

**Міністерство освіти і науки України**  
**Ніжинський державний університет імені Миколи Гоголя**  
**Факультет природничо-географічних і точних наук**  
**Кафедра хімії та фармації**

Освітньо-професійна програма:

*Хімія, медична та фармацевтична хімія*

Спеціальність: *102 Хімія*

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

на здобуття освітнього ступеня магістр

**СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ *in silico* 3-АРИЛ-2-(6,7,8,9-  
ТЕТРАГІДРО-5Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[4,3-*a*]АЗЕПІН-3-ЇЛ)-  
АКРИЛОНІТРИЛІВ**

студентки **Кисорець Катерини Сергіївни**

Науковий керівник: **Циганков С. А.**

канд.хім.наук, доцент

Рецензенти: доцент кафедри хімії та фармації

Ніжинського державного університету імені Миколи

Гоголя канд.хім.наук **Москаленко О.В.;**

доцент кафедри хімії, технологій та фармації

Національного університету «Чернігівський колегіум»

імені Т.Г.Шевченка канд.фарм.наук **Янченко В.О.**

Допущено до захисту

Завідувач кафедри хімії та фармації

«14» грудня 2020 р. /В.В.Суховєєв/

Ніжин – 2020

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	3
РОЗДІЛ 1. ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗА ТА ЇЇ ІНГІБІТОРИ (огляд літератури)	
1.1. Структура глутатіон-S-трансферази.....	5
1.2. Функції GSTаз .....	8
1.3. Інгібітори GSTаз та їх фармакологічна значимість.....	10
1.3.1. Інгібітори GSTаз.....	12
1.4. Загальна характеристика азепінів.....	20
1.5. Біологічна активність похідних азепінів .....	23
1.6. Заключення. Постановка задачі.....	26
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ	
2.1. Матеріали .....	27
2.2. Хімічний аналіз .....	27
2.3. Молекулярний докінг .....	27
2.4. Молекулярна динаміка .....	29
РОЗДІЛ ІІІ. СИНТЕЗ ПОХІДНИХ 1,3,5-ТРИАЗИНІВ	
3.1. Синтез похідних 2-(4,6-диморфолін-4-їл-1,3,5-триазин-2-їл)-N- арилгідразинкарботіоамідів .....	31
РОЗДІЛ 3. <i>IN SILICO</i> ДОСЛІДЖЕННЯ ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ GSTази	
3.1. Закономірності зв'язування інгібіторів з GSTазою класу p1-1 .....	36
3.2. <i>In silico</i> оптимізація інгібітора глутатіон-S-трансферази .....	37
ВИСНОВКИ.....	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	43

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Глутатіон-S-трансферази – це група димерних ізоферментів, що проявляють ряд каталітичних активностей, включаючи зв'язування глутатіону з гідрофобними електрофільними сполуками та відновлення жирних кислот та окиснених форм ДНК [1, 2]. Крім того, GST кон'югує ряд гідрофобних сполук, таких як білірубін та гемоглобін. Субстратами глутатіон-S-трансферази є канцерогенні сполуки, ендогенні продукти окиснювального стресу, а також лікарські засоби [3]. Аналіз літературних джерел [4–7] дозволяє зробити висновок, що надлишкова експресія ізоферментів GSTази, можливо, є однією з причин стійкості клітин щодо лікарських препаратів. Рівень експресії та склад GSTаз у різних тканинах свідчить як про чутливість до хімічної сполуки, так і про відповідь на лікарський засіб. Наприклад, гіперекспресія GSTаз при онкології обумовлена неефективним підбором лікарських препаратів. Згідно [8], використання інгібіторів GSTаз дозволило підвищити ефективність при лікуванні онкозахворювань. Тому інгібітори глутатіон-S-трансферази можуть бути потенційними лікарськими субстанціями та мають перспективу як біологічно-активні сполуки [9].

**Мета роботи:** пошук перспективних інгібіторів та оцінка *in silico* похідних азепіну як моделі для спрямованого синтезу інгібіторів GSTази.

**Завдання роботи:**

- здійснити огляд наукової літератури щодо ферментативних систем, механізму їх каталітичної дії;
- синтезувати нові похідні азепіну та дослідити їх властивості;
- провести віртуальний скринінг хімічних сполук;
- проаналізувати одержані результати та відібрати хімічні сполуки, що відповідають відомим інгібіторам, для досліджень *in vitro*.

**Об'єкт дослідження:** потенційні інгібітори GSTази на основі похідних азепіну.

**Предмет дослідження:** 2-{5H,6H,7H,8H,9H-[1,2,4]триазоло[4,3-a]азепін-3-іл}-3-(3,4,5-тризаміщеніфеніл)проп-2-еннітрили як потенційні інгібітори ферментативних систем.

**Методи досліджень.** Для виконання поставлених завдань магістерської роботи застосовували порівняльні, комп'ютерні та статистичні методи досліджень.

**Практичне значення одержаних результатів:** Створено прогнозуючі класифікаційні QSAR моделі, які є ефективним інструментом для успішного пошуку та розробки нових інгібіторів глутатіон-S-трансферази з відповідним механізмом молекулярної.

**Особистий внесок дослідника.** Дослідником безпосередньо виконана експериментальна частина роботи. Ідея розробки належить науковому керівникові. Обговорення результатів дослідження, формування структури роботи, формулювання висновків проводились сумісно з керівником.

**Апробація результатів досліджень.** Результати кваліфікаційної роботи апробовані та опубліковані в Збірнику статей VII Міжнародної заочної науково-практичної конференції молодих учених "Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній хімії" (Ніжин, 2020 р.) та Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю "Хімічна наука та освіта в контексті сучасних інтеграційних процесів" (Київ, 2020 р.).

