

На правах рукописи

КОВАЛЬ ВАСИЛИЙ СЕРГЕЕВИЧ

**НОВЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ДИМЕРНЫЕ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛЫ:
СИНТЕЗ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ**

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва 2018

Работа выполнена в Лаборатории ДНК-белковых взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии Российской академии наук и Лаборатории молекулярной биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии Российской академии наук.

Научный руководитель:

кандидат химических наук

Жузе Алексей Львович

в. н. с. Лаборатории ДНК-белковых взаимодействий
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии Российской академии наук

доктор физико-математических наук

Олейников Владимир Александрович

руководитель Лаборатории молекулярной биофизики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии Российской академии наук

Официальные оппоненты:

доктор химических наук

Орецкая Татьяна Семеновна

профессор химического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования “Московский государственный университет имени М.В.
Ломоносова”

доктор химических наук

Дзантиев Борис Борисович

заведующий Лабораторией иммунобиохимии
Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Ведущая организация:

Институт химической биологии и
фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН

Защита диссертации состоится «___» _____ 2018 г. в _____ часов на заседании диссертационного Совета Д 002.235.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32 и на сайте ИМБ РАН <http://eimb.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат химических наук

А.М. Крицын

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Создание низкомолекулярных соединений, сайт-специфично узнающих нуклеотидные последовательности в двухцепочечной ДНК (дцДНК), является одной из актуальных проблем биоорганической химии и молекулярной биологии. В перспективе, создание подобных молекулярных инструментов, специфически связывающихся с определёнными нуклеотидными последовательностями в геноме, позволит использовать их для изучения и контроля экспрессии конкретных генов. Кроме того, такие мишень-направленные (target directed) соединения представляют особый интерес для фармакологии, поскольку химиотерапевтическая активность большинства из существующих противоопухолевых препаратов зависит от их аффинности и селективности взаимодействия с дцДНК.

Наиболее перспективными в этом плане являются низкомолекулярные соединения, взаимодействующие нековалентно с дцДНК по узкой бороздке. Такие, так называемые «узкобороздочные лиганды», в значительной степени свободны от недостатков, свойственных традиционным биологически активным препаратам на основе алкилирующих агентов и интеркаляторов. Так, в частности, они не повреждают дцДНК, не вызывают значительного искажения ее пространственной структуры и в значительной степени свободны от побочного мутагенного эффекта.

В настоящей работе продолжены исследования по созданию нового ряда ДНК-сайт-специфичных лигандов на основе красителя Hoechst 33258 (рис.1), широко используемого в цитологии в качестве ДНК-специфичной флуоресцентной метки. Известно, что Hoechst нековалентно и АТ-специфично связывается с дцДНК по узкой бороздке. Он ингибирует ТАТА-бокс-связывающий белок, является эффективным ингибитором топо-I, топо-II и ДНК-хеликаз, а кроме того обладает радиопротекторными свойствами. АТ-специфичность Hoechst определяется остовом молекулы красителя, состоящим из двух бензимидазольных фрагментов, связанных друг с другом по типу «голова-к-хвосту» (head-to-tail). При взаимодействии с ДНК каждый бензимидазольный фрагмент образует бифуркационную (трехцентровую) водородную связь с О2-атомом тимина и/или N3-атомом аденина двух соседних АТ-пар, накрывая при этом участок приблизительно в полторы пары оснований. Связывание Hoechst стабилизируется также за счет электростатических и интенсивных ван-дер-ваальсовых взаимодействий со стенками узкой бороздки ДНК.

С целью создания соединений, нековалентно и сайт-специфично связывающихся по узкой бороздке ДНК, ранее в нашей лаборатории был осуществлён синтез и биохимические исследования димерных аналогов Hoechst 33258 (Ht) **DB(n)** (рис. 1).

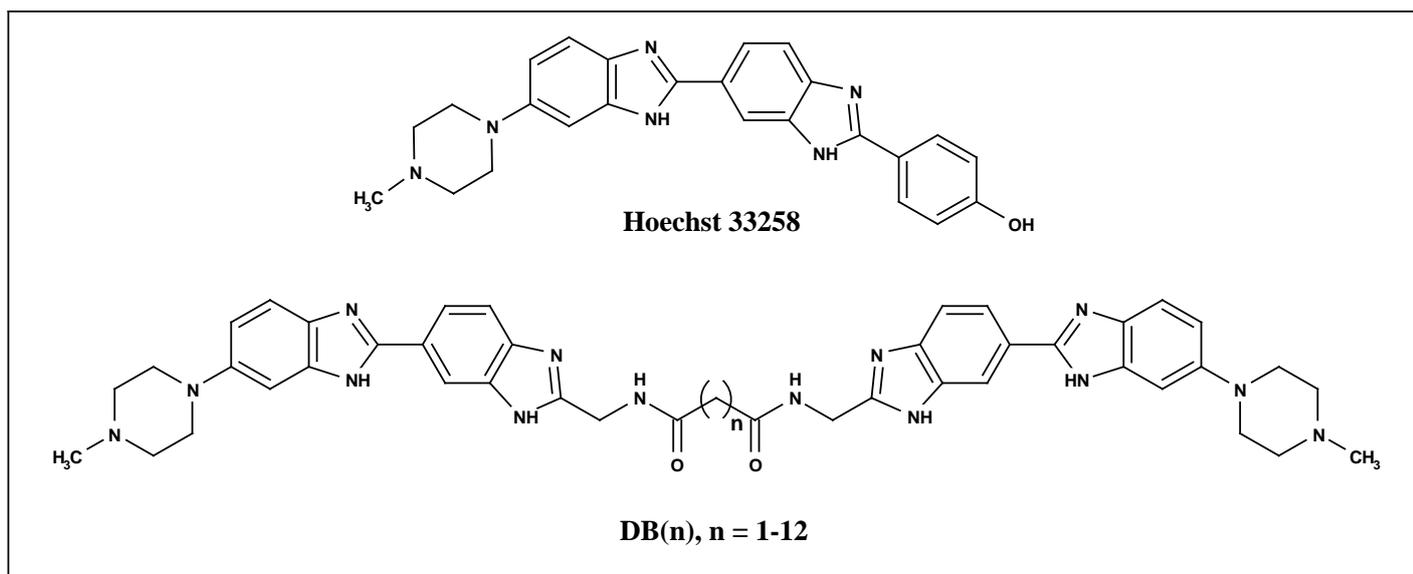


Рис. 1. Химическая структура Hoechst 33258 и соединений серии **DB(n)**.

DB(n) в низких микромолярных концентрациях оказались ингибиторами ряда ДНК-зависимых ферментов, однако из-за склонности к образованию агрегатов эти соединения имели низкую растворимость в водных растворах. В настоящей работе для улучшения водорастворимости и увеличения прочности комплексов с дцДНК в структуру олигометиленового линкера в молекуле **DB(n)** был введён остаток 1,4-пиперазина, а концевые N-метилпиперазиновые фрагменты были заменены на N,N-диметиламинопропилкарбоксамидные.

Целью работы являлось создание и исследование новых серий флуоресцентных димерных бисбензимидазолов **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)** (рис. 2).

В задачи входило:

- (1) синтез новых серий димерных бисбензимидазолов **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)**, различающиеся структурой линкера и концевых фрагментов;
- (2) изучение взаимодействия данных соединений с ДНК различными физико-химическими методами;
- (3) определение констант диссоциации для некоторых представителей серий;
- (4) анализ способности полученных соединений проникать сквозь клеточную мембрану и окрашивать клетку;
- (5) исследование **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)** в качестве ингибиторов ряда ДНК-зависимых ферментов;
- (6) оценка противовирусной активности полученных соединений;
- (7) измерение цитотоксичности серий на различных клеточных линиях.

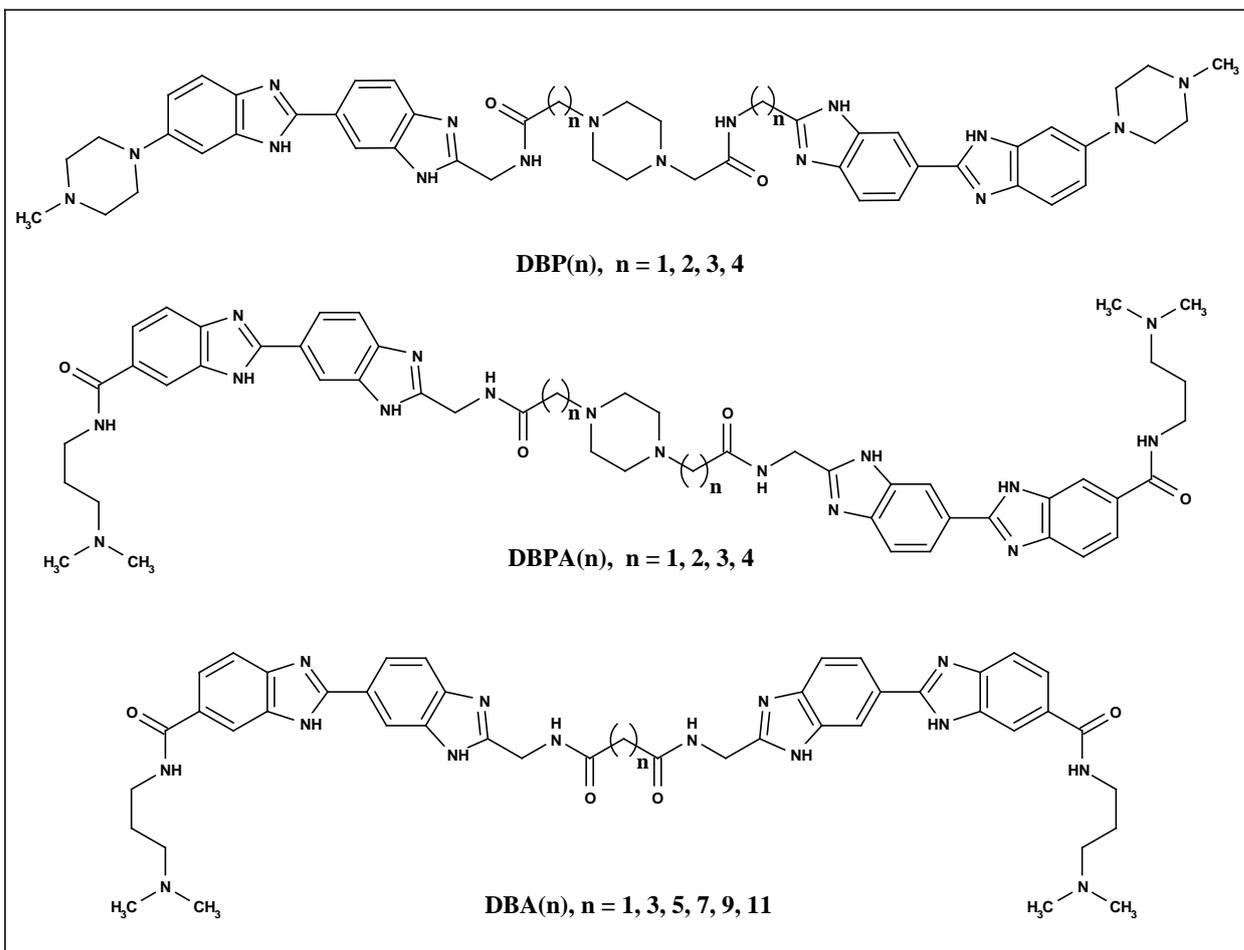


Рис. 2. Химические структуры димерных бисбензимидазолов **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)**.

