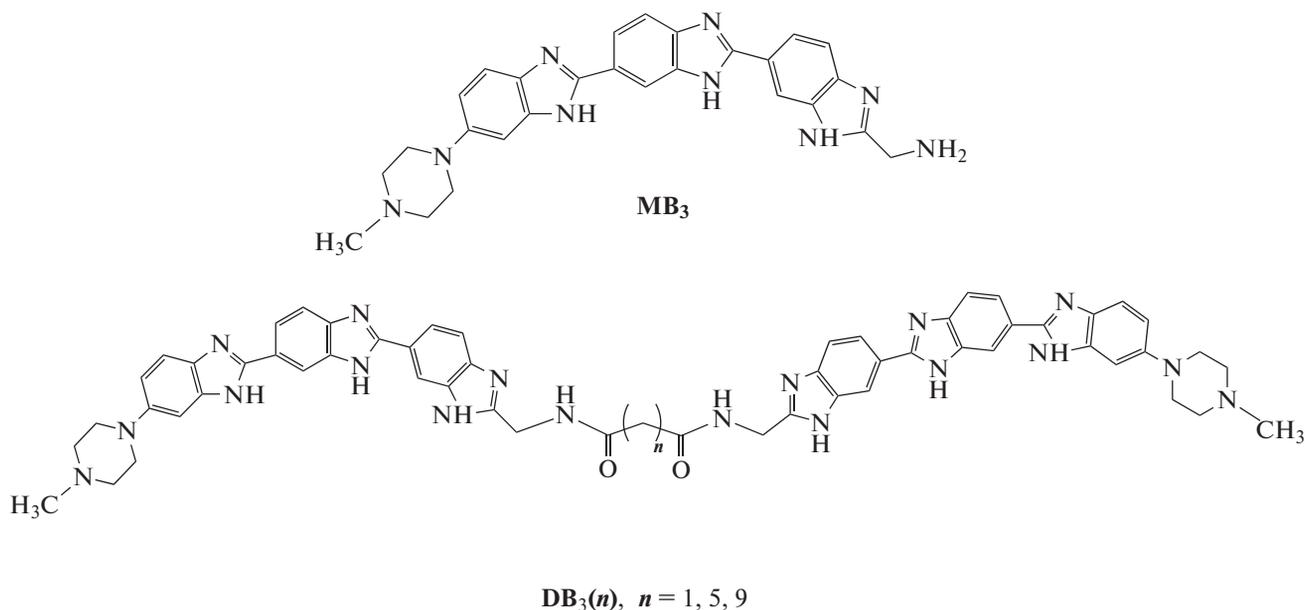


Рис. 2. Химическая структура мономерного трисбензимидазола **MB₃** и димерных трисбензимидазолов **DB₃(n)**.

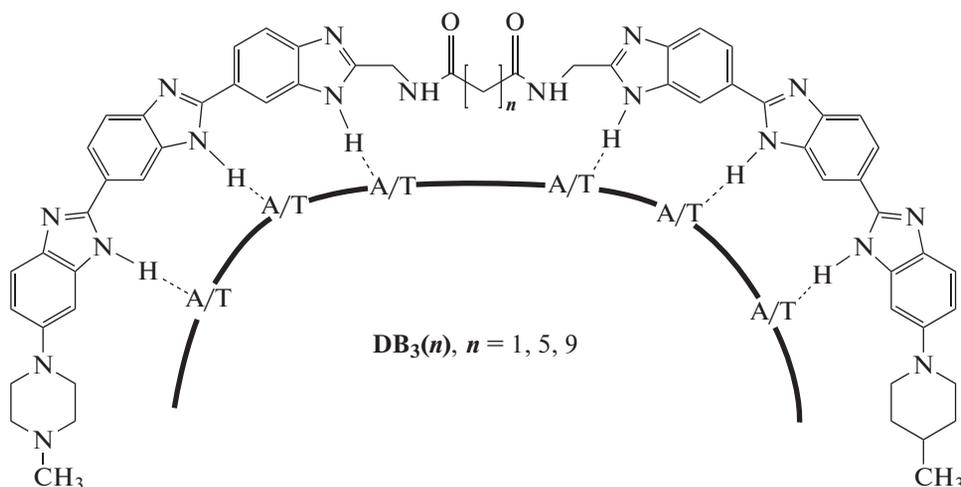


Рис. 3. Схематическое изображение комплекса **DB₃(n)** с двумя сайтами ДНК, состоящими из трех подряд расположенных АТ-пар. Пунктирные линии – водородные связи. Толстой линией изображена ДНК.

Чистоту полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (“Merck”) в системах **A**, MeOH–конц. NH₄OH (25 : 1); **B**, MeOH–TFA–H₂O (5 : 1 : 2). Вещества на хроматограммах обнаруживали в УФ-свете по поглощению при 254 нм и/или по флуоресценции при 365 нм.

Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометре Avance 3 300 МГц (“Bruker”, Германия) в DMSO-*d*₆ (δ, м.д.; J, Гц) при 30°C; в качестве внутреннего стандарта использовали сигнал остаточных протонов растворителя.

Масс-спектры регистрировали методом MALDI-TOF на приборе 4800 Plus (“AB Sciex”,

США) в режиме регистрации положительных ионов; матрица – 2,5-дигидроксибензойная кислота; лазер Nd:YAG, 355 нм.

Спектральные исследования DB₃(n). Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-3101 (Япония). Препарат – ДНК из спермы лосося (Деринат, Россия).

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Fluorate Rapogama (Россия); возбуждение при 320 нм. Препарат – ДНК из спермы лосося (Деринат).

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре Jasco J715 (“Jasco”, Япония). Препарат –

жидкокристаллическая дисперсия, приготовленная из фрагментированной ДНК спермы лосося.