**Публікації.** За матеріалами магістерського дослідження опубліковано дві статті.

**Структура і обсяг магістерської роботи.** Робота викладена на 53 сторінках і включає вступ, три розділи, висновки, список використаних джерел.

# РОЗДІЛ 1. ФУНКЦІЇ ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗИ ТА ЇЇ ІНГІБІТОРИ (огляд літератури)

## 1.1. Структура GSTази

Глутатіон-S-трансфери (GST) – ферменти процесів детоксикації та перетворенні токсичних речовин живого організму, які характерні для всіх еукаріотів та деяких аеробних бактерій [10]. GST по-різному розподілена між тканинами живого організму та її активність ініціюється різними чинниками [11].

У "Номенклатурі ензимів" глутатіон-S-трансфери мали номери: 2.5.1.12; 2.5.1.13; і 4.4.1.7. На сьогодні використовується назва глутатіонтрансфераза [12]. Ізоензими GST з печінки щура позначаються літерами латинського алфавіту А, В, С і Е [13], а з печінки людини – літерами грецького алфавіту  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  і  $\epsilon$  [14]. Дослідження будови субодиниць ферменту дозволив змінити класифікатор ізоензимів, наприклад GST А [15] – це одночасно GST Yb1Yb1 [16], GST A2 [17] і GST 3-3 [18] тощо. На сьогодні назва ферменту визначається їх класом та будовою субодиниць [19], наприклад, GST + маркер класу ізоензиму: А –  $\alpha$ , К –  $\kappa$ , М –  $\mu$ , о –  $\omega$ , Р –  $\rho$ , S –  $\sigma$ , Т –  $\theta$ , Z –  $\zeta$ , тощо; далі – цифри, що визначають субодиниці. Відмінність ізоензимів визначають префіксом: b – bovine, gp – guinea pig, h – human, m – mouse, p – pig, r – rat, rb – rabbit [20] тощо.

Згідно сучасної класифікації ізоензимів [21] GST розділили на 3 класи:

$\alpha$  – основні ізоензими ( $pI > 8,0$ ):  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  і  $\epsilon$  людини, 1-1 і 2-2 щура та МІ миші;

$\mu$  – ізоензими, близькі до нейтральних ( $pI = 7,0-8,0$ ):  $\mu$  людини, 3-3 і 4-4 щура та МІІ миші;

$\pi$  – кислі ізоензими ( $pI < 7,0$ ):  $\pi$  людини, 7-7 щура і МІІІ миші (рис. 1.1).

Залежно від типу ізоензимів GST, які виявлено в різних організмах [22] (*Burkholderia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Rhodococcus*,

