

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ
BIOORGANIC CHEMISTRYУДК 577.117.2+577.151.63 + 577.112;004.942
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-1-62-67>Поступила в редакцию 23.11.2021
Received 23.11.2021**Я. В. Фалетров^{1,2}, Г. И. Позняк¹, П. С. Яковец¹, Н. С. Фролова^{1,2}, В. М. Шкуматов^{1,2}**¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь²Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь**НОВЫЕ ЛИПОФИЛЬНЫЕ КОНЬЮГАТЫ ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩЕГО NBD-ПИПЕРАЗИНА:
СИНТЕЗ, *IN SILICO* ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЛИПИДНЫМ БИСЛОЕМ
И ЦИТОХРОМАМИ P450**

Аннотация. Синтезированы два новых флуоресцирующих производных NBD-пиперазина с липофильными остатками формилхолестерола и гексановой кислоты (соединения **2** и **3** соответственно). Расчетно-теоретическими методами показана их возможность проникать через липидный бислой, а также аффинно связываться с некоторыми цитохромами P450 человека (**2** с ланостерол 14 α -деметилазой CYP51, **3** с лекарство-превращающими CYP1A1, CYP2D6, CYP3A4; энергия связывания E_{bind} в диапазоне –14,4...–10 ккал/моль) и микобактерий (**2** со стерол-27 гидроксиказой CYP125, **3** с «орфанным» CYP164; E_{bind} в диапазоне –13,3...–9,1 ккал/моль). Полученные вещества и соответствующие расчетно-теоретические данные будут способствовать приоритизации исследований *in vitro* для целей исследования функций этих белков.

Ключевые слова: NBD-пиперазин, гексановая кислота, холестерин, *in silico* анализ проницаемости мембран, докинг

Для цитирования. Новые липофильные конъюгаты флуоресцирующего NBD-пиперазина: синтез, *in silico* взаимодействие с липидным бислоем и цитохромами P450 / Я. В. Фалетров [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2022. – Т. 58, № 1. – С. 62–67. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-1-62-67>

Y. V. Faletrov^{1,2}, H. I. Pozniak¹, P. S. Yakovets¹, N. S. Frolova^{1,2}, V. M. Shkumatov^{1,2}¹Belarusian State University, Minsk, Belarus²Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Belarus**NEW LIPOPHILIC CONJUGATES OF FLUORESCENT NBD-PIPERAZINE:
SYNTHESIS, *IN SILICO* INTERACTIONS WITH LIPID BILAYER AND CYTOCHROMES P450**

Annotation. Two new fluorescent NBD-piperazine derivatives with lipophilic substituents of formylcholesterol and hexanoic acid (compounds **2** and **3**, respectively) were synthesized. Using *in silico* calculations, their abilities to permeate through lipid bilayer and to be bound affinely with some cytochromes P450 of human (**2** with lanosterol 14 α -demethylase CYP51, **3** with drug-metabolizing CYP1A1, CYP2D6, CYP3A4; energy of binding E_{bind} from –14.4 to –10 kcal/mol) and of mycobacteria (**2** with sterol 27-hydroxylase CYP125, **3** with “orphan” CYP164; E_{bind} from –13.3 to –9.1 kcal/mol) were demonstrated. The synthesized compounds and calculated computational data will contribute to prioritization of *in vitro* investigations aiming to revealing properties of the proteins.

Keywords: NBD-piperazine, hexanoic acid, cholesterol, *in silico* membrane permeability, docking

For citation. Faletrov Y. V., Pozniak H. I., Yakovets P. S., Frolova N. S., Shkumatov V. M. New lipophilic conjugates of fluorescent NBD-piperazine: synthesis, *in silico* interactions with lipid bilayer and cytochromes P450 // *Vestsi Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2022, vol. 58, no. 1, pp. 62–67 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-1-62-67>

Введение. NBD-пиперазин (4-(N-пиперазинил)-7-нитробензофуразана, NBDpip, **1**) является флуоресцирующим соединением, используемым как «молекулярный инструмент» типа флуоресцентный маркер для лизосом [1]. Это его свойство обусловлено тропностью к лизосомам ли-