Химический синтез. Синтез 4-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1*H*-1,3-бензодиазол-2-ил]-2-нитроанилина (III). К раствору 5-(4-метилпиперазин-1-ил)бензол-1,2-диамина (I) [13] в 50 мл AcOH, полученного из 3.74 г (15.6 мМ) исходного 5-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-нитрофениламина, добавили 3.83 г (15.6 мМ) дихлоргидрата имидоэфира (II) [14], реакционную смесь кипятили в течение 1 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре AcOH до отсутствия окраски фильтрата и растворяли полученное желтое твердое вещество в минимальном количестве горячей воды. К водному раствору приливали концентрированную NH₄OH до получения сильно щелочной среды, выпавший осадок отфильтровывали и высушивали. Выход соединения (III) в виде кирпично-красного порошка 2.53 г (46%), *R_f* 0.60 (A), т. пл. 152°C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 2.26 (3H, s, N-CH₃), 3.13 (4H, m, pip), 7.01 (3H, m, ArH), 7.39 (1H, dd, *J* = 8.6, *J* = 34.7, ArH), 7.74 (2H, brs, -NH₂), 8.14 (1H, m, ArH), 8.75 (1H, dd, *J* = 1.8, *J* = 9.9, ArH), 12.59 (1H, s, VimNH).

Синтез 4-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1*H*-1,3-бензодиазол-2-ил]бензол-1,2-диамина (IV). Суспендировали 25 г 10% Pd/C в 20 мл AcOH и при перемешивании пропускали интенсивный ток водорода до полного прекращения поглощения. Затем приливали раствор 2.53 г (7.18 мМ) соединения (III) в 30 мл AcOH и через получившуюся смесь начинали пропускать водород. Через 2.5 ч (по данным ТСХ в системе этанол/NH₄OH (25 : 1)) исходного вещества не осталось. Реакционную массу отфильтровывали от катализатора, фильтрат упаривали при пониженном давлении. К образовавшемуся маслу добавляли 50 мл концентрированной NH₄OH и оставляли на ночь при 4°C. На следующий день твердый осадок отфильтровывали и высушивали. Выход целевого продукта в виде серого порошка 2.12 г (92%), *R_f* 0.52 (A), т. пл. 156–159°C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 2.24 (3H, s, N-CH₃), 3.09 (4H, m, pip), 4.62 (2H, br.s, -NH₂), 4.88 (2H, br.s, -NH₂), 6.59 (1H, d, *J* = 7.95, ArH), 6.84 (2H, dd, *J* = 1.8, 8.7 Hz, ArH), 7.16 (1H, dd, *J* = 1.2, 8.1 Hz, ArH), 7.34 (2H, d, *J* = 1.65, ArH), 12.06 (1H, s, VimNH).

Синтез 4-{6-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1*H*-1,3-бензодиазол-2-ил]-1*H*-1,3-бензодиазол-2-ил}-2-нитроанилина (V). Растворяли 2.12 г (6.6 мМ) диамина (IV) и 1.6 г (6.6 мМ) дихлоргидрата имидоэфира (II) [14] в 80 мл смеси EtOH/2,2,2-трифторэтанола (1 : 1), реакционную массу кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч. Выпавший осадок отфильтровывали и заливали 50 мл конц. NH₄OH. Выпавшее твердое вещество оранжевого цвета было отфильтровано и высушено.

Выход соединения (V) 1.26 г (41%), *R_f* 0.41(A), т. пл. 240°C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 2.24 (3H, s, N-CH₃), 3.12 (4H, m, pip), 6.93 (1H, dd, *J* = 1.5, 9 Hz, ArH), 7.01 (1H, s, ArH), 7.20 (1H, d, *J* = 8.6, ArH), 7.44 (1H, d, *J* = 8.7, -NH₂), 7.67 (1H, d, *J* = 8.4, ArH), 7.84 (2H, brs, Ar-NH₂), 8.02 (1H, d, *J* = 8.5, ArH), 8.25 (1H, dd, *J* = 1.5, 8,9 Hz, ArH), 8.30 (1H, s, ArH), 8.88 (1H, d, *J* = 8.5, ArH).

Синтез 4-{6-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1*H*-1,3-бензодиазол-2-ил]-1*H*-1,3-бензодиазол-2-ил}бензол-1,2-диамина (VI). Суспендировали 0.12 г 10% Pd/C в 20 мл AcOH и при перемешивании пропускали интенсивный ток водорода до полного прекращения поглощения. Затем прилили раствор 1.26 г (2.7 мМ) 2-нитроанилина (V) в 30 мл AcOH и начали пропускать водород через получившуюся смесь. Через 2.5 ч (по данным ТСХ в системе EtOH/NH₄OH (25 : 1)) исходного вещества не осталось. Реакционный раствор отфильтровывали от катализатора, фильтрат упаривали при пониженном давлении. Образовавшееся масло было залито 50 мл концентрированной NH₄OH и оставлено на ночь при 4°C. Твердый осадок отфильтровывали и высушили. Выход соединения (VI) в виде серого порошка 1.13 г (95%), *R_f* 0.45 (A), т. пл. 234°C. Масс-спектр: 438.49, рассчитано: 438.52 (C₂₅H₂₆N₈), ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 2.24 (3H, s, N-CH₃), 3.13 (4H, m, pip), 4.69 (2H, br.s, -NH₂), 5.01 (2H, br.s, Vim-NH₂), 6.63 (1H, d, *J* = 8.1, ArH), 6.92 (1H, d, *J* = 7.9, ArH), 6.99 (1H, m, ArH), 7.27 (1H, dd, *J* = 7.9, 0.6 Hz, Vim-NH₂), 7.44 (1H, d, *J* = 1.8, ArH), 7.49 (2H, m, ArH), 7.94 (1H, d, *J* = 8.1, ArH), 8.20 (1H, s, ArH), 12.55 (2H, brs, VimNH).

Синтез трет-бутил-*N*-{[(2-амино-5-{6-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1*H*-1,3-бензодиазол-2-ил]-1*H*-1,3-бензодиазол-2-ил}фенил)карбомойл]метил}карбамата (VII). К 0.49 г (2.8 ммоль) Вос-Gly-OH приливали 10 мл абс. DMF и 0.5 мл NMM. Смесь охлаждали при перемешивании до -25°C, затем добавляли 0.35 г (2.57 ммоль) *i*-BuOCOCI. Через 10 мин в реакционную смесь вносили предварительно охлажденный до -30°C раствор 1.13 г (2.57 ммоль) диамина (VI) в 15 мл абс. DMF. Реакционную массу выдержали при -30°C в течение 1.5 ч, дали нагреться до комнатной температуры, а затем упарили. Полученное в виде масла соединение (VII) использовали в дальнейшем без очистки.