*Pseudomonas* та *Serratia*) розрізняють ізоформи β-класу [23]; комах – δ [24], дріжджів – υ [23], рослин – φ, τ [25] та λ [23].

```

-1224                                     AACAAAGAGATCAATATCTAGAATA
-1200 AATGGAGATCTGCAAAATCAACAGAAAGTAGGCAGCAAAGCCAAAGAAAATAGCCCTAAGGCACAGCCACTAAAAGGAACGTGATCATGCTCTTGCAGGGA
-1100 CATGGGTGGAGCTGGAAGCCGTTAGCCTCAGCAAACACACAGAAACAGAAAACAGCCAGACCCGATGGTCTCACTTATAAGTGGGAGCTGAACAATG
-1000 AGAACACATGGTCACATGGCGCGATCAACACACACTGGTGCCCTGTTGAGCGGGTGTGGGGAGGGAGAGTACCAGGAAGAAATAGCTAAGGGATACTGG
-900  GCTTAATACCTGGGTGATGGGATGATCTGTACAGCAAACCATATGCGGCACACACCTATGTAACAAACCTGCACATCTGCACATGTACCCCAAGAACTT
-800  CAAATAAAAGTTGGACGGCCAGGCGTGGTGGCTCAGCCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAAGCCGAGGCGTGCAGATCACCTAAGGTCAGGAGTTTCGAGA
-700  CCAGCCCGGCCAACATGGTGAACCCCGCTCTCTACTAAAAATACAAAATCAGCCAGATGTGCACGCACCTATAATTCACCTACTCTGGGAGGCTGAAG
-600  CAGAATTGCTGAACCCGAGAGCGGGAGGTTGCAGTGAGCCCGAGATCGCCCACTGCACCTCCAGCCTGGGCCACAGCGTGAGACTACGTCATAAAAT
-500  AAAATAAAATAACACAAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAGCAATTTCC
-400  TTTCCCTAAGCCGGCTCCACCCCTCTCCCTGCCCCTGTGAAGCGGGTGTGCAAGCTCCGGGATCGCAGCGCTTTAGGGAATTTCCCCCGCGATGTCC
-300  CGGCCGCCAGTTTCGCTGCGCACACTTCGCTGCGGTCTCTTCTGCTGTCTGTTTACTCCCTAGGCCCGCTGGGGACCTGGGAAAGAGGAAAGGCTT
-200  CCCCAGGCTGCGCGGCTCCAGGCGCCCTCTGCGGCCGACGCCCGGGTGCAGCGCCGCGCGGGCTGGGGCCGGCGGAGTCC
-100  CGGGACCCCTCCAGAAAGAGCGGGCCGGCCCTGACTCAGCACTGGGGGGAGCGGGGGGACCCACCTTATAAGGCTCGGAGGCCGCGAGGCTTCGCT

m
+1   GGAGTTTCGCGCCGAGCTTTCGCCACC A GTGAGTACGCGCGCCCGCTCCCGGGATGGGGCTCAGAGCTCCAGCATGGGGCCAAACCCGACGA
+99  TCAGGCCCGGGCTCCCGCAGGCTCCTCGCCACCTCGAGACCCGGGACGGGGCCCTAGGGGACCCAGGAGCTCCCAAGTCCCGCTTAGCGGCTTTCAGG
+199 GGGCCCGAGCGCTCGGGGAGGATGGGACCCCGGGCGGGGAGGGGGGAGGGTGCCTCACCAGCGCTTGGCATCTCCCGGGCTCCAGCAA
    et pro pro tyr thr val val tyr phe pro val arg g
+299 CTTTTTTTGTTCGCTGCAG TG CCG CCC TAC ACC GTG GTC TAT TTC CCA GTT CGA G GTAGGAGCATGTGCTGGCAGGGAAGGGAG
+385 GCAGGGGCTGGGGCTGCAGCCACAGCCCTCGCCACCCGGAGAGATCCGAACCCCTTATCCCTCCGTCGTGGGCTTTACCCCGGCTCCTTCCT
+485 GTTCCCGCTCTCCCGCCATGCTGCTCCCGCCAGTGTGTGTGAAATCTTCGGAGGAACCTGTTTACCTGTTCCCTCCCTGCACCTCGTACCCCT
    ly arg cys ala ala leu arg met leu
+585 CCCCAGGTTGCTGCGAGCGGAGTGGCCCGTCCACATCTCTACTTCTCCCTCCCGCAG GC CGC TGC GCG GCC CTG CGC ATG CTG
    leu ala asp gln gly gln ser trp lys glu glu val val thr val glu thr trp gln glu gly ser leu lys ala
+675 CTG GCA GAT CAG GGC CAG AGC TGG AAG GAG GAG GTG GTG ACC GTG GAG ACG TGG CAG GAG GGC TCA CTC AAA GCC
    ser cys
+750 TCC TGC GTAAAGTACCATGCCCGGGCAAGGGGAGGGGTGTGGCCCTTAGGGGGTGTGACTAGGATCGGGGACGCCAAAGCTCAGTCCCTCC
    leu tyr gly gln leu pro lys phe gln asp gly asp leu thr leu tyr gln ser asn thr
+848 TGAGCCATGCCCTCCCAACAG CTA TAC GGG CAG CTC CCC AAG TTC CAG GAC GGA GAC CTC ACC CTG TAC CAG TCC AAT ACC
    ile leu arg his leu gly arg thr leu g
+930 ATC CTG CGT CAC CTG GGC CGC ACC CTT G GTGAGTCTTGAACCTCCAAGTCCAGGGCAGGCATGGGCAAGCCCTGCCCCGGAGCCCT
+1018 TTTGTTTAAATCAGCTGCCCGCAGCCCTTGGAGTGGAGAACTGAGACCCACTGAGGTTACGTAGTTTGGCCAAAGTCAAGCTGGGTGCTGCAAT
+1118 CCTTGCCCTGTGCGAGGCTCCCGAGGTGTCCAGGTGCTGAGCACCTGCTGTGTGGCAGTCTCTCATCCTTCCACGCACATCCTTCCCTCCCT
+1218 CCCAGGCTGGGGCTCACAGACAGCCCTTGGTGGCCATCCCCAGTACTGTGTGTGATCAGGCGCCAGTACAGCGGCTGCTCCCTCCACCCAA
    ly leu tyr gly lys asp gln gln glu ala ala leu val asp met val asn asp gly val glu asp leu arg
+1317 CCCCAG GG CTC TAT GGG AAG GAC CAG CAG GAG GCA GCC CTG GTG GAC ATG GTG AAT GAC GGC GTG GAG GAC CTC CGC
    cys lys tyr ile ser leu ile tyr thr asn tyr
+1394 TGC AAA TAC ATC TCC CTC ATC TAC AAC TAT GTGAGCATCTGCACCAGGTTGGGCACTGGGGCTGAACAAAGAAAGGGGCTTC
+1481 TTGTGCCCTCACCCCTTACCCCTCAGGTGGCTTGGGCTGACCCCTCTTGGGTGAGGGTGCAGGGGCTGGTTCAGCTCTGGGCCAGGGGCCAGGGG
+1581 CTGGACAAAGACACAACCTGCACCCCTTATTGCGCTGGACATCAACAGCCAAGTAAACGGGTATGGGGCGAGTGAAGGACAGAGACCTCCAGCAACTG
+1681 GTGGTTTCTGATCTCCCTGGGGTGGCGAGGGCTTCTGGAGTAGCCAGAGGTGGAGGAGATTGTGCGCCAGTTCTGGATGGAGGTGCTGGCACTTTAG
+1781 CTGAGGAAAATATGACAGACAGAGCATTGGGGACCTGGGACCACTTACAGAGAGGCAGCGTGTGTGCGCGTGCCTGTGCGTGTGTGTGCGTGTG
+1881 TGTGTACCTTGCATTTGTGTCGGGTGGTAAGGAGATAGAGATGGGGCGGAGTAGGCCCAAGTCCCGAAGGCCCTGAACCCACTGGTTTGGAGTCTCC
+1981 TAAGGGCAATGGGGCCATTGAGAAGCTGAACAGGGCTGTGTCTGAATGTGAGGCTAGAAAGGATCCCTCAGAGAAGCCAGCTCAAAGCTTTTGAAT
+2081 CATCTGTTGAGAGAACCAGCAAGGATGGACAGGCAGAAATGGAATAGAGATGACTTGGCAGCTAAGTGGACAGGATTTGGTACTAGCCTGGTTGTGGGG
+2181 AGCAAGCAGAGGAGAACTGGGACTCTGGTGTCTGGCCTGGGCGAGCGGGGTCTCAGGGGCTGGGAGGATGAGAGTAGGATGATACATGGTGGTG
    glu ala gly lys asp asp tyr val lys ala leu pro gly gln leu lys pro phe glu thr leu leu ser
+2281 TCTGGCAG GAG GCG GGC AAG GAT GAC TAT GTG AAG GCA CTG CCC GGG CAA CTG AAG CCT TTT GAG ACC CTG CTG TCC
    gln asn gln gly gly lys thr phe ile val gly asp gln
+2358 CAG AAC CAG GGA GGC AAG ACC TTC ATT GTG GGA CAG GTGAGCATCTGGCCCATGCTGTTCTCTCTGCCACCCCTCTGCTTCC
+2445 AGATGGACACAGGTGTGAGCCATTTGTTTAGCAAAGCAGAGCAGACCTAGGGGATGGGCTTAGGCCCTCTGCCCAATTCCTCCAGCTGCTCCCGCTG
    ile ser phe ala asp tyr asn leu leu asp leu leu leu ile his glu val leu
+2545 GCTGAGTCCCTAGCCCCCTGCCCTGCAG ATC TCC TTC GCT GAC TAC AAC CTG CTG GAC TTG CTG CTG ATC CAT GAG GTC CTA
    ala pro gly cys leu asp ala phe pro leu leu ser ala tyr val gly arg leu ser ala arg pro lys leu lys
+2628 GCC CCT GGC TGC CTG GAT GCG TTC CCC CTG CTC TCA GCA TAT GTG GGG CGC CTC AGT GCC CGG CCC AAG CTC AAG
    ala phe leu ala ser pro glu tyr val asn leu pro ile asn gly lys gln stop
+2703 GCC TTC CTG GCC TCC CCT GAG TAC GTG AAC CTC CCC ATC AAT GGC AAC GGG AAA CAG TGA GGGTTGGGGGACTCTGA
+2781 CGGGAGGCGAGATTTGCCTTCTCTCCAGGACCAATTAATTTCTAAGAGAGCTACTATGAGCACTGTGTTTCTGGGACGGGGCTAGGGGTCTC
+2881 AGCCTCAGGTGCGTGGGAGGGCAGAGCAGAGGACTAGAAAACAGTCTCCAGCACAGTCAAGTGGCTTCTGGAGCCCTCAGCTGGCTGTGTTACTG
+2981 AACSTCAAAACTAGAAGAGGAAGAAAAAAGAGAGAGAGAAAACAAGAGAAATA