пофильных вторичных или третичных аминов [2]. Также установлено, что **1** взаимодействует с сероводородом с образованием нефлуоресцентного NBD-тиола розового цвета [3] и пиперазина. Эти данные делают интересным получение и исследование биологических свойств производных **1**. Отметим, что биофизические и биохимические свойства *N*-ацильных и *N*-карбамоил производных **1** практически не освещены в научной литературе. В базе данных Pubchem упоминаются несколько ацилпроизводных **1** (хлороацетил (cid 97037328), 2-фууроил (cid 23795334), валлил (cid 123289902), сукцинил (cid 101786676), адамантан-1-карбонил (cid 45865302), нафталин-1-карбонил (cid 154859875) и др. (всего 39 соединений)). Аналогично в Pubchem найдено менее 15 структур *N*-карбоматных производных **1** (бензил карбоксилат (CID 60057405), этилкарбоксилат (CID 313578) и др.). Отметим, что CID 60057405 упоминается в патенте EP-1758873-A1 как ингибитор убиквитин лигазы – фермента протеосомного пути деградации белков.

Таким образом, цель данной работы – осуществить синтез новых *N*-холестерилкарбонатного и *N*-гексаноилированного производных **1** (рис. 1, соединения **2** и **3** соответственно) и первичную *in silico* оценку их взаимодействия с фосфолипидными мембранами и некоторыми белками, взаимодействующими с холестерином и производными жирных кислот.

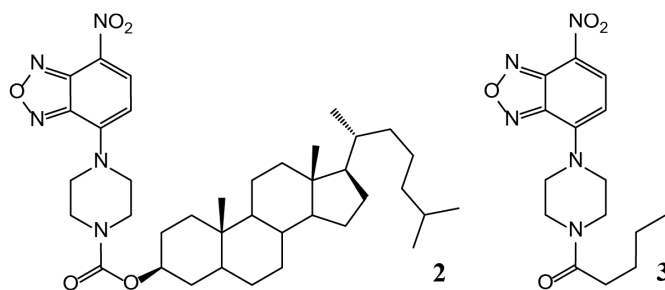


Рис. 1. Структурные формулы полученных соединений **2** и **3**

Fig. 1. Structural formulas 2 and 3

Материалы и оборудование. Реактивы и растворители имели квалификацию «ч.» и «ч. д. а.». Оценка индивидуальности синтезируемых веществ и наблюдение за ходом проводимых реакций осуществляли методом ТСХ на пластинках «Sorbfil». В качестве элюента использовали тетрагидрофуран и метанол в различных соотношениях. Выделение индивидуальных веществ осуществляли методом колоночной хроматографии на силикагеле (70–230 меш) производства фирмы Merck с использованием в качестве элюентов смесей тех же растворителей. ¹H ЯМР 5–10 %-ных растворов синтезированных соединений в дейтерохлороформе (CDCl₃) проводили на приборе Bruker Avance-500 (Германия) с рабочей частотой 500 МГц. Химические сдвиги измеряли по шкале δ сигнала остаточных протонов в CDCl₃ (δ = 7,26 м.д.).

Холест-5-ен-3-ил-4-(7-нитробензоксо[с][1,2,5]оксадиазол-4-ил)пиперазин-1-карбоксилат (2). Кратко: навеску **1** растворяли в диметилсульфоксиде, содержащем дополнительно пиридин. В полученный раствор при перемешивании добавляли по каплям раствор холестерил хлорформиата (Sigma) в тетрагидрофуране. Полученную смесь выдерживали 1 ч. Полноту превращения оценивали по ТСХ. Продукт очищали колоночной хроматографией, как описано выше. Выход составил 70 %. NBD-Pip-CCF: ESI-MS: *m/z* [M+H]⁺ теор. для C₃₈H₅₆N₃O₅: 662,43, найдено: 662,32; ТСХ (метанол): Rf(2) = 0,95, Rf(1) = 0,1; ¹H-ЯМР: δ = 8,51 ppm (d, J = 8,8 Hz), 7,3 (s), 5,44 (s), 4,6 (s), 3,54 (s), 2,48–2,34 (m). Получение соединений **1** и **3** описано в работе [4].