Научная новизна. Впервые получены и описаны 14 димерных бисбензимидазолов 3 различных серий **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)**, где n – количество метиленов в линкере, соединяющем бисбензимидазольные блоки, разработаны методы синтеза и очистки для этих соединений. Набором физико-химических методов исследовано взаимодействие полученных веществ с ДНК. Показана их способность проникать в клетку и окрашивать ее. Обнаружена способность соединений ингибировать *in vitro* ряд ДНК-зависимых ферментов. Оценена их цитотоксичность и противовирусная активность.

Практическая значимость. Полученные димерные бисбензимидазолы проявили себя в качестве ингибиторов ДНК-топоизомеразы-I и ДНК-метилтрансферазы мыши Dnmt3a в низких микромолярных концентрациях. Соединения серии **DBA(n)** продемонстрировали противовирусную активность в отношении вируса простого герпеса 1 типа (ВПГ1) в микромолярной концентрации, а в отношении вируса иммунодефицита человека – в наномолярной. Также было обнаружено, что все соединения серий **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)** являются перспективными флуоресцентными красителями, благодаря своей

способности проникать через клеточную и ядерную мембраны, окрашивая при этом ядро клетки.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Получены и охарактеризованы три новые серии водорастворимых флуоресцентных димерных бисбензимидазолов, образующих комплексы с дцДНК.
2. Показана противовирусная активность этих соединений и их способность ингибировать ряд ДНК-зависимых ферментов.

Апробация результатов работы. Основные положения диссертации были доложены на межлабораторном колоквиуме в ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН 2017 г., на XXVIII и XXIX зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2016 г. и 2017 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 статей и 6 тезисов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка используемой литературы, включающего 227 источников. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста и содержит 2 таблицы, 57 схем и 45 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Структура димерных бисбензимидазолов.

Краситель Hoechst 33258, являющийся мономерным бисбензимидазолом, способен связываться с ДНК, преимущественно в АТ-богатых участках, образуя две водородные связи между O2 атомами тимина и N3 аденина с атомами N1 бензимидазольного кольца. При конструировании новых димерных бисбензимидазолов на основе Ht 33258 выбор линкера соединяющего два бисбензимидазольных фрагмента обуславливался его конформационной подвижностью и возможностью варьировать длину. Для этого были выбраны такие α,ω -алкандикарбоновые и 1,4-пиперазиндикарбоновые кислоты, чтобы длина образованных ими линкеров позволяла конечным соединениям занимать до одного витка ДНК, выполняя при этом роль бидендантного лиганда.

2. Синтез димерных бисбензимидазолов DBP(n), DBA(n) и DBPA(n).

Ключевым этапом получения обсуждаемых димерных бисбензимидазолов являлся синтез их мономеров – **MB** и **MBA**, содержащих два 2,6'-связанных бензимидазольных фрагмента, из которых в одну стадию были получены все конечные соединения.

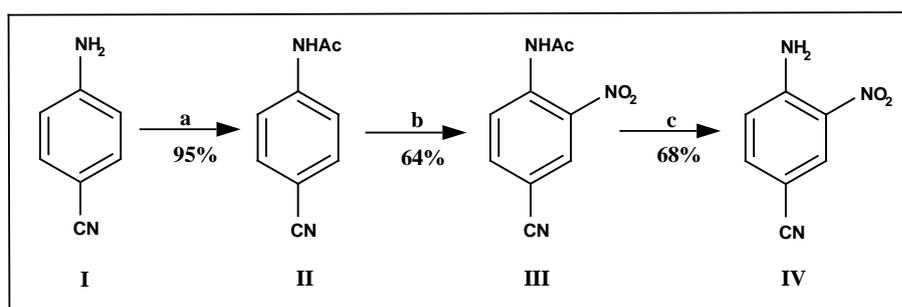
Основываясь на анализе литературы, можно выделить несколько основных подходов к синтезу бензимидазолов. Одним из самых распространенных является конденсация альдегидов с ароматическими о-диаминами. Подобным методом был синтезирован широкий набор бензимидазолов с различными заместителями. Однако, у данного способа

есть недостатки, заключающиеся в необходимости длительного нагревания реакционной смеси при высоких температурах (до 160°C) и хроматографического выделения продукта реакции. В более поздних вариантах данного метода необходимость в жестких условиях отсутствует, но ключевые реагенты или исходные альдегиды либо недоступны, либо являются дорогостоящими соединениями. Подобные недостатки свойственны и для конденсации ароматических о-диаминов с карбоновыми кислотами. Кроме того, в обоих методах невозможно использование легкоокисляющихся диаминов.

В нашем случае было решено остановиться на двух методах, позволяющих проводить реакцию в мягких условиях с высокими выходами – методе смешанных ангидридов и конденсации ароматических о-диаминов с имидоэфирами карбоновых кислот. К их недостаткам можно отнести проведение реакции при низких температурах (до -30°C) и трудоемкое выделение продукта в случае первого метода и длительная подготовка исходных реагентов для второго.

Основным исходным соединением для получения всех 3 серий димерных бисбензимидазолов являлся 4-амино-3-нитробензонитрил (IV), который был получен в 3 стадии из коммерчески доступного 4-аминобензонитрила (I). На первой стадии аминогруппа последнего была ацетилирована с помощью уксусного ангидрида с образованием 4-ацетамидбензонитрила (II). Затем в 3 положение была введена нитрогруппа под воздействием смеси $\text{NaNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ при 0-4°C, после чего полученный 4-ацетамид-3-нитробензонитрил (III) был дезацетилирован при кипячении в 8% H_2SO_4 , с образованием соединения IV.

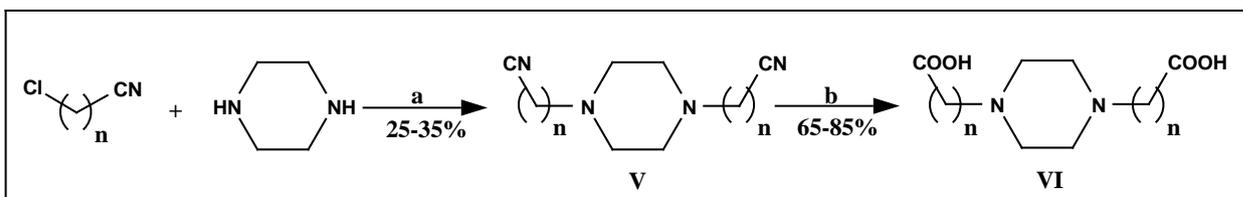
Схема 1. Синтез 4-амино-3-нитробензонитрила.



Реагенты и условия реакций: а) CH_3COONa , Ac_2O , 4°C, 1 ч; б) $\text{NaNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, 0-4°C, 4 ч; в) 8% H_2SO_4 , кипячение, 2 ч.

Для получения линкера, содержащего остаток 1,4-пиперазина, пиперазин был алкилирован ω-хлорпроизводными нитрилов, а продукты подверглись гидролизу с помощью кипячения в конц. HCl .

Схема 2. Синтез 1,4-пиперазиндикислот.



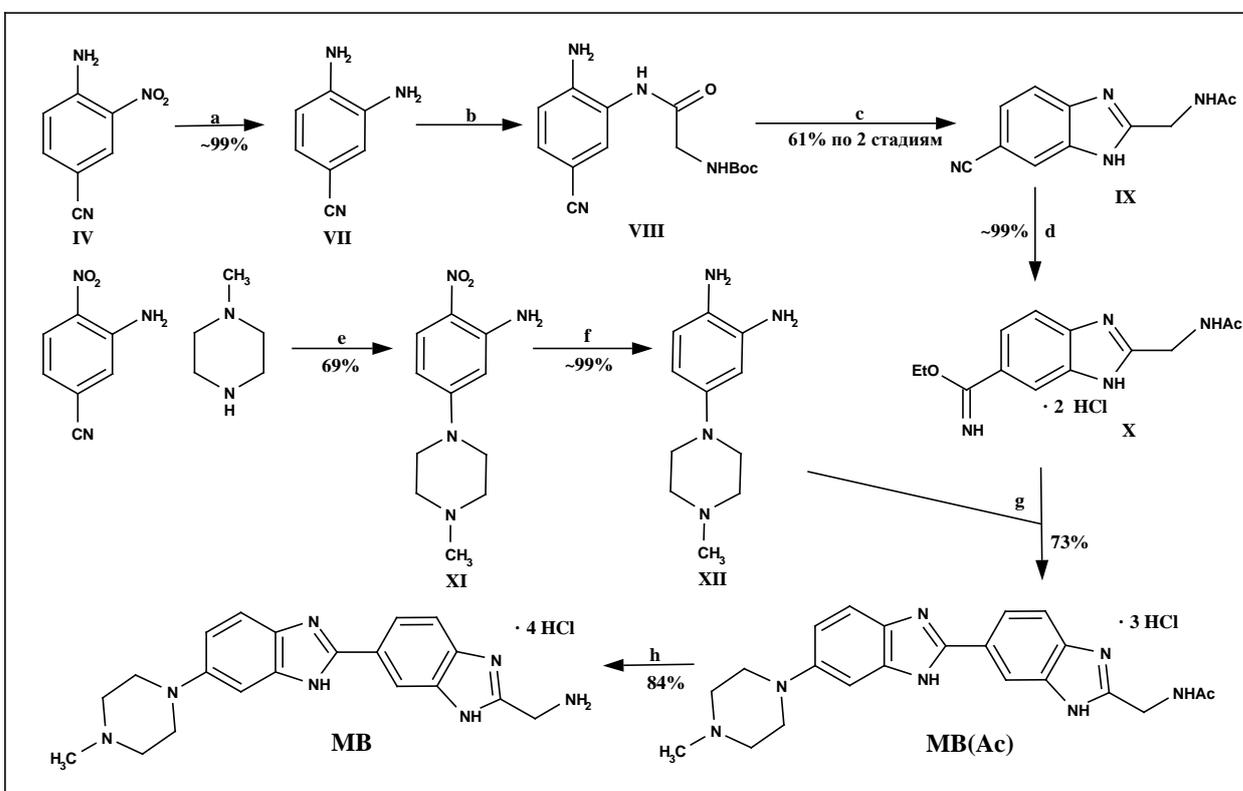
Реагенты и условия реакций: а) K_2CO_3 , толуол, кипячение, 4 ч; б) HCl , кипячение, 1 ч.