Синтез мономерного трисбензимидазола MB₃. Масло (VII), полученное из 1.13 г диамина (VI), растворили в 30 мл AcOH и кипятили с обратным холодильником в течение 10 ч. AcOH упарили при пониженном давлении, образовавшееся масло заливали 30 мл концентрированной NH₄OH и оставляли на 4 дня при 4°C. Полученный серый порошок без дополнительной очистки растворяли в конц. HCl и кипятили с обратным холодильником в течение 5 ч, затем реакционную массу при

перемешивании вливали в 100 мл изопропанола. Выпавший осадок отфильтровывали и очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле 40–63 мкм, элюент MeOH/NH₄OH (25 : 1). Выход MB₃ в виде светло-коричневого порошка 0.41 г (33.46% после 3 стадий), R_f 0.14 (A); R_f 0.68 (B), т. пл. >350°C. Масс-спектр: 477.59, рассчитано: 477.56 (C₂₇H₂₇N₉). ¹H-NMR (CD₃OD): 2.29 (3H, s, N-CH₃), 2.54 (4H, m, pip), 3.16 (4H, m, pip), 4.10 (2H, s, CH₂), 6.93 (1H, dd, J = 2.0, 8.8 Hz, ArH), 7.04 (1H, s, ArH), 7.45 (1H, d, J = 8.4, ArH), 7.70 (2H, m, ArH), 8.02 (1H, d, J = 6.7, ArH), 8.08 (1H, dd, J = 0.75, J = 8.3, ArH), 8.32 (1H, s, ArH), 8.39 (1H, s, ArH).

Общий метод синтеза DB₃(n). К раствору α,ω-алкилдикарбоновой кислоты (0.1 мМ) в 2 мл абс. ДМФА прибавляли HBTU (0.25 мМ), DIPEA (0.50 мМ) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. К полученному раствору добавляли 0.10 г (0.2 мМ) MB₃, перемешивали в течение еще 1 ч и оставляли реакционную массу на ночь. Растворитель упаривали при пониженном давлении, получившееся масло затирали с абс. EtOH. В образовавшуюся суспензию добавляли 0.5 мл 35% HCl в диоксане, отфильтровывали выпавший осадок в виде желтого порошка и высушивали в вакууме над NaOH/P₂O₅. По данным ТСХ в системе MeOH-TFA-H₂O (5 : 1 : 2) продукт реакции – димерный трисбензмидазол DB₃(n) – был гомогенным.

DB₃(1)·8HCl: Выход 121 мг (92%), т. пл. >350°C, Масс-спектр, m/z: 1024.27 [M + H]⁺, рассчитано M 1023.16 (C₅₇H₅₄N₁₈O₂), ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 2.88 (4H, m, pip), 2.91 (6H, s, M-Me), 3.07 (2H, s, -CO-CH₂CO-), 3.20 (4H, m, pip), 3.27 (8H, m, pip), 4.53 (4H, s, 2Bim-CH₂-N), 6.95 (2H, d, J = 1.3 Hz, ArH), 7.03 (2H, dd, J = 4.5, 1.3 Hz, ArH), 7.47 (2H, d, J = 4.5 Hz, ArH), 7.74 (2H, d, J = 1.9, 0.4 Hz, ArH), 7.81 (2H, dd, J = 5.1, 0.4 ArH), 8.04 (2H, d, J = 1.3, Hz, ArH), 8.17 (6H, m, ArH).

DB₃(5)·8HCl: Выход 122 мг (89%), т. пл. >350°C. Масс-спектр, m/z: 1080.32 [M + H]⁺, рассчитано M 1079.26 (C₆₁H₆₂N₁₈O₂), ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 1.51 (2H, m, CH₂), 1.59 (4H, m, 2CH₂), 2.22 (4H, t, J = 6 Hz, 2CH₂CO-), 2.88 (4H, m, pip), 2.91 (6H, s, N-Me), 3.20 (4H, m, pip), 3.27 (8H, m, pip), 4.53 (4H, s, 2Bim-CH₂-N), 6.95 (2H, d, J = 1.3 Hz, ArH), 7.03 (2H, dd, J = 4.5, 1.3 Hz, ArH), 7.47 (2H, d, J = 4.5 Hz, ArH), 7.74 (2H, d, J = 1.9, 0.4 Hz, ArH), 7.81 (2H, dd, J = 5.1, 0.4 Hz, ArH), 8.04 (2H, d, J = 1.3, Hz, ArH), 8.17 (6H, m, ArH).

DB₃(9)·8HCl: Выход 124 мг (87%), т. пл. >350°C. Масс-спектр, m/z: 1136.44 [M + H]⁺, рассчитано M 1135.37 (C₆₅H₇₀N₁₈O₂), ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 1.26 (10H, m, (CH₂)₅), 1.64 (4H, m, 2CH₂), 2.23 (4H, t, J = 6 Hz, 2CH₂CO-), 2.88 (4H, m, pip), 2.91

(6H, s, N-Me), 3.20 (4H, m, pip), 3.27 (8H, m, pip), 4.53 (4H, s, 2Bim-CH₂-N), 6.95 (2H, d, J = 1.3 Hz, ArH), 7.03 (2H, dd, J = 4.5, 1.3 Hz, ArH), 7.47 (2H, d, J = 4.5 Hz, ArH), 7.74 (2H, d, J = 1.9, 0.4 Hz, ArH), 7.81 (2H, dd, J = 5.1, 0.4 ArH), 8.04 (2H, d, J = 1.3, Hz, ArH), 8.16 (6H, m, ArH).

Антивирусная активность DB₃(n) и MB₃ в отношении интегразы ВИЧ-1. Рекомбинантную интегразу ВИЧ-1 экспрессировали в *Escherichia coli* штамм BL21 (DE3) Codon Plus и очищали в присутствии ионов Zn²⁺ в отсутствие детергентов согласно [15].