```

Рис. 1.1. Повна нуклеотидна послідовність геномного гена GST-л.

Каталітична дія GSTази сприяє нуклеофільному приєднанню тіолу GSH до електрофільного центру ксенобіотика [26]. Як результат – утворення

глутатіонового кон'югату, який має меншу токсичність та високу водорозчинність, що сприяє його виведенню з клітини [27].

Функціонально-активна GSTаза – гомодимерна молекула, що містить дві субодиниці (рис. 1.2).

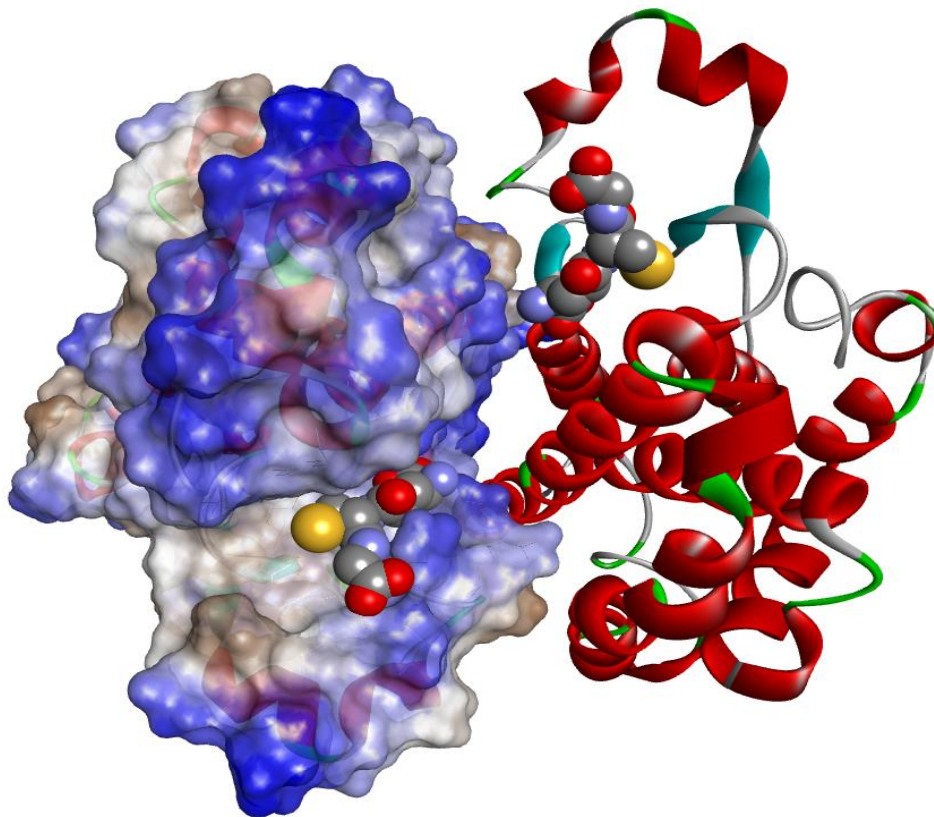


Рис 1.2. Структура GSTази: справа – субодиниця з молекулярною поверхнею.