2.1. Синтез DBP(n).

Полученный ранее 4-амино-3-нитробензонитрил (IV) был восстановлен в токе водорода над Pd/C , образуя 3,4-диаминобензонитрил (VII), который затем был ацилирован Вос-Gly-OH методом смешанных ангидридов с помощью изобутилхлорформиата. После выделения моноацилпроизводное (VIII) было циклизовано при кипячении в ледяной $AcOH$ с образованием бензимидазола (IX). Последний был превращен в дихлоргидрат имидоэфира (X) по реакции Пиннера с количественным выходом.

5-хлор-2-нитроанилин был сконденсирован с N-метилпиперазином при нагревании в DMF при $150^\circ C$ в присутствии K_2CO_3 . Продукт (XI) был восстановлен в токе водорода над Pd/C . Образованный диамин (XII) был сконденсирован с полученным ранее дихлоргидратом имидоэфира (X) при кипячении в смеси $AcOH/abc$. EtOH. Полученный продукт без выделения был дезацетилирован с помощью конц. HCl , что привело к искомому мономерному бисбензимидазолу **MB**.

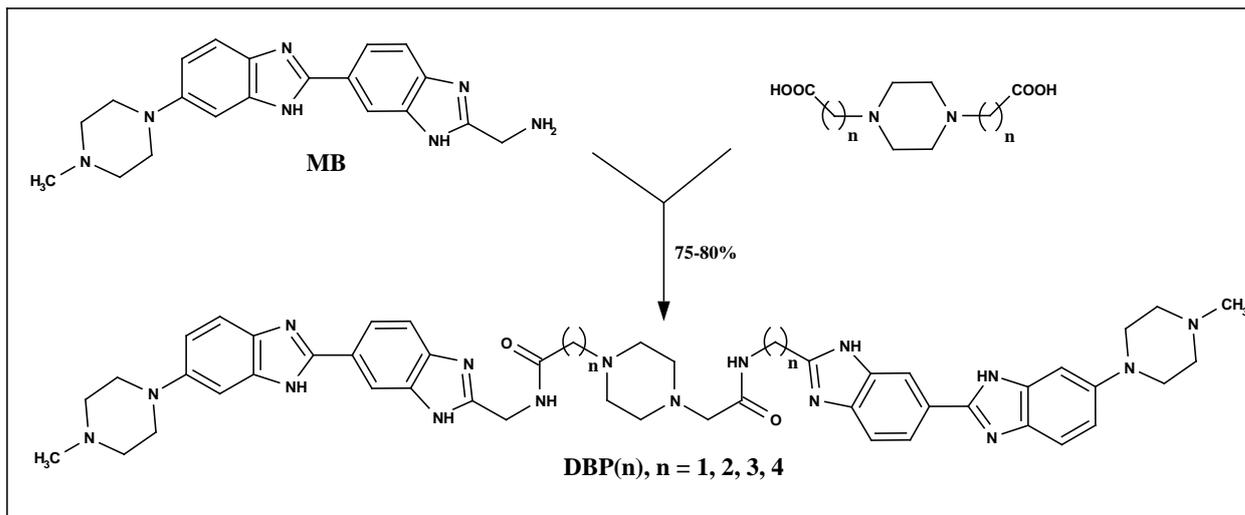
Схема 3. Синтез MB.



Реагенты и условия реакций: а) H₂, Pd/C, 4 ч; б) Вос-Gly-OH, i-BuOCOCl, -30°C, 20 ч; в) AcOH, кипячение, 2 ч; д) HCl, диоксан/абс. EtOH, 0-4°C, 3 суток; е) K₂CO₃, DMF, 150°C 4 ч; ф) H₂, Pd/C; г) AcOH/абс. EtOH, кипячение, 2 ч; з) конц. HCl, кипячение, 30 мин.

Конденсация **МВ** с полученными ранее пиперазиндикислотами (VI) с помощью конденсирующего агента BOP приводила к образованию димерного бисбензимидазола **ДВР(n)**.

Схема 4. Синтез **ДВР(n)**.

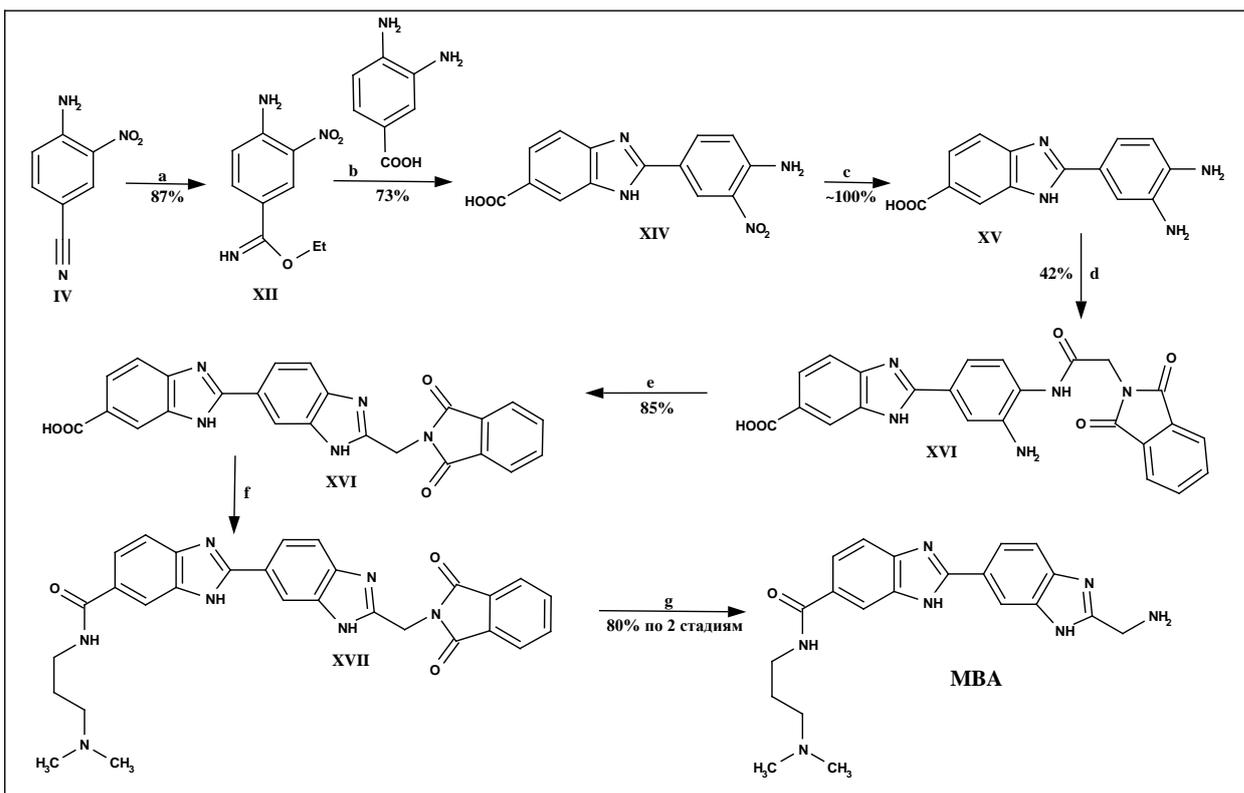


Реагенты и условия реакции: BOP, DMF, 20°C, 30 мин.

2.2. Синтез **ДВА(n)** и **ДВРА(n)**.

Полученный ранее 4-амино-3-нитробензонитрил (IV) был превращен в хлоргидрат имидоэфира соответствующей кислоты (XIII) по реакции Пиннера, а затем сконденсирован с 3,4-диаминобензойной кислотой при кипячении в абс. EtOH. Образовавшаяся кислота (XIV) была восстановлена в токе водорода над Pd/C, а продукт (XV) без выделения был ацилирован Pht-Gly-OH методом смешанных ангидридов с изобутил хлорформиадом. Моноацилированное производное (XVI) было циклизовано в уксусной кислоте и сконденсировано с N,N-диметиламинопропиламином с помощью конденсирующего агента HBTU. После снятия фталоильной защиты с концевой аминогруппы соединения (XVIII) при кипячении в EtOH в присутствии гидразин гидрата был образован мономерный бисбензимидазол МВА.