Ингибирование 3'-концевого процессинга, катализируемого интегразой ВИЧ-1. дцДНК-субстрат U5 интегразы ВИЧ-1 (5 нМ), состоящий из 21-звенных олигодезоксирибонуклеотидов U5A (5'-ACTGCTAGAGATTTTCCACAC-3') и флуоресцентно меченного U5B-FAM (5'-FAM-TGTG-GAAAATCTCTAGCAGT-3'), инкубировали с 100 нМ интегразой в 50 мкл буфера (20 мМ HEPES, pH 7.2, 7.5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT) в присутствии возрастающих концентраций ингибитора (0–50 мкМ) при 37°C в течение 100 мин. Реакцию останавливали, добавляя 15 мкл стоп-раствора (30 мМ EDTA, 1.2 М NaOAc, 40 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 0.5 мг/мл гликоген). ДНК-дуплекс осаждали, добавляя 200 мкл этанола и центрифугируя при 10000 g в течение 10 мин, анализировали в 20%-ном полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины. Гель анализировали в многофункциональном сканере GE Healthcare Typhoon FLA 9500. За прохождением реакции следили по появлению полосы, соответствующей укороченному в результате 3'-процессинга меченому олигонуклеотиду U5B-FAM. Эффективность прохождения реакции определяли с использованием программы Quantity One™ 4.6.6. Значения параметров IC₅₀, соответствующих концентрациям ингибиторов, при которых эффективность реакции снижается вдвое, рассчитывали с использованием программы GraphPad prism 7.03.

Ингибирование топо-I. Топо-I – одна из наиболее широко используемых мишеней ряда противоопухолевых средств. Влияние синтезированных соединений на каталитическую активность фермента сравнивали с помощью теста для оценки способности веществ ингибировать топо-I (Topogen, TG1018-2).

Исследуемые соединения добавляли в различных концентрациях в смесь, содержащую плазмидную ссДНК pNot, воду и реакционный буфер. Смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°C для комплексообразования и добавляли топо-I. Далее реакцию проводили согласно методике производителя. Продукты реакции разделяли с использованием электрофореза в 1%-ном агарозном геле, с последующим окрашиванием бромистым этидием. ДНК визуализировали на тран-

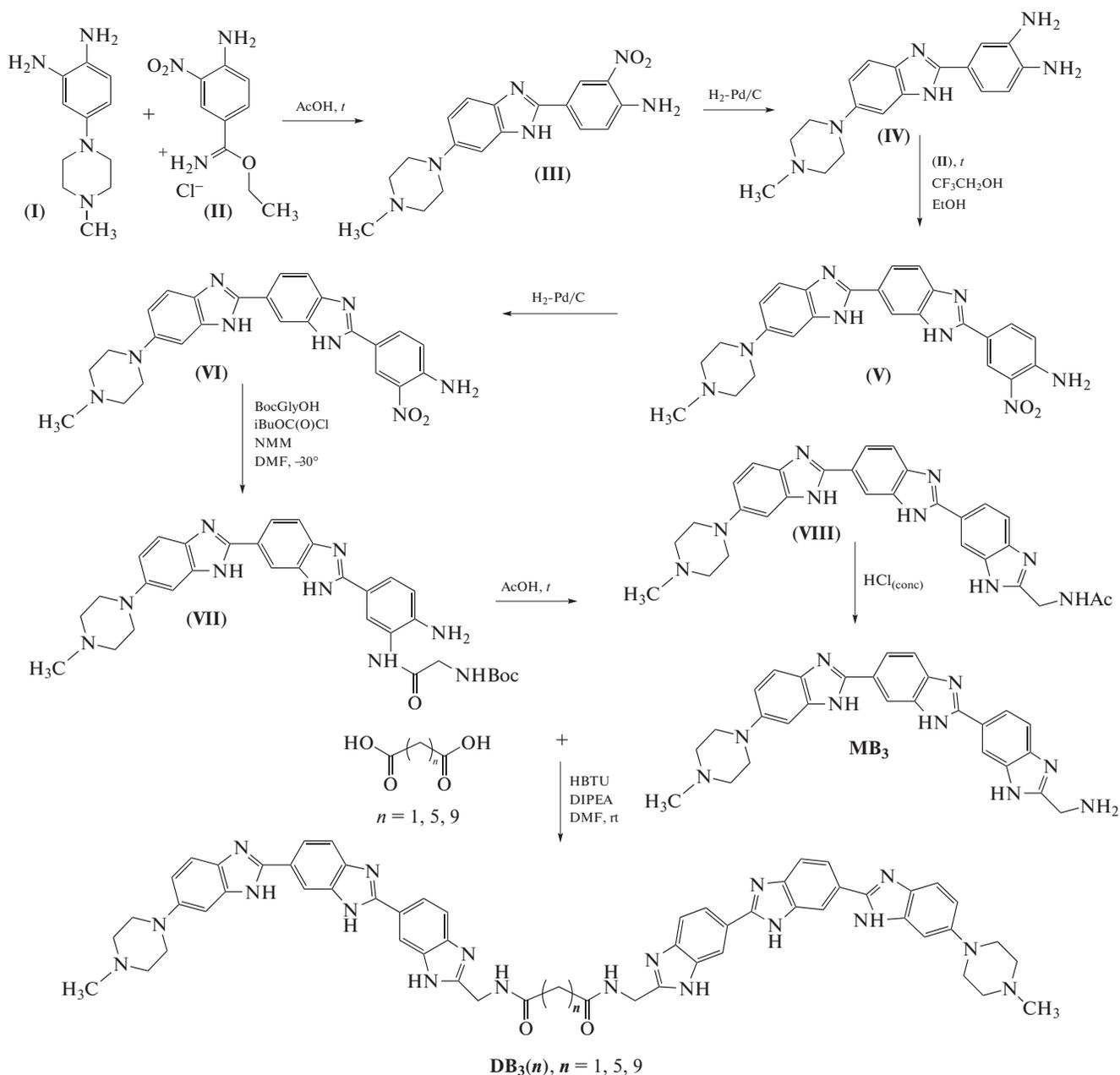


Рис. 4. Схема синтеза димерного трисбензимидазола $DB_3(n)$.

силлюминаторе при длине волны 312 нм (Vilber Lourmat transilluminator, Франция). Эффект ингибирования топо-I оценивали по способности тестируемых соединений задерживать релаксацию ссДНК. Эксперимент повторяли дважды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез $DB_3(n)$

Схема синтеза димерных трисбензимидазолов $DB_3(n)$ представлена на рис. 4.