Кожна субодиниця містить білкову глобулу, що яка складається із 209 амінокислотних залишків, та кофактору каталітичної системи – GSH. *N*-кінцева частина, білкової глобули, являє собою тіоредоксинподібну структуру та включає спіральну (три  $\alpha$ -спіралі) та складчасту (чотири  $\beta$ -листів) структури [28]. *C*-кінцевий частина складається із п'яти  $\alpha$ -спіралей, з яких, дві – антипаралельні. На поверхні глобули виділено каталітичний центр ферменту – центри зв'язування глутатіону або G-центр та субстрату або H-центр.

У підтриманні структури гомодимеру провідну роль мають водневі зв'язки, Ван-дер-Ваальсові взаємодії [29] та взаємодія за типом "ключ–замок". Така взаємодія реалізується шляхом пронизування залишку ароматичної амінокислоти Tyr50 (ключ)  $\alpha_2$  спіралі *N*-кінцевої структури

однієї субодиниці в гідрофобну западину (замок), яка утворена спіралями  $\alpha_4$  та  $\alpha_5$  C-кінцевої структури другої субодиниці [30, 31]. Дана взаємодія активує каталітичні функції ферменту, оскільки фіксує та стабілізує рух глутатіону в каталітичному центрі [32].

Основні відмінності між класами GST характеризуються місцем зв'язування GSH та місцем фіксації субстрату [33]. Амінокислотний склад H-центру варіює серед різних GSTаз, що обумовлено їх субстратною специфічністю. Подібність структур між класами GSTаз реалізується через G-центр [34], який, в основному, побудовано із полярних амінокислот, основною для зв'язування глутатіону є Tyr7. Зв'язуючись G-центром, глутатіон активується шляхом стабілізації тіолят-аніоній конформації та набуває енергетично вигідної орієнтації для нуклеофільної атаки щодо субстрату [35]. Будова активного центру залежить від класу GSTази, наприклад для GST $\pi$  відсутні структури, що прикривають G-центр, тому він більш доступний для зв'язування субстрату. При цьому H-центр – напівгідрофобний та містить молекули води. Наприклад, GST P1-1  $\pi$  класу містить амінокислотні залишки Cys15, Cys48, Cys102 та Cys170. Модифікація Cys48 сприяє каталітичній активності GST P1-1. Це зумовлено його реакційною здатністю щодо електрофільних сполук. За відсутності зв'язаної GSH у G-центрі, Cys48 або взаємодіє з розчинником, або окиснюється з утворенням дисульфідного зв'язу з Cys102. Його висока реакційна здатність зумовлена утворенням іонної пари тіолату Cys48 та протонованої  $\epsilon$ -аміногрупи Lys55 [36].

## 1.2. Функції GSTаз

GSTази – багатофункціональні ферменти, які впливають на процеси:

1. детоксикації ксенобіотиків, ендогенних токсичних речовин та пероксидів;
2. зв'язування та транспортування гідрофобних сполук;
3. аккумуляції нітроген (II) оксиду;



4. модуляції внутрішньоклітинної передачі сигналів, які реалізуються шляхом кон'югації ферменту з кіназами та білками сигнальних шляхів;
5. каталізу ізомеризації ретиноевої кислоти із *цис*- у *транс*-форми.

Перші дві функції характерні для всіх GSTаз, а три останні – лише для GSTπ [4].

GSTази дезактивує токсини шляхом їх інактивації: фізичної – зв'язування молекул токсичних речовин активним центром ферменту, що тимчасово знижує їх концентрацію у клітині; та хімічною – подальшим знешкодженням та деградацією шляхом приєднання до молекули GST [37]. Основна функція GSTаз – це хімічна дезактивація ксенобіотиків шляхом нуклеофільної атаки GSH електрофільного атому Карбону, Сульфуру або Нітрогену, що перешкоджає їх взаємодію із білками та НК організму. Зв'язування знижує токсичність ксенобіотиків та підвищує їх розчинність [4, 38].