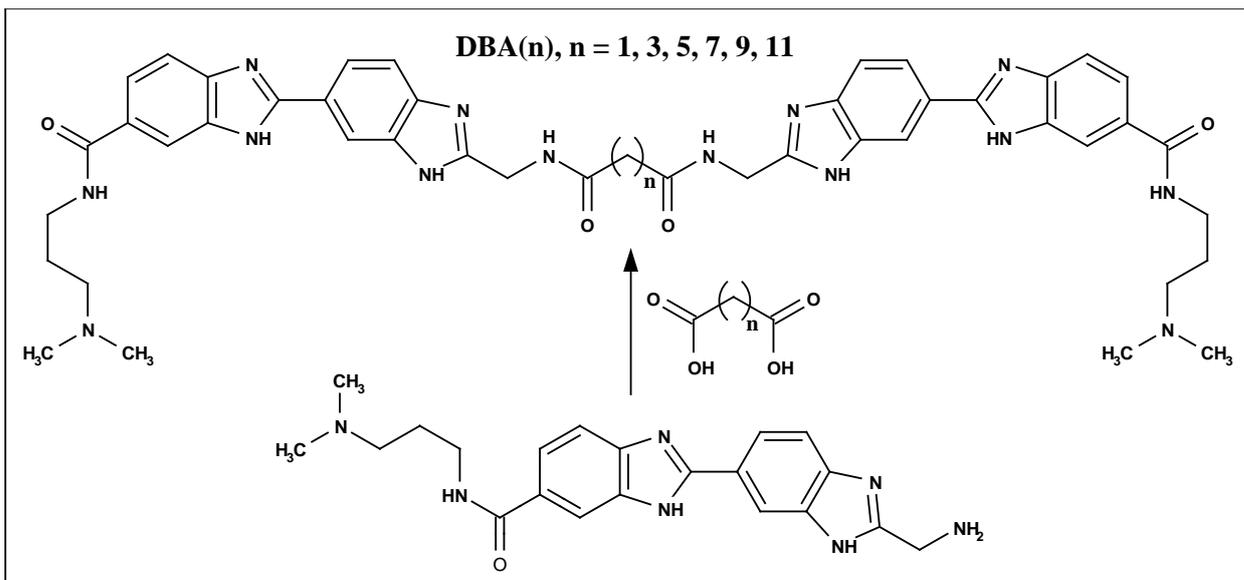
Схема 5. Синтез **МВА**.

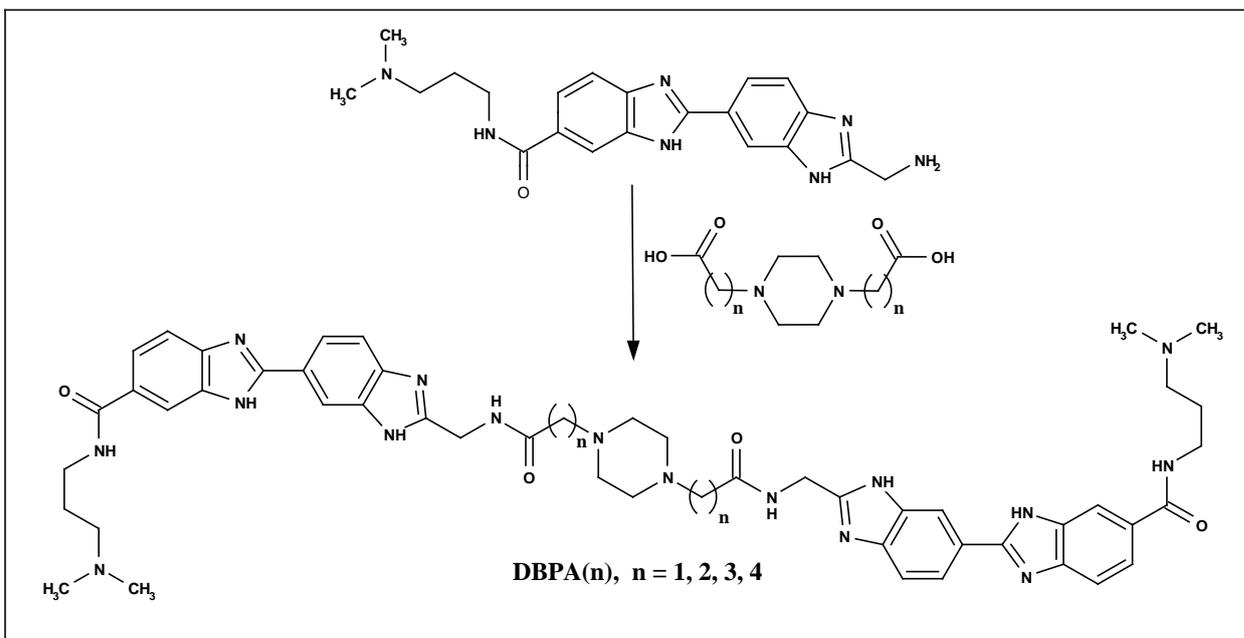


Реагенты и условия реакций: а) HCl, абс. EtOH, 3 суток; б) EtOH, кипячение, 2 ч; в) H₂, Pd/C, 4 ч; д) Pht-Gly-OH, *i*-BuOCOC1, -30°C, 20 ч; е) AcOH, кипячение, 2 ч; ф) NBTU, DIPEA, DMF, 1 ч; г) N₂H₄·H₂O, EtOH, кипячение, 1 ч.

При конденсации **МВА** с α,ω-алкандикарбоновыми или 1,4-пиперазин-дикарбоновыми кислотами были получены соединения серий **ДВА(n)** и **ДВРА(n)** соответственно.

Схема 6. Синтез ДВА(n) и ДВРА(n).





Реагенты и условия реакций: BOP, DIPEA, DMF, 0-4°, 1 ч.

3. Физико-химические исследования.

В совместной работе с В.И. Саляновым (ИМБ РАН) было исследовано взаимодействие полученных соединений серий **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)** с тимусной дцДНК различными оптическими методами, включая поглощение в УФ- и видимой областях спектра, флуориметрию и круговой дихроизм.

3.1 Спектры поглощения **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)**.

Было исследовано изменение спектров поглощения **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)** в присутствии дцДНК. Сопоставление спектров поглощения всех трех серий в присутствии разных концентраций дцДНК показывает, что характер их изменения аналогичен. При небольшом увеличении концентрации дцДНК в растворе наблюдался значительный гипохромный эффект, что указывает на образование комплекса (комплексов) этих соединений с дцДНК, в которых хромофоры лигандов взаимодействуют друг с другом. При дальнейшем увеличении концентрации дцДНК в растворе наблюдался сдвиг максимума их полосы поглощения в длинноволновую область спектра (батохромный сдвиг) (рис. 3 (А, Б)).

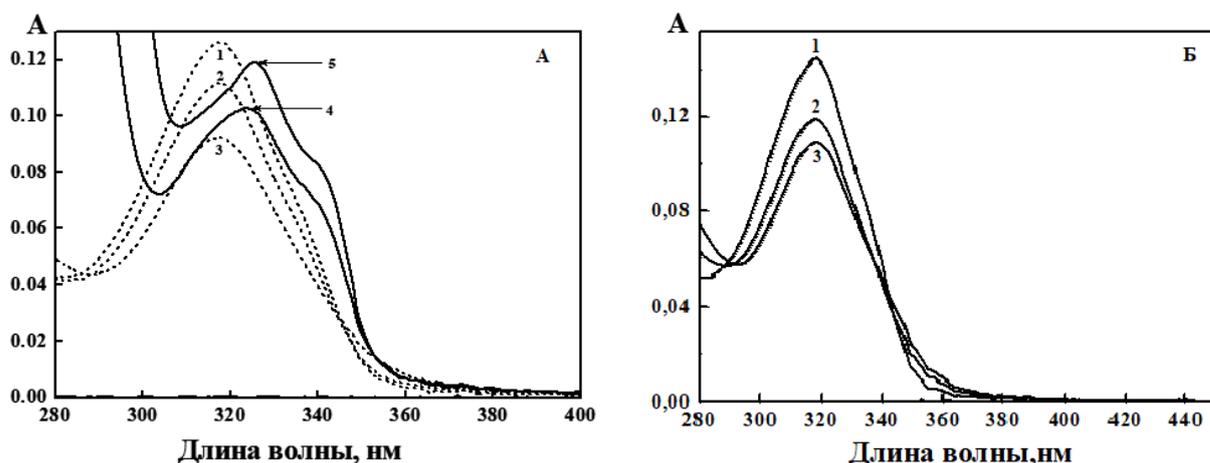


Рис. 3. А. Спектры поглощения **DBA(7)** в отсутствие (кривая 1) и в присутствии (кривые 2-5) дцДНК из тимуса теленка. Концентрация **DBA(7)** = 2.38×10^{-6} М; концентрация ДНК: 2 - 0.42×10^{-6} ; 3 - 2.11×10^{-6} ; 4 - 61.81×10^{-6} ; 5 - 29.17×10^{-5} М п.о., соответственно. Буфер: 1 мМ какодилат натрия (рН 6.8).

Б. Спектры поглощения **DBPA(2)** в отсутствие (кривая 1) и в присутствии (кривые 2-3) дцДНК из тимуса теленка; концентрация ДНК: 2 - 4.18×10^{-6} ; 3 - 8.36×10^{-6} М п.о., соответственно; концентрация **DBPA(2)** = 2.35×10^{-6} М. Буфер: 1 мМ какодилат натрия (рН 6.8)

3.2 Спектры флуоресценции **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)**.

Были получены спектры флуоресценции **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)** в отсутствие и в присутствии дцДНК. Все они имели схожий характер. Увеличение интенсивности флуоресценции **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)** в присутствии дцДНК (рис. 4 (А, Б)) подтверждает вывод об образовании ими комплексов с ДНК.

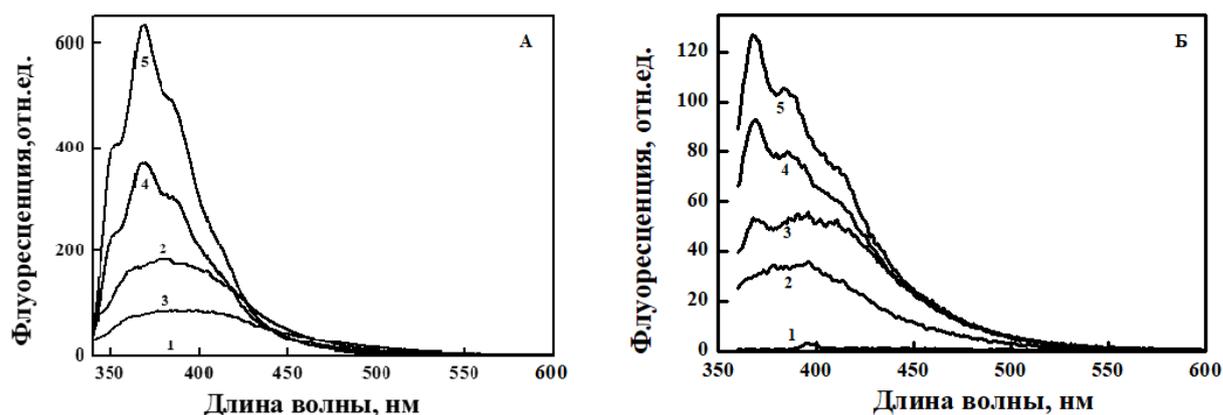


Рис. 4. А. Спектры флуоресценции буфера (1), **DBA(5)** в отсутствие (2) и в присутствии дцДНК из тимуса теленка (3-5). Концентрация **DBA(5)** = 1×10^{-6} М; концентрация ДНК: 3 - 4.18×10^{-6} М п.о.; 4 - 62.7×10^{-6} М п.о.; 5 - 209.1×10^{-6} М п.о. Буфер - 1 мМ какодилат натрия (рН 6.8).