Расчеты и анализ результатов проведены с использованием программного пакета AutoDockTools 1.5.6 и программы Autodock Vina, как описано в [5]. Кратко: были использованы параметры тщательности (exhaustiveness) и числа моделей (number of models), равные 12 и 5 соответственно. Из интернет-ресурса Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>) для докинга отобраны некоторые структуры цитохромов P450 человека (коды PDB 3ld6, 3n9y, 2nnh, 6dwm, 3qm4, 3ual) и микобактерий (коды PDB 3iw0, 3r9c, 2uvn, 5li8, 3r9b). Цепь А структур белков была использована для расчетов. Для подготовки структур лигандов использовали программы ChemBioDraw и Avo-

gadro, MGL Tools для преобразования формата лигандов и анализа результатов. Эффективность связывания оценивали по автоматически рассчитываемому программой Autodock Vina параметру энергии взаимодействия (docking score, binding energy, E_{bind}).

Анализ проницаемости соединений через фосфолипидные мембраны *in silico* был проведен согласно методу [6].

Результаты и их обсуждение. Чтобы оценить биологические свойства **2** и **3** была проведена *in silico* оценка проникновения исследуемых веществ в клетку по механизму пассивной диффузии через липидный бислой при помощи сервиса PerMM (Permeability of Molecules across Membranes) [6]. Основные результаты данного теста приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Теоретически рассчитанные значения свободной энергии связывания и логарифмов коэффициентов проницаемости различных мембран для соединений 1–3

Table 1. Theoretically calculated values for free energy of binding with a membrane, Logs of permeability coefficients of different membranes for 1–3

Соединение	Свободная энергия связывания, ккал/моль	Log коэффициента проницаемости (плазматическая мембрана)	Log коэффициента проницаемости (ГЭБ)*	Log коэффициента проницаемости (Caco-2)*
1	-2,57	-1,99	-3,60	-3,99
2	-11,85	4,03	-1,47	-2,45
3	-4,73	-0,44	-3,05	-3,59

Примечание. * рН 7,35, $T = 37$ °C; значения $\text{Log } P > -4,35$ для ГЭБ указывают на способность вещества к пассивному транспорту через соответствующие мембраны; данные, относящиеся к мембране клеток колоректальной аденокарциномы человека (Caco-2) [6].

Логарифмы коэффициентов проницаемости для моделей трех различных мембран имеют значения, превышающее $-4,35$, следовательно, соединения **1–3** способны проникать через фосфолипидные мембраны [6]. Отметим, что для **1** закономерно показана худшая проницаемость по сравнению с **2** и **3**. Мы предполагаем, что данное соединение либо медленно проникает внутрь клетки и лизосом по механизму пассивной диффузии, либо транспортируется через мембраны альтернативными путями. Модели связывания **2** и **3** с мембраной показывают высокую полярность пиперазинового фрагмента и его локализацию в полярной части фосфатных остатков.

Компьютерное моделирование белок-лигандных взаимодействий (молекулярный докинг) является современным подходом для предварительной оценки эффективности и пространственных особенностей взаимодействия низкомолекулярных соединений с белками. При моделиро-

Т а б л и ц а 2. Значения E_{bind} и аминокислотное окружение **2** в смоделированных комплексах с цитохромами P450 человека

Table 2. E_{bind} values and amino acids surrounding for **2** in modeled complexes with human P450s

PDB код белка	Номер соединения	Описание белка	E_{bind} , ккал/моль	Аминокислотное окружение лиганда в комплексе (0,4 нм)
3ld6	2	CYP51	-14,4	HEM601 , Phe234, Tyr131, Ile377, Ile379, Tyr145, Thr135, Phe139, Gly307, Ala311, Ala144, Phe152, Leu159, Met304, Val143, Gln155, Met381, His236, Met487, Trp239, Leu240, Met100, Phe105, Val101
3n9y	2	CYP11A1	-12,0	Phe82, Gln377, Leu460, Ser352, Ile351, Ile461, Gln356, Val353, Thr354, Phe458, HEM601 , Ile84, Leu209, Val35, Asn210, Val57, Tyr61, Ser59, Thr291, Gly287, Leu101, Glu283, Ala286, Met201
2nnh	2	CYP3A5	-11,6	Ala370, Phe213, Phe304, Leu481, Ala305, HEM601 , Ser119, Arg105, Ile224, Tyr53, Arg106, Gln479, Leu216, Gly214, Phe215, Arg54, Thr478
6dwm	3	CYP1A1	-10,5	Phe224, Phe258, Gly316, Asp313, Ile115, Ser116, Asn255, Leu312, Ala317, Ser122, Phe123, Leu496, Thr321, Ile386, HEM601 , Val382
3qm4	3	CYP2D6	-10,6	Phe120, Ala305, HEM502 , Asp301, Phe483, Leu484, Thr309, Val370, Ser304, Gln244, Glu216, Leu213, Gly212, Phe247, Leu248, Ala300
3ual	3	CYP3A4	-10,1	Arg212, Ser119, Ala305, HEM508 , Thr309, Phe304, Arg105, Phe108, Phe215, Arg106