Мономерный трисбензимидазол MB_3 был синтезирован исходя из 5-(4-метилпиперазина-1-

ил)бензол-1,2-диамина (**I**) [13]. Он был сконденсирован с хлоргидратом имидоэфира (**II**), полученного по реакции Пиннера из соответствующего нитрила [14]. Полученное соединение (**III**) было восстановлено каталитическим гидрированием в диамин (**IV**), который при конденсации с имидоэфиром (**II**) образовывал нитроамин (**V**). При его гидрировании над палладиевым катализатором получен диамин (**VI**). Бисбензимидазол (**VI**) синтезирован в реакции диамина (**VI**) с Вос-Gly-OH методом смешанных ангидридов с последующим кипячением в уксусной кислоте с образованием N-ацетильного производного (**VIII**). При кипяче-

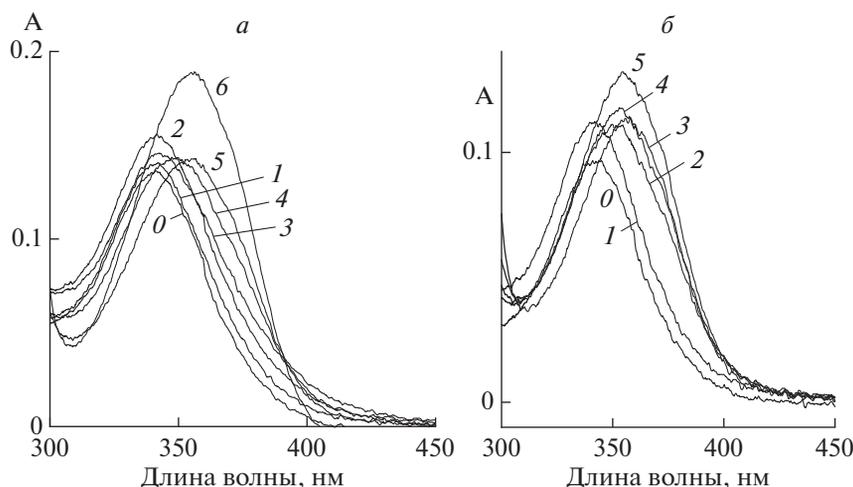


Рис. 5. *a* – Спектр поглощения **DB₃(1)** в отсутствие (1.38×10^{-6} М, кривая 0) и в присутствии (кривые 1–6) ДНК в концентрации 0.42 (1); 2.1 (2); 6.18 (3); 29.17 (4); 58.4 (5); $97.7(6) \times 10^{-6}$ М п.н. соответственно. Буфер 10 мМ PBS (рН 7.4), 22°C. Оптический путь 10 мм. *б* – Спектр поглощения **DB₃(9)** (1.4×10^{-6} М, кривая 0) и в присутствии (кривые 1–5) ДНК; концентрации ДНК 0.42 (1); 2.1 (2); 6.18 (3); 29.17 (4); 58.4 (5) $\times 10^{-6}$ М п.н. соответственно. Буфер 10 мМ PBS (рН 7.4), 22°C. Оптический путь 10 мм.

нии этого производного в концентрированной HCl получен мономерный трисбензимидазол **MB₃**. Димерные трисбензимидазолы **DB₃(n)** получены с выходом 89–92% при конденсации **MB₃** с α, ω -алкилдикарбоновыми кислотами (в соотношении 2 : 1) в присутствии HBTU. Все синтезированные соединения обладали хорошей флуоресценцией. Структура этих соединений подтверждена методами ¹H-NMR-спектроскопии и спектрометрии MALDI-TOF.

Физико-химические исследования

Взаимодействие димерных трисбензимидазолов **DB₃(1, 5, 9)** с ДНК охарактеризовано методами спектрофотометрии и спектрофлуориметрии. Зарегистрированы спектры поглощения **DB₃(1, 5, 9)** в присутствии дцДНК из спермы лосося (Деринат). На рис. 5 в качестве примера представлен спектр **DB₃(1)** и **DB₃(9)** в присутствии ДНК в разных концентрациях (кривые 1–6 и 1–5). При увеличении концентрации ДНК в растворе наблюдался небольшой сдвиг полосы поглощения в длинноволновую область спектра. Такой характер изменения спектров поглощения **DB₃(n)** свидетельствует об образовании комплексов **DB₃(n)**–ДНК.

Спектры флуоресценции **DB₃(1, 5, 9)** зарегистрированы в отсутствие и в присутствии дцДНК. Все они также имели схожий характер. На рис. 6 в качестве иллюстрации приведены спектры флуоресценции **DB₃(1)** и **DB₃(9)**. Добавление ДНК приводило к смещению положения максимума флуоресценции **DB₃(1)** от 486 к 470 нм и **DB₃(9)** от 486 к 472 нм, при этом интенсивность флуорес-

ценции **DB₃(1)** в присутствии ДНК увеличивалась почти в 15 раз.

Локализацию **DB₃(n)** в комплексе с ДНК определяли методом кругового дихроизма (КД), основанном на использовании холестерических жидкокристаллических ДНК (ХЖКД) (рис. 7).

Сопоставление кривых (рис. 7, заполненные кружки) показало, что в спектрах КД комплексов **DB₃(n)** с ХЖКД ДНК наблюдается появление небольшой положительной полосы в области поглощения лигандов (300–400 нм). Положительные значения КД в области поглощения хромофоров **DB₃(n)** свидетельствуют о том, что угол между плоскостью хромофоров лиганда и спиральной осью молекулы ДНК составляет менее 54°, что возможно только в случае локализации данных хромофоров в одной из бороздок ДНК [16, 17]. Поскольку согласно данным рентгеноструктурного анализа Hoechst 33258 связывается с ДНК в узкой бороздке [18, 19], а молекулы **DB₃(n)** являются димерами производного Hoechst 33258, то мы полагаем, что они также располагаются именно в узкой бороздке ДНК, т.е. представляют собой узкобороздочные лиганды.

Биологические исследования: антивирусная активность **DB₃(n)** в отношении интегразы ВИЧ-1

Интегразы ВИЧ-1 осуществляет интеграцию кДНК вируса в геном человека и поэтому считается привлекательной мишенью для терапии инфекции ВИЧ-1 [20].