Б. Спектры флуоресценции буфера (1), **DBPA(1)** в отсутствие (2) и в присутствии дцДНК из тимуса теленка (3-5). Концентрация **DBPA(1)** = 0.95×10^{-6} М; концентрация ДНК: 3 - 6×10^{-6} М п.о.; 4 - 10.5×10^{-6} М п.о.; 5 - 15.7×10^{-6} М п.о. соответственно. Буфер - 1 мМ какодилат натрия (рН 6.8).

3.3 Спектры кругового дихроизма **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)** в комплексе с ХЖКД ДНК.

Для определения локализации лиганда в комплексе с дцДНК был применен метод КД, с использованием холестерических жидкокристаллических дисперсий (ХЖКД) дцДНК. Появление в спектре КД ДНК в присутствии соединений положительных полос в области поглощения хромофоров лигандов (рис. 5 (А, Б)), не только свидетельствовало об образовании комплекса ДНК–лиганд, но и позволяло определить геометрические параметры самого комплекса, а, именно, его локализацию в одной из бороздок дцДНК. Поскольку Hoechst 33258 в комплексе с дцДНК, согласно данным рентгеноструктурного анализа, локализуется в узкой бороздке дцДНК, то его структурные аналоги **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)**, вероятно также являются узкобороздочными лигандами.

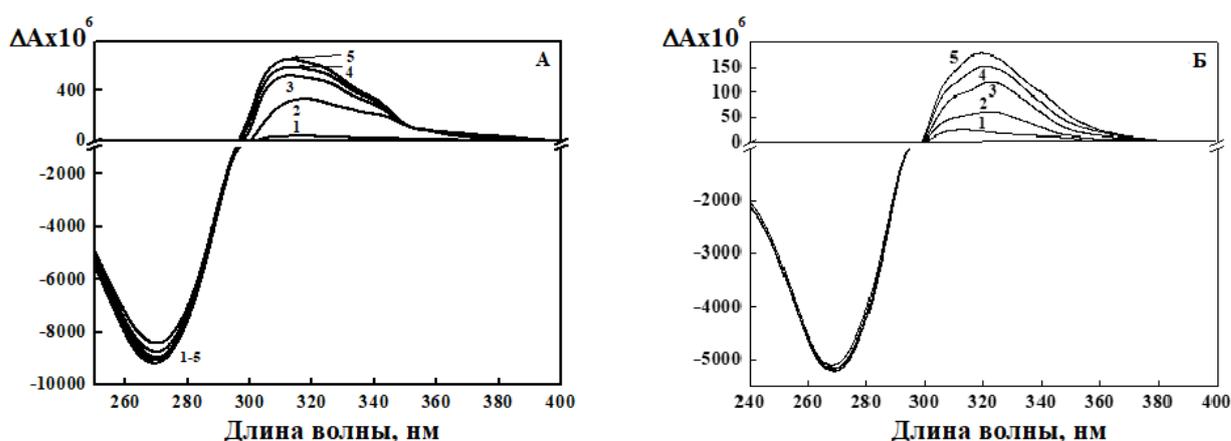


Рис. 5. А. Спектры КД ХЖКД дцДНК из тимуса теленка в растворе в отсутствие (кривая 1) и в присутствии **DBPA(1)** (кривые 2-5);

1 - 0; 2 - $0,525 \times 10^{-6}$ М; 3 - $1,05 \times 10^{-6}$ М; 4 - $2,1 \times 10^{-6}$ М; 5 - $4,22 \times 10^{-6}$ М **DBPA(1)**.

Концентрация ДНК - $3,03 \times 10^{-5}$ М п.о.; концентрация ПЭГ-4000 - 170 мг/мл; 0.3 М NaCl + 0.002 М Na-фосфатный буфер, pH 6.85.

Б. Спектры КД ХЖКД дцДНК из тимуса теленка в растворе в отсутствие (кривая 1) и в присутствии **DBA(7)** (кривые 2-4); 1 - 0; 2 - $0,47 \times 10^{-6}$ М; 3 - $1,42 \times 10^{-6}$ М; 4 - $2,37 \times 10^{-6}$ М; ; 4- $4,73 \times 10^{-6}$ М **DBA(7)**. Концентрация дцДНК - $1,67 \times 10^{-5}$ М п.о.; концентрация ПЭГ-4000 - 170 мг/мл; 0.3 М NaCl + 0.002 М Na-фосфатный буфер, pH 6,85.

4. Биохимические исследования.

4.1. Проникновение в клетку.

В совместной работе с О.Ю. Сусовой (НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина) методом флуоресцентной микроскопии была исследована способность соединений серий **DBP(n)** и **DBA(n)** проникать сквозь клеточную и ядерную мембраны и окрашивать дцДНК живых клеток. Соединения обеих серии в концентрациях 10 и 20 мкМ проникали в клеточное ядро в течение 20-40 часов (рис. 6, 7), при этом все соединения серии **DBA(n)** флуоресцировали

слабее. Соединения серии **DBA(n)** имели разную степень флуоресценции в клетке. Так, **DBA(1)** слабо светился в клетке, при этом флуоресценция возрастала по мере увеличения длины линкера, достигая максимальной интенсивности прокраски ядер для соединения **DBA(7)** после чего снижалась. Стоит отметить, что **DBA(9)** и **DBA(11)** концентрировались внутри ядра. Возможно, это связано с медленным проникновением в ядро более длинной молекулы, а также с большими агрегационными свойствами этих двух соединений.

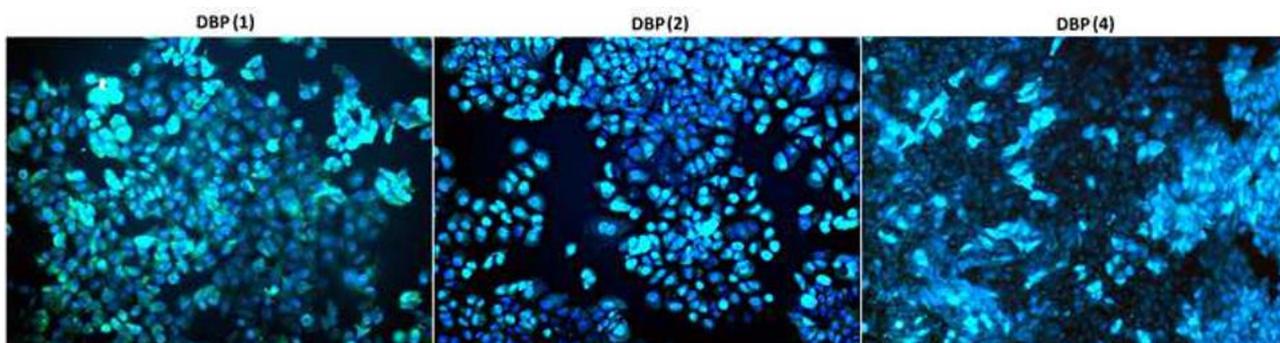


Рис. 6. Флуоресценция соединений серии **DBP(n)** в клетках рака молочной железы человека MCF7.

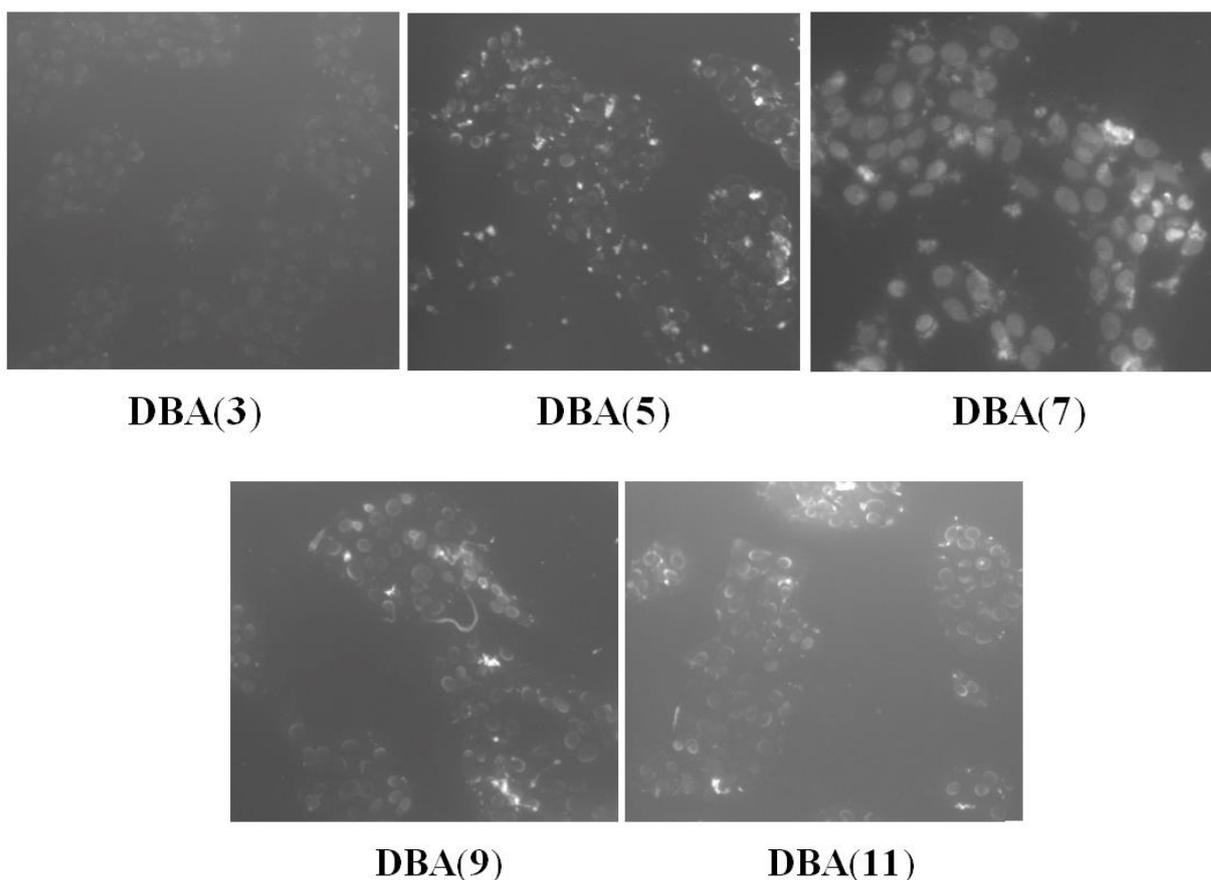
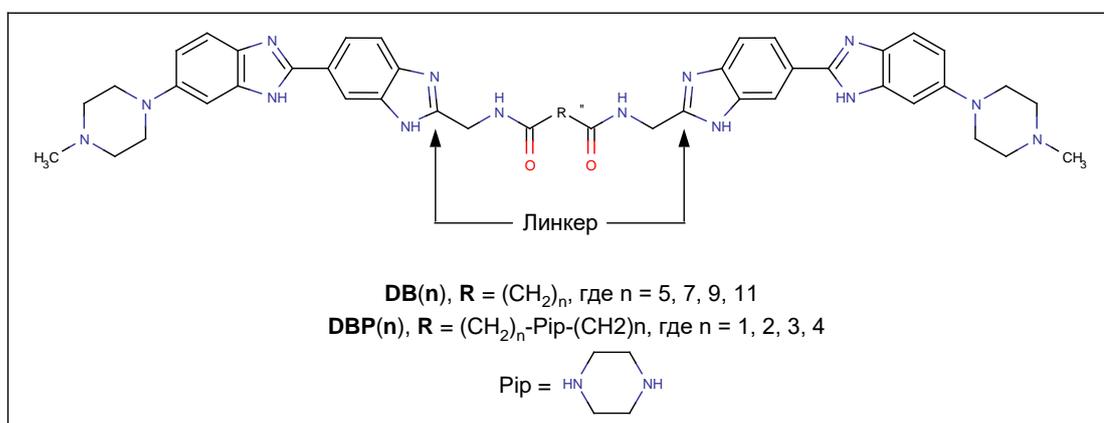