вании взаимодействия соединений **2** и **3** с цитохромами P450 выявлена его потенциально высокая аффинность к цитохромам P450 CYP11A1, CYP51 и CYP3A4 для **2**, а также CYP1A1, CYP3A4, CYP2D6 для **3**. Полученные данные приведены в табл. 2.

Выявлено, что **2** способен реализовывать аффинные взаимодействия со стероид-превращающими CYP51 (ланостерол 14 α -деметилаза) и CYP11A1 (холестерол гидроксилаза, 20,22-лиаза), что, возможно, связано со сходством строения **2** и природных субстратов этих монооксигеназ. Отметим, что рассчитанное положение **2** характеризовалось локализацией NBD-пиперазинового фрагмента вблизи гема, т.е. не согласовывалось с характером связывания природного субстрата холестерина, тогда как в случае CYP51 ближайшим к железу атомом **2** был C15, т.е. реализовывалась схожая с природным субстратом ориентация в активном центре. Для **3** выявлена возможность аффинных взаимодействий с некоторыми цитохромами P450 печени.

При моделировании взаимодействий с цитохромами P450 микобактерий также выявлены ряд аффинных взаимодействий **2** и **3**, данные о которых приведены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. Значения E_{bind} и аминокислотное окружение **2** и **3** в смоделированных комплексах с цитохромами P450 микобактерий

Table 3. E_{bind} values and amino acids surrounding for **2** and **3** in modeled complexes with mycobacterial P450s

PDB код белка	Номер соединения	Описание белка	E_{bind} , ккал/моль	Аминокислотное окружение лиганда в комплексе (0,4 нм)
3iw0	2	CYP125	-13,3	Val267, Val263, Met264, Val111, Pro213, Lys214, Ser217, Gln112, Met200, Val115, Asn118, Ile97, Leu117, Phe316, Trp414, Ala268, Lys101, Gly202, Phe100, Asn203, Glu204, Arg99, Gly413, Arg411
3r9c	2	CYP164	-12,4	HEM450 , Val306, Ser307, Tyr309, Leu184, Thr260, Ala256, Leu404, Ile255, Leu252, Arg90, Phe198
2uvn	2	CYP130	-12,0	Pro87, Leu293, Thr242, Gly243, His84, Thr86, Asp85, Pro88, Val393, Thr239, HEM1408 , Leu71, Phe236, Met240, Ile173, Ala176, Asn177, Val190
5li8	3	CYP126	-10,0	Asn96, Lys303, Arg304, Ser302, Ser300, Arg400, HEM501 , Leu250, Val94, Phe246, Leu95
3r9b	3	CYP164	-9,1	Ser96, Asn251, Ala95, Phe99, Leu180, Arg209, Gly205, Leu184, Ile255, Leu252, Leu98, Leu404, Ala256, Thr260, HEM501

Выявлено, что **2** способен аффинно связываться в активных центрах CYP125 (холестерол 26-гидроксилаза), CYP164 и CYP130 («орфанные» белки, т.е. без установленных субстратов). Отметим, что расположение **2** было аналогичным таковому для известного субстрата холестерина (боковой цепью к гему), однако расстояние от C26 и C27 атомов углерода в рассчитанном комплексе было более 0,4 нм (рис. 2, *a*).