Ранее в качестве ингибиторов активности интегразы ВИЧ-1 мы изучали различные димерные

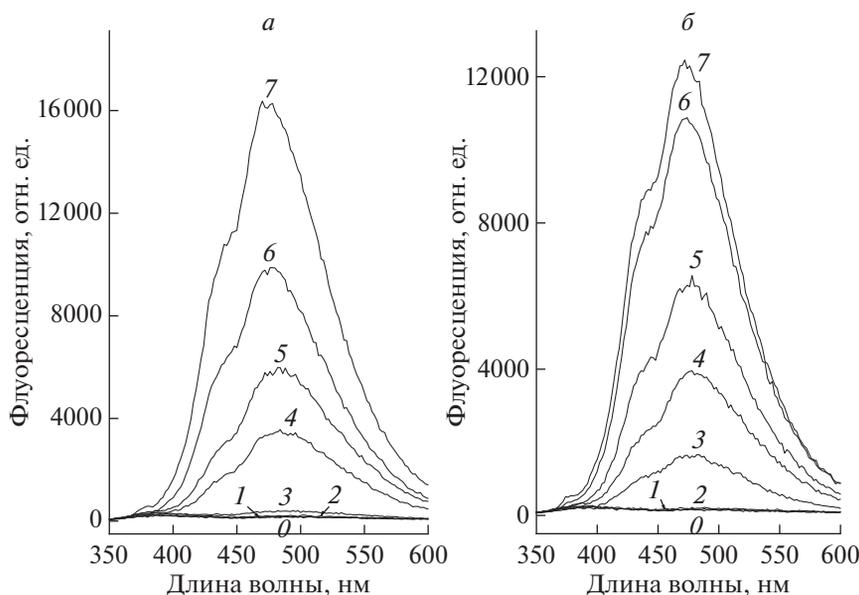


Рис. 6. *a* – Спектр флуоресценции буфера (0), **DB₃(1)** в отсутствие (1) и в присутствии ДНК (2–7). Концентрация **DB₃(1)** 1.34×10^{-6} М; концентрация ДНК: 1.0×10^{-6} (2); 2.1×10^{-6} (3); 41.8×10^{-6} (4); 0.21×10^{-5} (5); 0.42×10^{-5} (6); 0.84×10^{-5} М п.н. (7). Буфер 10 мМ PBS (рН 7.4), 22°C. $\lambda_{\text{exc}} = 340$ нм, оптический путь 10 мм. *б* – Спектр флуоресценции буфера (0), **DB₃(9)** в отсутствие (1) и в присутствии ДНК (2–7). Концентрация **DB₃(9)** 1.34×10^{-6} М; концентрация ДНК: 1.0×10^{-6} (2); 2.1×10^{-6} (3); 41.8×10^{-6} (4); 0.21×10^{-5} (5); 0.42×10^{-5} (6); 0.84×10^{-5} М п.н. (7). Буфер 10 мМ PBS (рН 7.4), 22°C. $\lambda_{\text{exc}} = 340$ нм, оптический путь 10 мм.

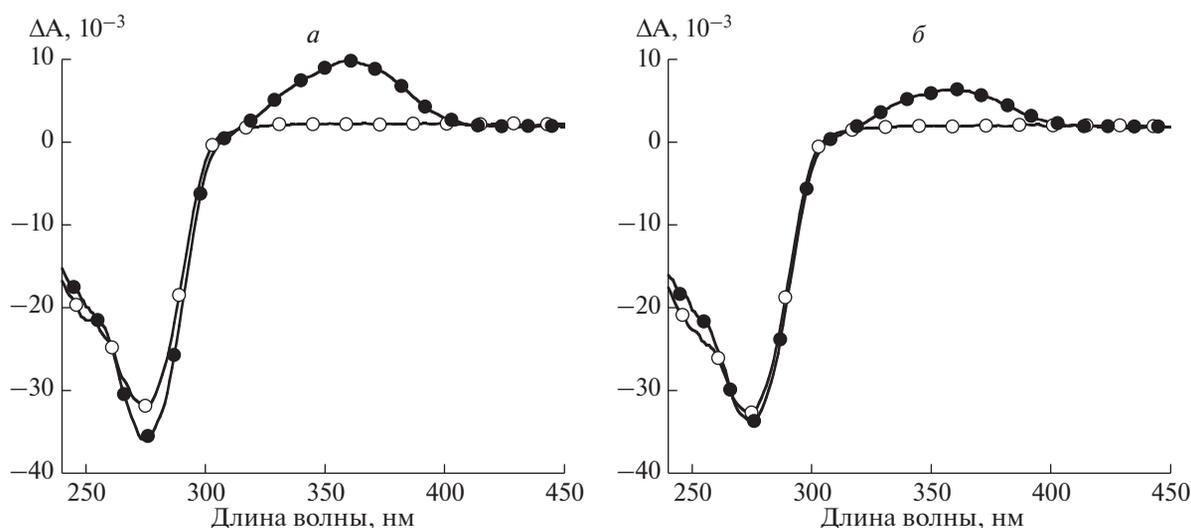


Рис. 7. Спектры КД холестерической жидкокристаллической дисперсии фрагментированной ДНК из спермы лосося в отсутствие (открытые кружки) и в присутствии **DB₃(1)** (*a*) и **DB₃(9)** (*б*) (заполненные кружки). Буфер 0.3 М NaCl + 0.002 М Na₃PO₄ рН 6.85 в присутствии ПЭГ (4000) 170 мг/мл. Длина оптического пути 10 мм. Концентрация ДНК 10^{-4} М п.н., концентрация **DB₃(1)** (*a*) и **DB₃(9)** (*б*) 4 мкМ.

производные бисбензимидазолов [1, 13, 14]. В настоящей работе мы решили расширить данные исследования и использовать синтезированные димерные трисбензимидазолы. В первую очередь

изучили активность мономерного трисбензимидазола **MB₃**. Оказалось, что это соединение способно ингибировать каталитическую активность интегразы ВИЧ-1 с $IC_{50} = 1.2$ мкМ. Димерные