Рис. 7. Флуоресценция соединений серии **DBA(n)** в клетках U251 глиобластомы человека.

4.2. Ингибирование ДНК-топоизомеразы I.

ДНК-топоизомераза I (топо-I) является одним из ключевых ферментов, определяющих жизнедеятельность клетки. Топо-I регулирует топологию дцДНК во время процессов транскрипции, репликации, рекомбинации и репарации. Этот фермент релаксирует молекулы суперскрученной ДНК (ссДНК) за счет внесения одноцепочечных разрывов с последующим восстановлением ковалентной целостности ссДНК путем лигирования. Для оценки димерных бензимидазолов серии **DBA(n)** и **DBP(n)**, в качестве потенциальных ингибиторов топо-I, было проведено их попарное сравнение с молекулами серии **DB(n)**. Для более точной оценки были выбраны пары молекул **DBP(n)** и **DB(n)** с примерно одинаковой длиной линкера между бисбензимидазольными блоками этих молекул. Размер линкера определялся между атомами C2 бисбензимидазольных колец, отмеченных стрелками (рис.8).



Попарное сравнение:

DB(5) - 14.8 Å	DBP(1) - 14.6 Å	DB(7) - 17.8 Å	DBP(2) - 17.6 Å
DB(9) - 20.8 Å	DBP(3) - 20.6 Å	DB(11) - 23.8 Å	DBP(4) - 23.6 Å

Рис. 8. Попарное сравнение физических параметров между димерными бисбензимидазолами **DB(5,7,9,11)** и **DBP(1,2,3,4)**.

Способность димерных бисбензимидазолов ингибировать топо-I оценивалась визуально по оставшейся ссДНК или ее топоизомеров после электрофоретического разделения реакционной смеси в агарозном геле и последующего окрашивания бромистым этидием (Рис. 9). При концентрациях 5,10 мкМ **DBP(1)** и **DBP(2)** ингибируют топо-I лучше, чем **DB(5)** и **DB(7)**, соответственно. **DBP(3)** ингибирует лучше, чем **DB(9)**, поскольку для этой пары наблюдается сходный эффект задержки релаксации ссДНК для 2,5 мМ **DBP(3)** и 10 мМ **DB(9)**. Таким образом, **DBP(3)** приблизительно в 4 раза

эффективнее **DB(9)**. В другой паре **DBP(4)** существенно эффективнее **DB(11)**: ингибирующее действие **DBP(4)** начинается с концентрации 5 μM , в то время как **DB(11)** не ингибирует даже при 10 μM . Таким образом, соединения серии **DBP(n)** по сравнению с серией **DB(n)** имеют преимущество в ингибировании топо-I.

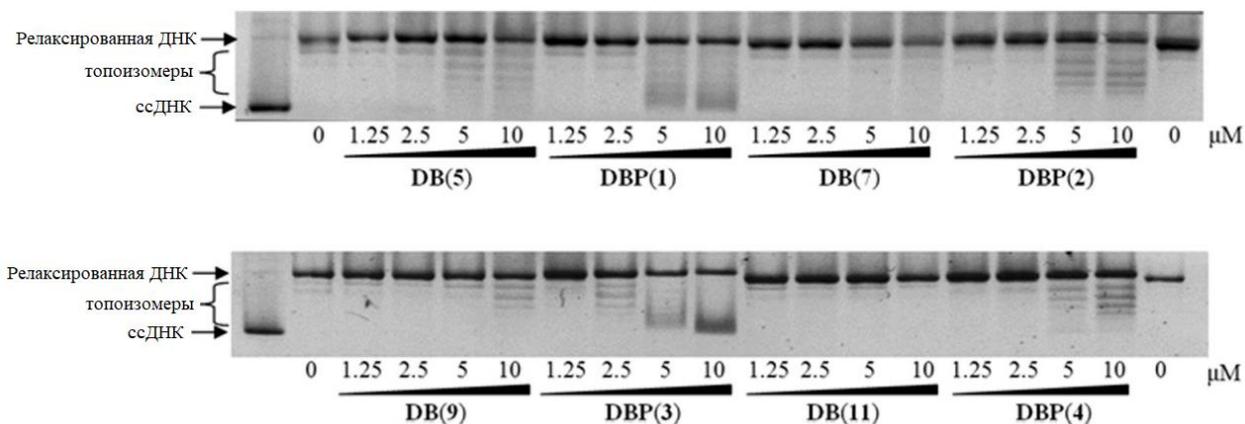


Рис. 9. Сравнение способности ингибировать топо-I у серии соединений **DBP(n)** с соединениями серии **DB(n)**, обладающими близким размерами линкера.

Соединения серии **DBA(n)** так же, как и **DBP(n)** оказались лучшими ингибиторами топо-I по сравнению с серией **DB(n)** (рис. 10). Например, суперскрученная ДНК сохраняется в присутствии **DBA(3)** при концентрации не более 5 мкМ, а в присутствии **DB(3)** не более 10 мкМ.

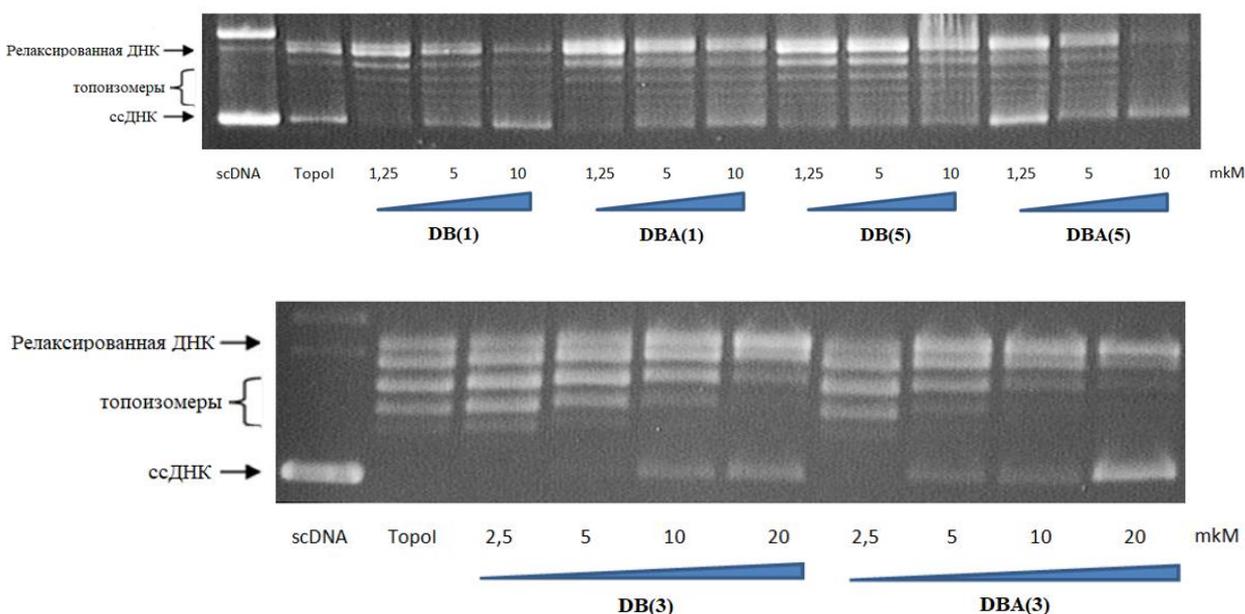


Рис. 10. Сравнение способности ингибировать топо-I у серии соединений **DBA(n)** с соединениями серии **DB(n)**, обладающими одинаковыми размерами линкера.

4.3. Ингибирование ДНК-метилтрансферазы M.SssI.

В совместной работе с Е.С. Громовой (химический факультет, МГУ) ингибирующие эффекты **DBP(n)** на метилирование ДНК были исследованы с использованием прокариотической ДНК-метилтрансферазы (MTase) M.SssI, которая как и MTase млекопитающих с высокой специфичностью узнает и метилирует в ДНК последовательность CpG. В качестве субстрата использовали дуплекс fA –30-тизвенный дуплекс **A** (рис. 11), меченный по 5'-концу 6(5)-карбоксифлуоресцеином.