Для **3** выявлена возможность аффинного связывания вблизи гема цитохромов P450 CYP164 (рис. 2, *a*) и CYP126 (орфанный белок). Важно отметить, что согласно нашим данным, для указанных цитохромов P450 микобактерий флуоресцирующие лиганды (субстраты или ингибиторы)

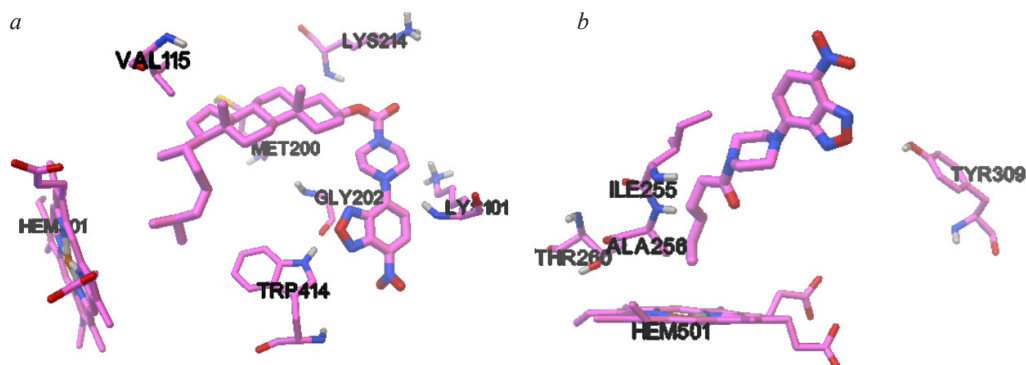


Рис. 2. Рассчитанные положения **2** в активном центре CYP125 (*a*) и **3** в активном центре CYP164 микобактерий (*b*)

Fig. 2. Calculated positions for **2** in the active center of CYP125 (*a*) and **3** in the active center of CYP164 of mycobacteria (*b*)

не установлены, а полученные *in silico* данные будут способствовать приоритизации исследований *in vitro* для целей установления функций этих белков.

Заключение. Синтезированы два новых флуоресцирующих производных NBD-пиперазина с липофильными остатками формилхолестерола и гексановой кислоты (соединения **2** и **3** соответственно). Расчетно-теоретическими методами показаны их возможность проникать через липидный бислой, а также аффинно связываться с некоторыми цитохромами P450 человека (**2** с ланостерол 14 α -деметилазой CYP51, **3** с лекарство-превращающими CYP1A1, CYP2D6, CYP3A4) и микобактерий (**2** с стерол-27 гидроксилазой CYP125, **3** с «орфанным» CYP164). Полученные расчетно-теоретические данные будут способствовать приоритизации исследований *in vitro* для целей исследования функций этих белков.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке задания ГПНИ № г.р. 20210560.

Acknowledgements. This work was supported by SPSR № 20210560.

Список использованных источников

1. Ishiguro, K. Novel application of 4-nitro-7-(1-piperazinyl)-2,1,3-benzoxadiazole to visualize lysosomes in live cells / K. Ishiguro, T. Ando, H. Goto // *Biotechniques*. – 2008. – Vol. 45. – P. 467–468. <https://doi.org/10.2144/000112912>
2. Fan, J. A Two-Photon Fluorescent Probe for Lysosomal Thiols in Live Cells and Tissues / J. Fan, Z. Han, Y. Kang, X. Peng // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 19562. <https://doi.org/10.1038/srep19562>
3. Piperazine-tuned NBD-based colorimetric and fluorescent turn-off probes for hydrogen sulfide / Z. Xu [et al.] // *Anal. Methods*. – 2018. – Vol. 10. – P. 3375–3379. <https://doi.org/10.1039/C8AY00797G>
4. Взаимодействие нитробензоксадиазольных производных пиперазина и анилина с бычьим сывороточным альбумином *in silico* и *in vitro* / Я. В. Фалетров [и др.] // *Журн. Бел. гос. ун-та. Химия*. – 2021. – № 2. – С. 25–35. <https://doi.org/10.33581/2520-257X-2021-2-25-35>
5. *In silico* моделирование взаимодействия конъюгатов изониазид-стероид с цитохромами P450 микобактерий и их превращение *in vitro* в клетках данных микроорганизмов / Я. В. Фалетров [и др.] // *Биомед. хим.* – 2020. – Т. 66, N 5. – С. 378–385. <https://doi.org/10.18097/PBMC20206605378>
6. Lomize, A. L. Anisotropic solvent model of the lipid bilayer. 2. Energetics of insertion of small molecules, peptides, and proteins in membranes / A. L. Lomize, I. D. Pogozheva, H. I. Mosberg // *J. Chem. Inf. Mod.* – 2011. – Vol. 51. – P. 930–946. <https://doi.org/10.1021/ci200020k>