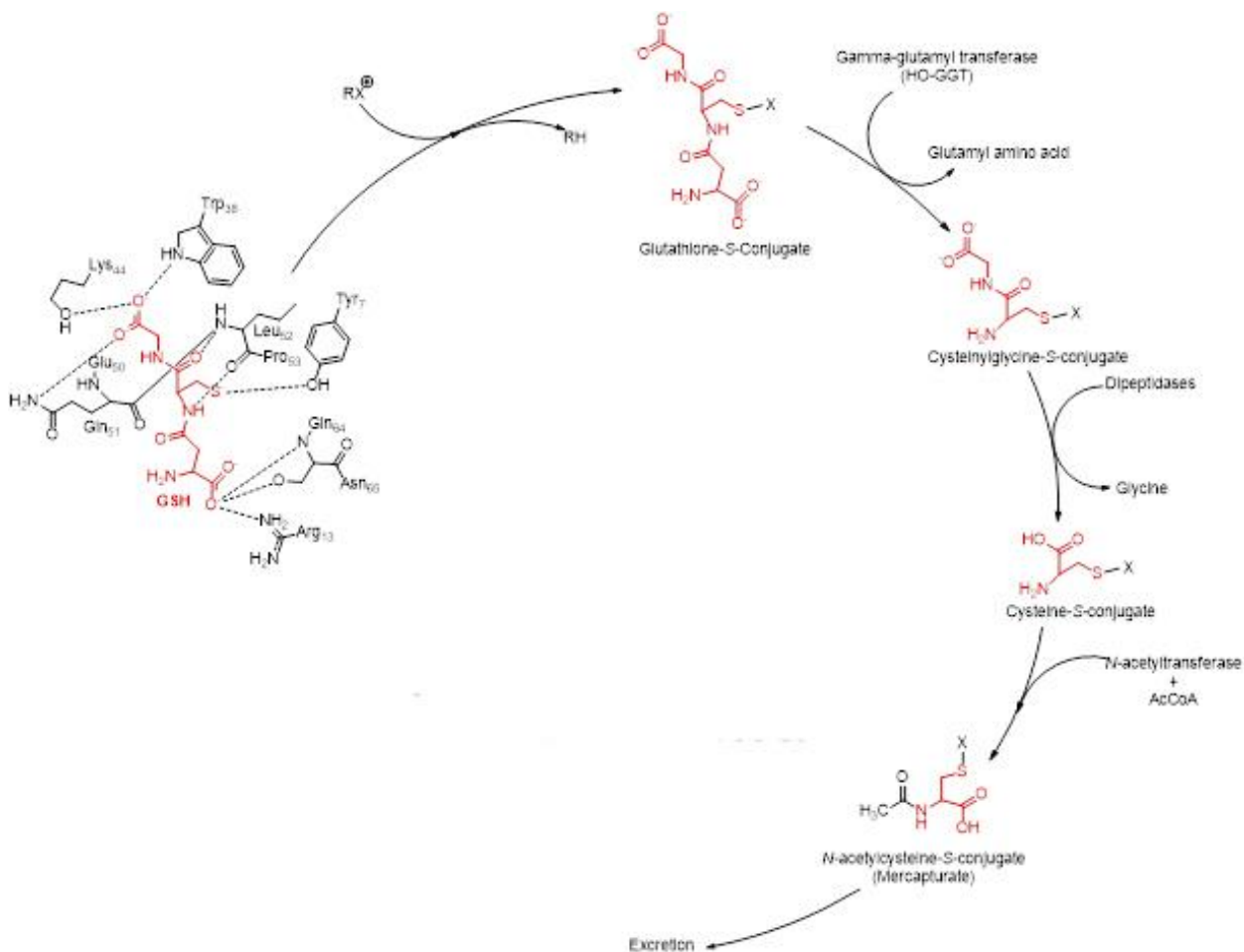


Рис. 1.3. Меркаптуровий шлях детоксикації ксенобіотиків.

Детоксикаційна функція GSTаз реалізується шляхом формування меркаптуратів (меркаптуровий цикл) (рис. 1.3). Молекула GSH, яка одночасно виконує роль кофактору та субстрату, GSTази побудована трьома амінокислотними залишками – глутаматом, цистеїном, гліцином. Функціональним центром є фрагмент цистеїну, що містить реакційно здатну тіольну групу.

Перша стадія меркаптурового шляху – нуклеофільна атака глутатіону ксенобіотика, з утворенням глутатіон-*S*-кон'югату, який метаболітично перетворюється (рис.1.2.).

$\gamma$ -Глутаміл трансфераза ( $\gamma$ -GT) відщеплює фрагмент глутаміну від глутатіон-*S*-кон'югату з утворенням цистеїнілгліцин-*S*-кон'югату. Даний кон'югат взаємодіє з дипептидазою, що каталізує реакцію відщеплення гліцину від цистеїнілгліцин-*S*-кон'югату, та утворює цистеїн-*S*-кон'югат. Амінокислоти глутаміл та гліцин, на відміну від цистеїн-*S*-кон'югату, використовуються для внутрішньоклітинного ресинтезу GSH. Цистеїн-*S*-кон'югат ацелюється по аміногрупі до меркаптурової кислоти (*N*-ацетилцистеїн-*S*-кон'югату) та виводиться з організму сечею [39].

Крім дезактивації ксенобіотиків, GSTази здатні:

- до транспорту гідрофобних молекул (ароматичних вуглеводнів, порфіринів, стероїдів тощо) [10];
- до внутрішньоклітинної аккумуляції нітроген оксиду шляхом його зв'язування та стабілізації нітрозильованого глутатіону або утворенням комплексів динітрозил-диглутатіонілу феруму [40].

### **1.3. Інгібітори GSTаз та їх фармакологічна значимість**

Вивчення інгібіторів ферментів – досить важливий напрямок сучасних біохімічних досліджень, який має фундаментальне значення для медицини, токсикології, фармакології, сільського господарства тощо. Дослідження дії токсинів *in vitro* та *in silico* є актуальним завданням для розробки антидотів.

Наприклад, нервово-паралітичні гази (зоман, VX, зарин тощо) по суті є інгібітори ферментів [41].

Інгібітори (стабілізатори) – це каталізатори, що гальмують проходження хімічних та фізичних процесів, дія яких зумовлена блокуванням активних центрів ферментів. Інгібітори дозволяють отримати інформацію щодо механізму дії ферментів, природу їх функціональних груп тощо [42].

Всі інгібітори ферментів поділяють на природні та штучні. Природні – продукуються живими організмами, штучні – синтезовані хімічні сполуки, які в природі не зустрічаються. Такі сполуки знайшли широке застосування в сільському господарстві (наприклад, пестициди) та медицині.

Інгібування – характерна риса каталітичних реакцій, що відбуваються за участю активних центрів. Наприклад, для ферментативних реакції, у яких стало число активних центрів, наявність інгібітора зумовлює зниження швидкості реакції [43].