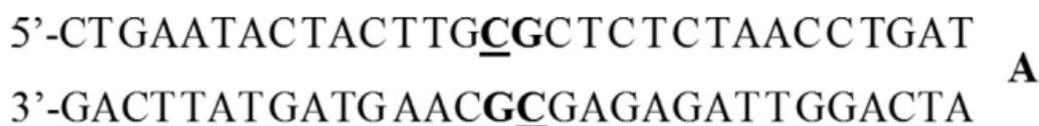


Рис. 10. Структура 30-тизвенного дуплекса **A**. Участок узнавания прокариотической МТазы M.SssI CpG выделен жирным, метилируемые остатки цитозина подчеркнуты.

Дуплекс fA инкубировали в присутствии **DBP(n)** в концентрациях 0-200 мкМ в течение трех суток для формирования комплекса **DBP(n)** с ДНК. Степень метилирования ДНК анализировали по защите метилированной ДНК от расщепления эндонуклеазой рестрикции *Hin6I* (R.*Hin6I*). На первом этапе фермент вносит метильную группу в пятое положение остатка цитозина в последовательности CpG неметилированного ДНК-дуплекса. После этого ДНК обрабатывают R.*Hin6I*. Неметилированные молекулы ДНК подвергаются расщеплению по сайту GCGC с образованием 14-ти звенных фрагментов, при этом метилированные молекулы ДНК защищены от расщепления. После разделения в денатурирующем ПААГ степень метилирования ДНК определялась, исходя из интенсивности флуоресценции полос, соответствующих 14-ти звенному расщепленному и 30-ти звенному нерасщепленному олигонуклеотидам (рис. 11А). Относительную степень метилирования (R) рассчитывали с учетом флуоресценции полос, соответствующих пробам, не содержащим ингибитора и эндонуклеазы R.*Hin6I*.

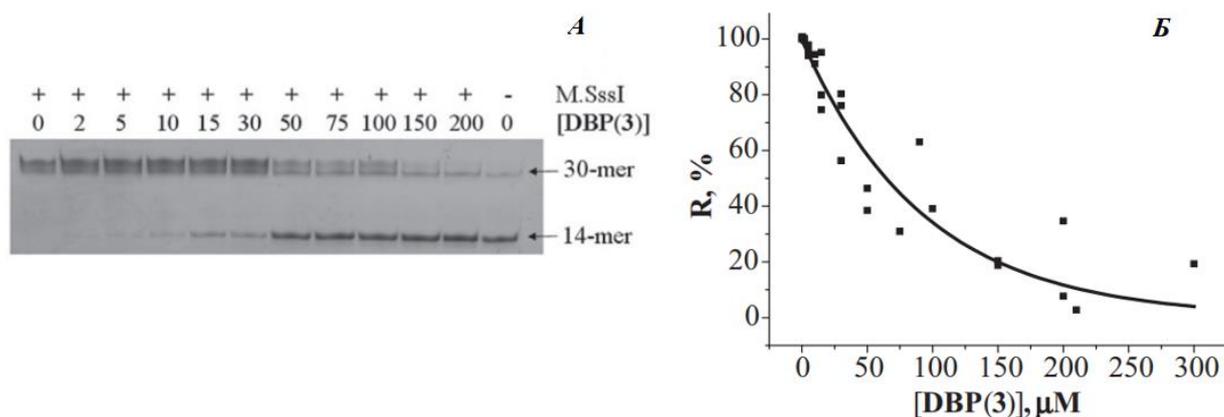


Рис 11. Анализ ингибирующих свойств **DBP(3)** при 3-х суточном инкубировании лиганда с ДНК. **А** - анализ расщепления дуплекса fA эндонуклеазой R.Hin6I после метилирования его M.SssI в присутствии 0-200 μM **DBP(3)**. [ДНК] 300 nM, [AdoMet] 25 μM , [M.SssI] 2 μM . Флуорограмма 20%-ного денатурирующего ПААГ. **Б** - ингибирование метилирования в присутствии различных концентраций **DBP(3)**. Зависимости относительной степени метилирования ДНК (R) (в %) от концентрации **DBP(3)**.

Как видно из табл. 1, для всех четырех **DBP(n)** показана способность ингибировать реакцию метилирования ДНК-дуплекса fA МТase M.SssI в микромолярных количествах. При этом существенных различий в способности ингибировать метилирование между соединениями группы **DBP(n)** не обнаруживается.

Соединение	DBP(1)	DBP(2)	DBP(3)	DBP(4)
$\text{IC}_{50} \pm \text{SEM}^*$ (μM)	74 ± 11	76 ± 10	64 ± 6.5	63 ± 5

Табл 1. Ингибирование метилирования дуплекса fA МТase M.SssI в присутствии **DBP(n)**. Значения IC_{50} были рассчитаны на основании не менее 3-х экспериментов. [ДНК] 300 nM, [AdoMet] 25 μM , [M.SssI] 2 μM .

4.4. Противовирусная активность.

В совместной работе с А.А. Куш, Р.Р. Климовой (НИИ вирусологии имени Д. И. Ивановского РАМН) противовирусная активность новой серии димерных бисбензимидазолов **DBA(n)** исследована в модельных клеточных системах инфекций, вызванных вирусом простого герпеса 1 типа (ВПГ1) и цитомегаловирусом человека (ЦМВ). Данные, полученные при анализе противовирусной активности, показали, что соединения **DBA(1)** и **DBA(7)** обладают ингибирующими свойствами в отношении ВПГ1-инфекции в терапевтической схеме *in vitro*, причем **DBA(7)** полностью подавляет вирусную инфекцию. Соединение **DBA(11)** проявило лечебные свойства как в

отношении ВПГ1-инфекции, так и ЦМВ-инфекции *in vitro*. Таким образом, соединение **ДВА(11)**, проявляющее активность против двух широко распространенных вирусных инфекций, заслуживает дальнейших исследований. Соединение **ДВА(7)** помимо терапевтического действия проявило микробицидные свойства при экстренной профилактике, а также нейтрализовало инфекционную активность ВПГ1 *in vitro*. Высокая противовирусная активность **ДВА(7)** во всех схемах воздействия указывает на перспективность этого соединения как основы для разработки новых противогерпетических препаратов.

Представляло интерес выяснить, на какую стадию вирусной инфекции действует соединение **ДВА(7)**. Литературные данные указывают на то, что экспрессия генов герпесвирусов в инфицированных клетках имеет строго регулируемый каскадный характер, и синтез поздних белков (L) происходит только во время или после репликации геномной дцДНК герпесвирусов. Было проведено иммуноцитохимическое изучение культуры клеток Vero, зараженной ВПГ1, на поздней стадии инфекции (48 ч) с помощью моноклональных антител (МкАТ) к структурному L-белку gB ВПГ1. В качестве контроля для оценки противовирусной активности использовали ацикловир (АЦВ). Анализ препаратов показал, что количество клеток, содержащих gB ВПГ1 в инфицированной культуре, не обработанной **ДВА(7)** или АЦВ, составило 95,6% (рис.12а). В культуре, содержащей **ДВА(7)**, количество клеток, окрашенных МкАТ к gB, снизилось до 10% ($p < 0,0001$, рис.12б). В клетках Vero, обработанных АЦВ, количества клеток, содержащих gB ВПГ1 составило 0,1% от всех клеток популяции ($p < 0,0001$, рис.12в). Известно, что подавляя активность вирусной дцДНК полимеразы, АЦВ ингибирует репликацию дцДНК ВПГ. Данные о значительном снижении синтеза поздних вирусных белков под действием **ДВА(7)** также свидетельствуют о негативном влиянии этого соединения на репликацию ДНК ВПГ. Можно предположить, что полученные результаты объясняются связыванием димерных бисбензимидазолов **ДВА(n)** с АТ парами в дцДНК вируса герпеса, однако молекулярные механизмы противовирусного действия предстоит детально изучить в дальнейших экспериментах.

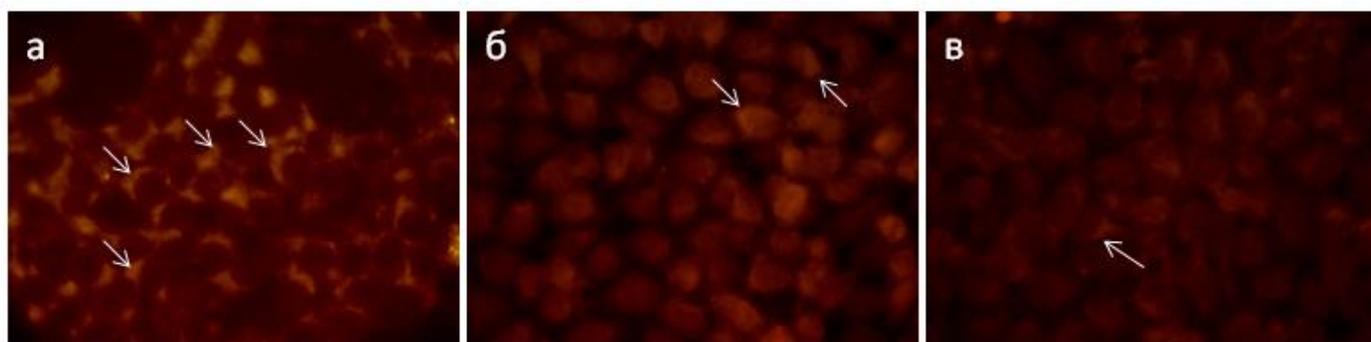


Рис. 12. Влияние исследуемых соединений на синтез позднего белка gB в культуре клеток Vero, инфицированной ВПГ1.

а – инфицированная культура клеток Vero (контроль); **б** – инфицированная культура клеток Vero, обработанная соединением **DBA(7)** в концентрации 50 мкг/мл; **в** – инфицированная культура клеток Vero, обработанная АЦВ в концентрации 10 мкг/мл.

В совместной работе с М.Б. Готтих и С.П. Королёвым (химический факультет, МГУ) было изучено ингибирующее действие димерных бисбензимидазолов серии **DB(n)** и **DBA(n)** на активность интегразы (ИН) ВИЧ1 в реакции 3'-процессинга. В реакции использовался рекомбинантный белок ИН, а в качестве субстрата – олигонуклеотидный 21-звенный ДНК-дуплекс. В результате реакции с 3'-конца 5'-³²P-меченной цепи отщеплялся динуклеотид GT. Этот процесс визуализировали электрофоретически в полиакриламидном геле. Было показано, что все изученные вещества подавляют каталитическую активность ИН (таблица 2). Можно видеть, что при увеличении длины линкера значительно увеличивается ингибиторный эффект, при этом ингибиторы серии **DB(n)** оказались существенно менее активны, чем ингибиторы серии **DBA(n)**.