References

1. Ishiguro K., Ando T., Goto H. Novel application of 4-nitro-7-(1-piperazinyl)-2,1,3-benzoxadiazole to visualize lysosomes in live cells. *Biotechniques*, 2008, vol. 45, pp. 467–468. <https://doi.org/10.2144/000112912>
2. Fan J., Han Z., Kang Y., Peng X. A Two-Photon Fluorescent Probe for Lysosomal Thiols in Live Cells and Tissues. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, pp. 19562. <https://doi.org/10.1038/srep19562>
3. Xu Z., Wu Z., Tan H., Yan J., Liu X., Li J., Xu Z., Dong C., Zhang L. Piperazine-tuned NBD-based colorimetric and fluorescent turn-off probes for hydrogen sulfide. *Analytical Methods*, 2018, vol. 10, pp. 3375–3379. <https://doi.org/10.1039/C8AY00797G>
4. Faletrov Y. V., Karpushenkova V. S., Zavalinich V. A., Yakovets P. S., Shkredava A. D., Shkumatov V. M. Interaction of nitrobenzoxadiazole derivatives of piperazine and aniline with bovine serum albumine *in silico* and *in vitro*. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Khimiya = Journal of the Belarusian State University. Chemistry*, 2021, no. 2, pp. 25–35 (in Russian). <https://doi.org/10.33581/2520-257X-2021-2-25-35>
5. Faletrov Y. V., Gilep K. A., Falchevskaya A. S., Horetski M. S., Panada J. V., Andrievskaya E. V., Rudaya E. V., Frolova N. S., Brzostek A., Plocinska R., Shkumatov V. M. *In silico* modeling of isoniazid-steroid conjugates interactions with cytochromes P450 of mycobacteria and their bioconversion *in vitro* by the cells. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 2020, vol. 66, no. 5, pp. 378–385 (in Russian). <https://doi.org/10.18097/PBMC20206605378>
6. Lomize A. L., Pogozheva I. D., Mosberg H. I. Anisotropic solvent model of the lipid bilayer. 2. Energetics of insertion of small molecules, peptides, and proteins in membranes. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2011, vol. 51, pp. 930–946. <https://doi.org/10.1021/ci200020k>

Информация об авторах

Фалетров Ярослав Вячеславович – канд. хим. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. НИИ физико-химических проблем БГУ (ул. Ленинградская, 14, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yaroslav82@tut.by

Яковец Полина Сергеевна – студентка 5-го курса хим. фак. Белорусский государственный университет. E-mail: che.yakovecps@bsu.by

Information about the authors

Faletrov Yaroslav V. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Leading Researcher. Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yaroslav82@tut.by

Yakovets Polina S. – 5-year student of the Faculty of Chemistry. Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: che.yakovecps@bsu.by

Позняк Глеб Игоревич – студент 4-го курса хим. фак. Белорусский государственный университет. E-mail: hlebpozniak@gmail.com

Фролова Нина Степановна – науч. сотрудник. НИИ физико-химических проблем БГУ (ул. Ленинградская, 14, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: frolova_n_2006@bk.ru

Шкуматов Владимир Макарович – член-корреспондент НАН Беларуси, д-р. биол. наук, профессор, зав. лаб. НИИ физико-химических проблем БГУ (ул. Ленинградская, 14, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vlad.shkumatov@tut.by

Pozniak Hleb I. – 4-year student of the Faculty of Chemistry. Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: hlebpozniak@gmail.com

Frolova Nina S. – Researcher. Research Institute for Physical-Chemical Problems of the Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: frolova_n_2006@bk.ru

Shkumatov Vladimir M. – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Research Institute for Physical-Chemical Problems of the Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vlad.shkumatov@tut.by