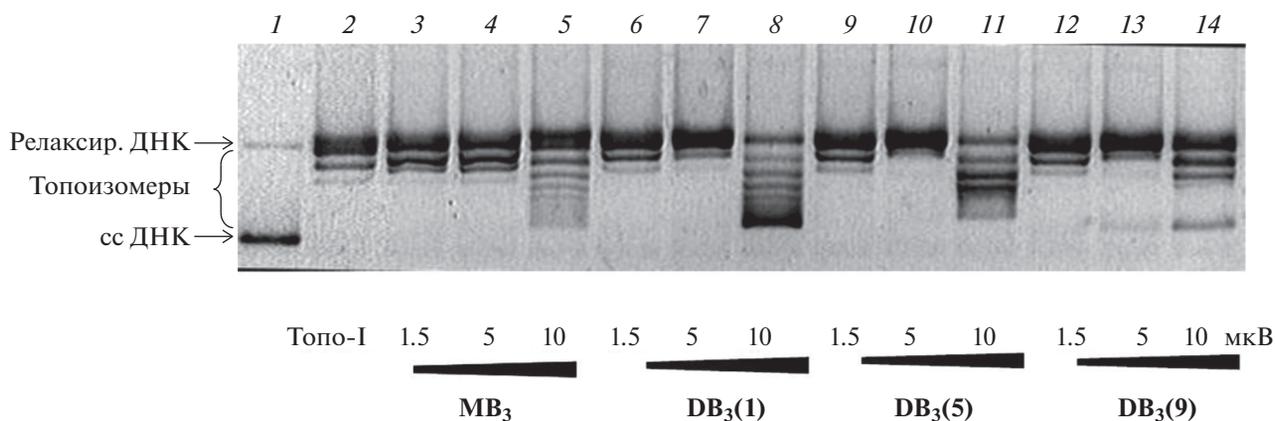


Рис. 8. Сравнение ингибирования топо-I мономерным трисбензимидазолом **MB₃** и тремя его димерными аналогами **DB₃(1)**, **DB₃(5)** и **DB₃(9)**.

трисбензимидазолы оказались еще более активными, чем **MB₃** (табл. 1). При этом соединение **DB₃(1)** с самым коротким метиленовым линкером между трисбензимидазольными фрагментами было примерно в 1.5 раза менее активным, чем соединения **DB₃(5)** и **DB₃(9)**, имеющие более длинные линкеры.

Полученные нами результаты интересно сравнить с данными работы [14], в которой нами исследовано влияние красителя Hoechst 33258 на активность интегразы. Данный недимеризованный бисбензимидазол Hoechst в отличие от мономерного трисбензимидазола **MB₃** оказался неактивным вплоть до концентрации 100 мкМ. При этом димеризация молекулы Hoechst 33258 с использованием метиленового линкера длиной пять или семь звеньев (**bis-Ht(5)** и **bis-Ht(7)**) приводила к появлению активности на уровне 3.2 и 2.6 мкМ соответственно. Таким образом, димерные трисбензимидазолы **DB₃(n)** оказались примерно в 10–15 раз более активными, чем димерные бисбензимидазолы **bis-Ht(n)** с аналогичной структурой. Более того, **DB₃(n)** обладают таким важным преимуществом, как более высокая растворимость в воде.

Таблица 1. Ингибирование реакции 3'-процессинга, катализируемой интегразой ВИЧ-1, использованными соединениями

Соединение	IC ₅₀ , мкМ
DB₃(1)	0.30 ± 0.07
DB₃(5)	0.19 ± 0.04
DB₃(9)	0.21 ± 0.06
MB₃	1.2 ± 0.3

*Биохимические эксперименты: **MB₃** и **DB₃(n)** ингибируют каталитическую активность эукариотической ДНК-топоизомеразы I в реакции релаксации суперскрученной ДНК*

Топо-I — одна из наиболее широко используемых мишеней ряда противоопухолевых средств. Способность соединений новой серии **DB₃(n)** ингибировать топо-I из тимуса телят протестировали в бесклеточной системе. Реакцию релаксации ДНК топо-I проводили в присутствии исследуемых лигандов, взятых в низких (микромольных) концентрациях. В отсутствие ингибиторной активности топо-I приводит к полной релаксации плазмидной ссДНК (рис. 8, дорожка 2). Мономерный трисбензимидазол **MB₃** (рис. 2), содержащий в своей структуре только один трисбензимидазольный блок, практически не ингибировал топо-I.

Ингибирование топо-I мономером **MB₃** наблюдается, начиная с концентрации 10 мкМ, но на начальной стадии происходит образование топоизомеров без накопления ссДНК. Все новые димерные трисбензимидазолы обладали лучшей, чем у **MB₃**, способностью ингибировать топо-I, но различия в их эффективности были небольшими. При концентрации всех соединений 1, 5 и 5 мкМ ДНК находилась в релаксированной форме, что свидетельствует об отсутствии ингибирования топо-I. В случае димеров при небольшой разнице **DB₃(1)** в концентрации 10 мкМ лучше, чем **DB₃(5)** и **DB₃(9)**, ингибирует топо-I, о чем свидетельствует накопление ссДНК. Таким образом, наиболее функциональный размер линкера имеет **DB₃(1)**.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Малые молекулы, образующие нековалентные комплексы, сайт-специфично связывающиеся с

узкой бороздкой ДНК, способны регулировать специфические эндогенные пути экспрессии генов [21]. Вероятно, регулирование работы гена происходит либо с прямой пространственной блокадой связывания ДНК-зависимого фермента или фактора транскрипции, либо за счет аллостерического изменения топологии ДНК. Исследование водорастворимых флуоресцентных димерных трисбензимидазолов **DB₃(n)** выявило широкий спектр их биологической активности. Будучи АТ-специфичными узкобороздочными лигандами, **DB₃(n)** проявили ингибиторную активность в отношении интегразы ВИЧ-1, ингибируя *in vitro* 3'-процессинг катализируемый интегразой ВИЧ-1 в субмикромольных концентрациях (0.20–0.30 мкМ). Кроме того, **DB₃(n)** способны ингибировать топо-I в бесклеточной системе из тимуса телят в низких (микромольных) концентрациях. Мы полагаем, что новые АТ-сайт-специфичные соединения – димерные трисбензимидазолы **DB₃(n)** могут найти применение в молекулярной биологии и медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 20-33-90287).