Название	IC ₅₀ (процессинг), мкМ	Название	IC ₅₀ (процессинг), мкМ
DB(1)	70±20	DBA(1)	5±1
DB(3)	50±10	DBA(3)	4±1
DB(5)	35±6	DBA(5)	2,5±0,5
DB(7)	5±1,4	DBA(7)	1,6±0,6
DB(9)	4±1	DBA(9)	0,5±0,2
DB(11)	2,5±0,7	DBA(11)	0,06±0,02

Таблица 2. Результаты ингибирования реакции 3'-процессинга интегразы ВИЧ1.

Как видно из таблицы, вся серия **DBA(n)** обладает большей ингибиторной активностью в отношении интегразы ВИЧ1 по сравнению с серией **DB(n)** в среднем на порядок, а в случае **DBA(11)** – примерно на 2 порядка.

4.5. Цитотоксичность.

Цитотоксичность серии **DBP(n)** оценивалась в МТТ-тесте. В работе использовались две клеточные линии: MCF-7 - рак молочной железы человека и NKE-hTERT- нормальные фибробласты эпителия почки человека. Результаты МТТ-теста показали различное цитотоксическое воздействие на клетки исследуемых веществ. Все димерные бисбензимидазолы серии **DBP(n)**, а также мономерные бисбензимидазолы **Ht** и **MB** обладали большей цитотоксичностью в отношении опухолевой клеточной линии MCF-7, чем неопухолевой NKE-hTERT. Соединения серии **DBP(n)** по сравнению с **Ht** оказались слаботоксичны для опухолевой линии MCF-7, так как для них IC_{50} составило несколько десятков микромолей.

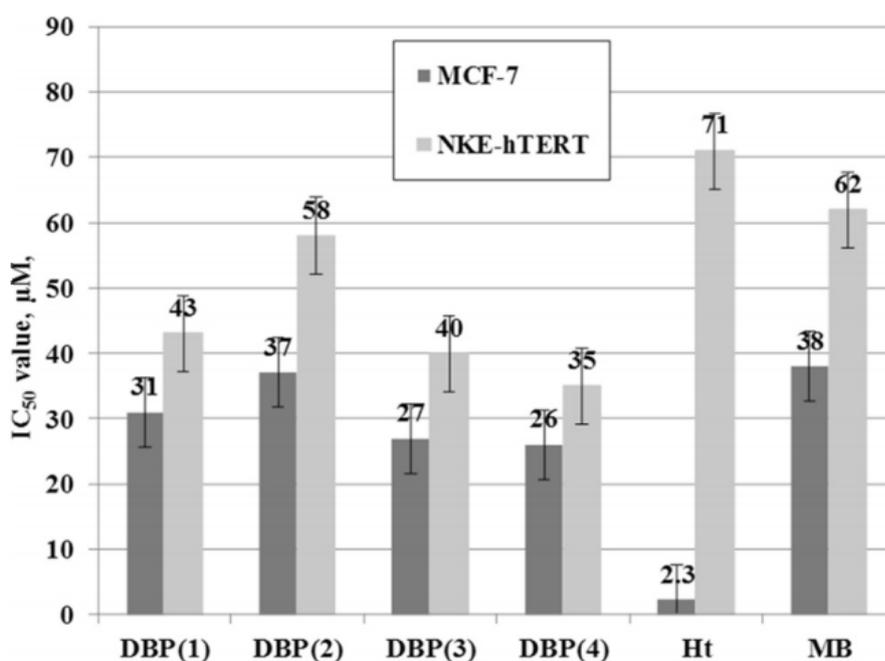


Рис. 13. Цитотоксичность димерных бисбензимидазолов серии **DBP(n)** и мономерных бисбензимидазолов **Ht** и **MB** на клеточных линиях MCF-7 и NKE-hTERT.

При сравнении биологической активности новой серии димерных бисбензимидазолов **DBA(n)** и **DBPA(n)** с серией **DB(n)** выяснилось, что новые соединения не цитотоксичны на опухолевых клеточных линиях MCF7, HBL100, Caki, Scov3, MelMe и неопухолевых клеточных линиях MCF10A, HEK298. IC_{50} новых соединений превышало 200 мкМ, в то время, как соединения серии **DB(n)** демонстрировали цитотоксичность в

интервале 20 – 90 мкМ, что в 2 и более раз выше чем у **DBA(n)**. Таким образом, можно сделать вывод о низкой цитотоксичности новых серий, содержащих концевые N,N-диметиламинопропилкарбоксамидные фрагменты.

Выводы

1. Осуществлен синтез 14 новых флуоресцентных АТ-специфичных симметричных димерных бисбензимидазолов трех разных серий – **DBP(n)**, **DBA(n)** и **DBPA(n)**.
2. Охарактеризовано связывание полученных соединения с двухцепочечной ДНК комплексом физико-химических методов, установлена их локализация в одной из ее бороздок.
3. Продемонстрировано наличие ингибиторных свойств у полученных соединений в отношении ряда ДНК-зависимых ферментов.
4. Обнаружена высокая противовирусная активность у ряда синтезированных димерных бисбензимидазолов.
5. Установлена низкая цитотоксичность полученных флуоресцентных димерных бисбензимидазолов и их способность проникать в живую клетку с окрашиванием ядра.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи:

1. Ivanov A. A., **Koval V. S.**, Susova O. Yu., Salyanov V. I., Oleinikov V. A., Stomakhin A. A., Shalginskikh N. A., Kvasha M. A., Kirsanova O. V., Gromova E. S., Zhuze A. L. DNA specific fluorescent symmetric dimeric bisbenzimidazoles DBP(n): The synthesis, spectral properties, and biological activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2015, **25**, 2634-2638.
2. Чурюкина К. А., Замулаева И. А., Иванов А. А., **Коваль В. С.**, Жузе А. Л. Радиомодифицирующее и противоопухолевое действие синтетических димерных бисбензимидазолов на клетки рака молочной железы линии MCF-7 in vitro. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2017, **2**, 136-144.
3. **В. С. Коваль**, А. А. Иванов, В. И. Салянов, А. А. Стомахин, В. А. Олейников, А. Л. Жузе. Лиганды, специфичные к определенным последовательностям пар оснований ДНК. XVI. Серия флуоресцентных димерных бисбензимидазолов DBP(n) с 1,4-пиперазин-содержащими линкерами. *Биоорганическая химия*, 2017, **43(2)**, 167–173.
4. Климова Р. Р., Момотюк Е. Д., Демидова Н. А., Чернорыж Я. Ю., **Коваль В. С.**, Иванов А. А., Жузе А. Л., Куш А. А. Димерные бисбензимидазолы подавляют инфекции, вызванные вирусом простого герпеса и цитомегаловирусом человека, в клеточных культурах. *Вопросы вирусологии*, 2017, **62(4)**, 162-168.
5. Svetlana V. Kostyuk, Margarita A. Kvasha, Daria A. Chrabrova, Olga V. Kirsanova, Elizaveta S. Ershova, Elena M. Malinovskaya, Natalia N. Veiko, Alexander A. Ivanov, **Vasiliy S. Koval**, Alexei L. Zhuze, Vadim H. Tashlitskiy, Pavel E. Umriukhin, Sergey I.

Kutsev, Elizaveta S. Gromova. Symmetric dimeric bisbenzimidazoles DBP(n) reduce methylation of RARB and PTEN while significantly increase methylation of RRNA genes in cancer cells MCF-7. PLoS ONE, 2018, **13**(1): e0189826.

6. Melkina O. E., **Koval V. S.**, Ivanov A. A., Zhuze A. L., Zavilgelsky G. B. DNA sequence-specific dimeric bisbenzimidazoles DBP(n) and DBPA(n) as inhibitors of H-NS silencing in bacterial cells. Microbiological Research, 2018, **207**, 75-82.

Тезисы:

1. Чурюкина К.А., Жузе А.Л., Иванов А.А., **Коваль В.С.**, Замулаева И.А. (2016) Действие димерных бисбензимидазолов на химиорезистентную популяцию опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7. 2-ая конференция молодых ученых, посвященная памяти академика А.Ф. Цыба "Перспективные направления в онкологии и радиологии".- Обнинск: ФГБУ "ВНИИ ГМИ-МЦД", 2016, 167-168.
2. Храброва Д.А., Громова Е.С., Вейко Н.Н., Ташлицкий В.Н., Костюк С.В., Кваша М.А., Жузе А.Л., **Коваль В.С.**, Ершова Е.С., Иванов А.А. (2016) Влияние димерных бисбензимидазолов, содержащих пиперазиновый цикл в линкере, на метилирование ДНК в клетках рака молочной железы. Материалы II всероссийской конференции по молекулярной онкологии 6-8 декабря 2016 г., Москва. Успехи Молекулярной Онкологии, **3**(4) 83.
3. Чурюкина К.А., **Коваль В.С.**, Иванов А.А., Жузе А.Л., Замулаева И.А. (2017) Комбинированное действие гамма-излучения и димерных бисбензимидазолов на стволовые клетки рака молочной железы человека линии MCF-7. Тезисы на международную конференцию "Радиобиологические основы лучевой терапии", 20-21 июня 2017 года в г. Обнинск.
4. **В.С.Коваль**, А.Л.Жузе, В.А.Олейников. (2016) Новая серия димерных бисбензимидазолов – флуоресцентных ДНК-специфичных узкобороздочных лигандов. XXVIII зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 8-11 февраля 2016 года в г. Москва.
5. **В.С.Коваль**, А.Л.Жузе, В.А.Олейников. (2017) Новые серии димерных бисбензимидазолов – флуоресцентных ДНК-специфичных узкобороздочных лигандов. XXIX зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 7-10 февраля 2017 года в г. Москва.
6. Чурюкина К.А., Жузе А.Л., Иванов А.А., **Коваль В.С.**, Макаренко С.А., Замулаева И.А. (2017) Противоопухолевое и радиомодифицирующее действие синтетических димерных бисбензимидазолов на стволовые клетки рака молочной железы in vitro. 3-я конференция молодых ученых, посвященная памяти академика А.Ф. Цыба "Перспективные направления в онкологии и радиологии".- Обнинск: МРНЦ им. А.Ф. Цыба, 2017, 97-98.