За характером дії інгібітори ферментативних систем поділяють на:

- необоротні інгібітори, які хімічно модифікують критичні для функціонування ферменту центри та уповільнюють його активність до нуля. Наприклад, діазопропілфторофосфат деактивує ряд гідролаз (ацетилхолінестеразу, трипсин та хімотрипсин) шляхом модифікації залишку серину. Вивільнення інгібітора не відновлює каталітичної активності ферменту [32].

- оборотні інгібітори не утворюють ковалентний зв'язок при взаємодії з ферментом, утворюючи при цьому динамічні комплекси, які різняться каталітичною активністю відносно вільного фермента.

Шляхом видалення інгібітора активність ферменту відновлюється.

Серед оборотних інгібіторів виділяють:

- конкурентні – схожі за будовою із субстратом, відповідно конкурують з ним за зв'язування в активному центрі ферменту, утворюючи неактивний комплекс;

- неконкурентні – не мають схожості із субстратом, може оборотно зв'язуватись як з ферментом, так із комплексом фермент-субстрат не конкуруючи із субстратом;
- змішані – складається із конкурентного та неконкурентного механізмів інгібування;
- безконкурентні – реалізується при взаємодії інгібітору із ферментом лише в складі комплексу фермент-субстрат, блокуючи ферментативну реакцію [44].

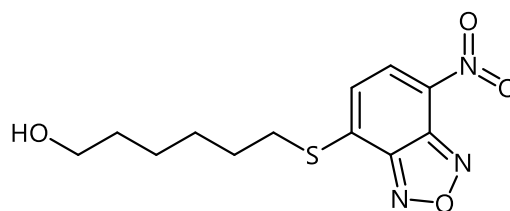
Тому, пошук інгібіторів GSTаз є актуальним завданням, оскільки вони стійкі до дії хімічних сполук, завдяки своїй функції – детоксикації. Експериментальні дані свідчать, що саме надлишкова експресія ізоферментів GSTаз є однією з причин стійкості клітин щодо лікарських засобів [45]. Крім того, GST використовують для розробки рекомбінантних вакцин (наприклад, отримано вакцину щодо цистицеркозу) [46]. Тому, інгібітори GST можуть бути молекулярними інструментами, що дозволяють забезпечити ефективну дію лікарських препаратів при різних захворюваннях [47].

### 1.3.1. Інгібітори GSTаз

За місцем зв'язування, всі відомі інгібітори GSTаз можна розділити на групи за місцем зв'язування: на Н-центрі та на G-центрі (аналоги глутатіону); зв'язування на Н- та G-центрах.

*Інгібітори, що кон'югують з Н-центром ферменту:*

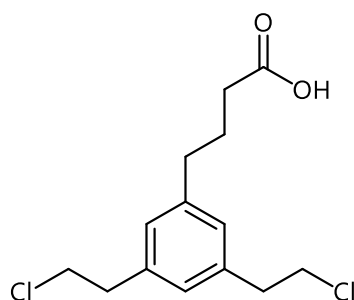
**6-[(7-нітро-2,1,3-бензоксадіазол-4-іл)сульфаніл]гексан-1-ол**



**(1.1).**

При утворенні комплексу молекула глутатіону займає G-центр, а інгібітор – H-центр, який утворює  $\pi$ - $\pi$  стекінг із залишком Tyr108 (у комплексі з GSTP1-1) або із залишком Tyr113 (у комплексі з GSTM2-2). Крім того у фермент-інгібіторному комплексі між інгібітором та залишком Gln39 та  $\sigma$ - $\pi$  зв'язок із залишком Phe8 утворюється водневий зв'язок [4].

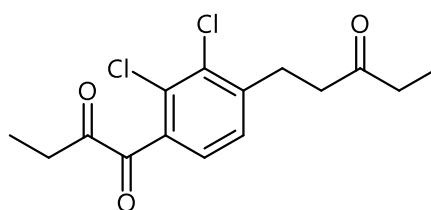
#### 4-[3,5-біс(2-Хлоретил)феніл]бутанова кислота



(1.2).

Ароматичний залишок **1.2**, що знаходиться між залишками Phe8 і Tyr108, утворює  $\pi$ - $\pi$  стекінг із залишком Phe8 на відстані 4,47 Å. Карбоксильна група **1.2** утворює водневі зв'язки із Tyr7 та Arg13, тоді як один з галогеналкільних фрагментів зв'язується із Cys47, а інший – із Cys101 [48].

#### 1-[2,3-Дихлор-4-(3-оксопентил)феніл]бутан-1,2-діон



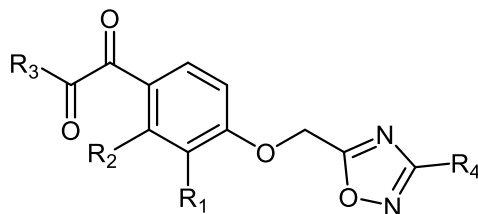
(1.3)

є потенційним протипухлинним засобом.

Фіксація в області H-центру ферменту забезпечується  $\pi$ - $\pi$  стекінгом ліганду із залишком Tyr108 на відстані 4,96 Å; атом Оксигену реалізує водневий зв'язок із залишком Arg13 [49].