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Koval V.S., Arutyunyan A.F., Salyanov V.I., Kostyukov A.A., Melkina O.E., Zavilgelsky G.B., Klimova R.R., Kushch A.A., Korolev S.P., Agapkina Yu.Yu., Gottikh M.B., Vaiman A.V., Rybalkina E.Yu., Susova O.Yu., Zhuze A.L. (2020) DNA sequence-specific ligands. XVIII. Synthesis, physico-chemical properties; genetic, virological, and biochemical studies of fluorescent dimeric bisbenzimidazoles DBPA(n). *Bioorg. Med. Chem.* **28**, 115378.
- Bhaduri S., Ranjan N., Arya Dev P. (2018) An overview of recent advances in duplex DNA recognition by small molecules. *Beilstein J. Org. Chem.* **14**, 1051–1086.
- Rahman A., O'Sullivan P., Rozas I. (2019) Recent developments in compounds acting in the DNA minor groove. *Med. Chem. Comm.* **10**, 26–40.
- Battersby A.R. (1988) Synthetic and biosynthetic studies on vitamin B₁₂. *J. Nat. Prod.* **51**, 643–661.
- Gudmundsson K.S., Freeman G.A., Drach J.C., Townsend L.B. (2000) Synthesis of fluorosugar analogues of 2,5,6-trichloro-1-(β-D-ribofuranosyl)benzimidazole as antivirals with potentially increased glycosidic bond stability. *J. Med. Chem.* **43**, 2473–2478.
- Skalitzky D.J., Marakovits J.T., Maegley K.A., Ekker A., Yu X.H., Hostomsky Z., Webber S.E., Eastman B.W., Almasy R., Li J., Curtin N.J., Newell D.R., Calvert A.H., Griffin R.J., Golding B.T. (2003) Tricyclic benzimidazoles as potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors. *J. Med. Chem.* **46**, 210–213.
- He C.Y., Yang J., Wu B.-G., Risen L., Swayze E.E. (2004) Synthesis and biological evaluations of novel benzimidazoles as potential antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1217–1220.
- Seth P.P., Miyaji A., Jefferson E.A., Kristin S.-L., Osgood S.A., Propp S.S., Ranken R., Massire C., Sampath R., Ecker D.J., Swayze E.E., Griffey R.H. (2005) SAR by MS discovery of a new class of RNA-binding small molecules for the hepatitis C virus: internal ribosome entry site IIA subdomain. *J. Med. Chem.* **48**, 7099–8102.
- Tanious F.A., Hamelberg D., Bailly C., Czarny A., Boykin D.W., Wilson W.D. (2004) DNA sequence dependent monomer-dimer binding modulation of asymmetric benzimidazole derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 143–153.
- Bailly C., Chessari G., Carrasco C., Joubert A., Mann J., Wilson W.D., Neidle S. (2003) Sequence-specific minor groove binding by bis-benzimidazoles: water molecules in ligand recognition. *Nucl. Acids Res.* **31**, 1514–1524.
- Keri R.S., Hiremathad A., Budagumpi S.I., Nagaraja B.M. (2015) Comprehensive review in current developments of benzimidazole-based medicinal chemistry. *Chem. Biol. Drug Des.* **86**, 19–65.
- Latt S.A., Stetten G., Juergens L.A., Buchanan G.R., Gerald P.S. (1975) Comprehensive review in current developments of benzimidazole-based medicinal chemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **23**, 493–505.
- Громыко А.В., Сялянов В.И., Стрельцов С.А., Олейников В.А., Королев С.П., Готтих М.Б., Жузе А.Л. (2007) Лиганды, специфичные к определенным последовательностям пар оснований ДНК. XIII. Новые димерные молекулы Хехста 33258 – ингибиторы интегразы ВИЧ-1 *in vitro*. *Биоорганическая химия*. **33**, 613–623.)
- Королев С.П., Ташлицкий В.Н., Смолов М.А., Громыко А.В., Жузе А.Л., Агапкина Ю.Ю., Готтих М.Б. (2010) Ингибирование интегразы ВИЧ-1 димерными бисбензимидазолами с различной структурой линкера. *Молекулярная биология*. **44**, 718–727.
- Leh H., Brodin P., Bischerour J., Deprez E., Tauc P., Brochon J.C., LeCam E., Coulaud D., Auclair C., Mouscadet, J.F. (2000) Determinants of Mg-dependent activities of recombinant human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Biochemistry*. **39**, 9285–9294.
- Евдокимов Ю.М. Сялянов В.И., Нечипуренко Ю.Д., Скуридин С.Г., Захарова М.А., Спенер Ф., Палумбо М. (2003) Молекулярные конструкции (суперструктуры) с регулируемыми свойствами на основе двухцепочечных нуклеиновых кислот. *Молекулярная биология*. **37**, 340–355.
- Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Nechipurenko Y.D., Zakharov M.A., Salyanov V.I., Kurnosov A.A.,

- Kuznetsov V.D., Nikiforov V.N. (2005) Nanoconstructions based on double-stranded nucleic acids. *Int. J. Biol. Macromol.* **36**, 103–115.
18. Pjura P.E., Grzeskowiak K., Dickerson R.E. (1987) Binding of Hoechst 33258 to the minor groove of B-DNA. *J. Mol. Biol.* **197**, 257–271.
19. Teng M.K., Usman N., Frederick C.A., Wang A.H. (1988) The molecular structure of the complex of Hoechst 33258 and the DNA dodecamer d(CGC-GAATTCGCG). *Nucl. Acids Res.* **16**, 2671–2690.
20. Pommier Y., Johnson A.A., Marchand C. (2005) Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 236–248.
21. Leung C.H., Chan D.S.-H., Ma V.P.-Y., Ma D.-L. (2013) DNA-binding small molecules as inhibitors of transcription factors. *Med. Res. Rev.* **33**, 823–846.

DNA Sequence-Specific Ligands. XIX. Synthesis, Spectral Properties, Virological and Biochemical Studies of Fluorescent Dimeric Trisbenzimidazoles $DB_3(n)$

A. F. Arutyunyan¹, A. A. Kostyukov², S. P. Korolev^{3, 4}, M. B. Gottikh^{3, 4},
O. Yu. Susova⁵, D. N. Kaluzhny¹, and A. L. Zhuze^{1, *}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Science, Moscow, 119334 Russia

³Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

⁴Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

⁵Research Institute of Carcinogenesis, Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia

*e-mail: zhuze@imb.ru

In this work, we synthesized and characterized the properties of a series of new fluorescent narrow-groove ligands $DB_3(n)$. $DB_3(n)$ compounds based on dimeric trisbenzimidazoles have the ability to bind to the AT regions of DNA. The synthesis of $DB_3(n)$, trisbenzimidazole fragments of which are linked by oligomethylene linkers of different lengths ($n = 1, 5, 9$), is based on the condensation of monomeric trisbenzimidazole MB_3 with α, ω -alkyldicarboxylic acids. $DB_3(n)$ proved to be effective inhibitors of the catalytic activity of HIV-1 integrase at submicromolar concentrations (0.20–0.30 μ M). $DB_3(n)$ was found to inhibit the catalytic activity of DNA topoisomerase I at low micromolar concentrations.

Keywords: DNA, sequence-specific minor-groove ligand, fluorescent dimeric trisbenzimidazoles $DB_3(n)$, spectral methods, HIV-1 integrase, DNA topoisomerase I