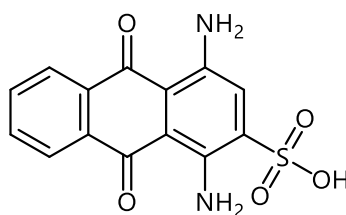
Аналоги, що містять оксадіазол **1.4-1.18**, більш ефективні інгібіторами GST; **1.12-1.15** ( $R^2 = \text{Cl}$ ) інгібують фермент краще, ніж **1.7-1.11** ( $R^2 = \text{CH}_3$ ) або **1.17** та **1.18** ( $R^2 = \text{Br}$ ). Додатковий атом хлору (у положенні  $R^1$ ) **1.16** знижує

інгібуючу активність **1.3**. На інгібуючу активність має вплив природа замісника R<sup>4</sup>. Наприклад, інгібітори **1.9-1.11**, із електронакцепторними або електрондонорними замісниками R<sup>4</sup>, менш ефективні, ніж **1.7**, що містить незаміщений фенільний залишок [50].



Сполука	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
<b>1.3</b>	Cl	Cl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-
<b>1.4</b>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	феніл
<b>1.5</b>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	4-гідроксифеніл
<b>1.6</b>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	4-нітрофеніл
<b>1.7</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	феніл
<b>1.8</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	4-гідроксифеніл
<b>1.9</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	4-фторфеніл
<b>1.10</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	4-хлорбензен
<b>1.11</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	4-нітрофеніл
<b>1.12</b>	H	Cl	CH <sub>3</sub>	метил
<b>1.13</b>	H	Cl	CH <sub>3</sub>	феніл
<b>1.14</b>	H	Cl	CH <sub>3</sub>	4-фторфеніл
<b>1.15</b>	H	Cl	CH <sub>3</sub>	4-трифторметилфеніл
<b>1.16</b>	Cl	Cl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	феніл
<b>1.17</b>	H	Br	CH <sub>3</sub>	4-фторфеніл
<b>1.18</b>	H	Br	CH <sub>3</sub>	4-трифторметилфеніл

### 1,4-Діаміно-9,10-діоксо-9,10-дигідроантрацен-2-сульфонова кислота

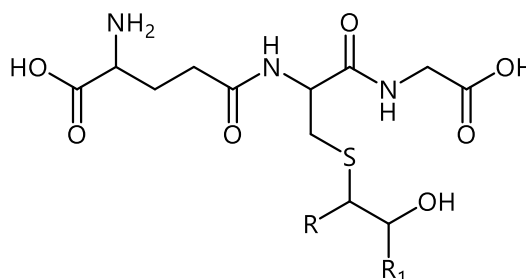


### 1.19.

Приєднання інгібітора **1.19** відбувається на Н-центрі ( $K_i = 13.5\text{мМ}$ ). Ван-дер-Ваальсові взаємодії утворюються між парними кільцями комплексу та із Phe8, Tyr108, Gly205, Val10. Ароматичне кільце з карбонільними групами утворює водневі зв'язки із Tyr7 та Arg13 [51].

*Інгібітори, що кон'югують із G-центром ферменту*

Сполуки **1.20-1.23** виявляють інгібуючу активність щодо GST ( $IC_{50} = 5.5\text{--}280\text{мМ}$ ), а їх глутатіонова частина займає суперпозицію глутатіонового субстрату у фермент-інгібіторних комплексах.



1.20: R = H, R<sub>1</sub> = H; 1.21: R = Ph, R<sub>1</sub> = H; 1.22: R = H, R<sub>1</sub> = Ph; 1.23: R = Ph, R<sub>1</sub> = O

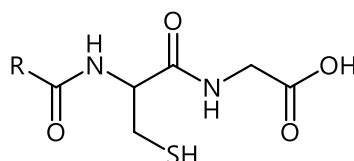
Етаноловий хвіст **1.20**, в активному центрі, взаємодіє водневим зв'язком із залишком Arg13. Фіксація **1.21-1.23** відбувається шляхом  $\pi$ - $\pi$  стекингу із залишком Tyr108. Проте, **1.22** виявляє кращу інгібуючу активність, ймовірно, через малу відстань між ароматичною системою та залишком Tyr108. Карбоксильна група **1.23** реалізує водневі зв'язки із Arg13 [52].

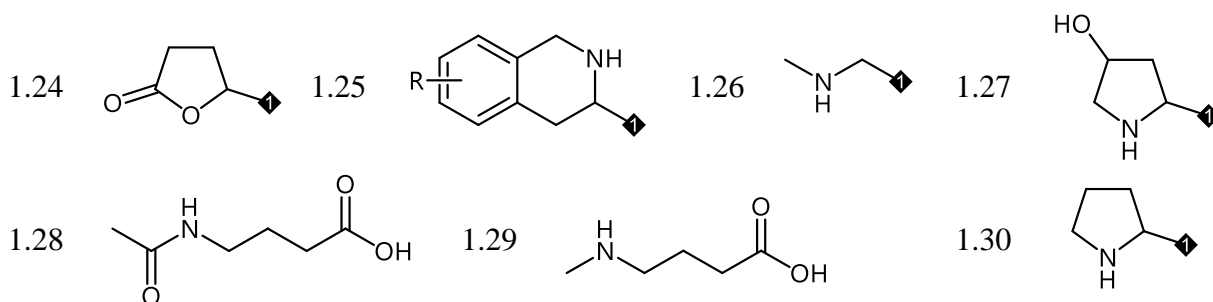
Ряд аналогів GSH **1.24-1.48** запропоновано як перспективні інгібітори GSTаз [53]. Згідно стурктур їх було поділено на:

- сполуки **1.24-1.30**, в яких модифікована амінокислота Glu ( $K_i = 1.25\text{--}3.22\text{мМ}$ );
- сполуки **1.31-1.35**, в яких модифікована амінокислота Cys;
- сполуки **1.36-1.40**, в яких модифікована амінокислота Gly ( $K_i = 0.014\text{--}1.48\text{мМ}$ );
- сполуки **1.41-1.48**, в яких модифікуються значна кількість амінокислот.

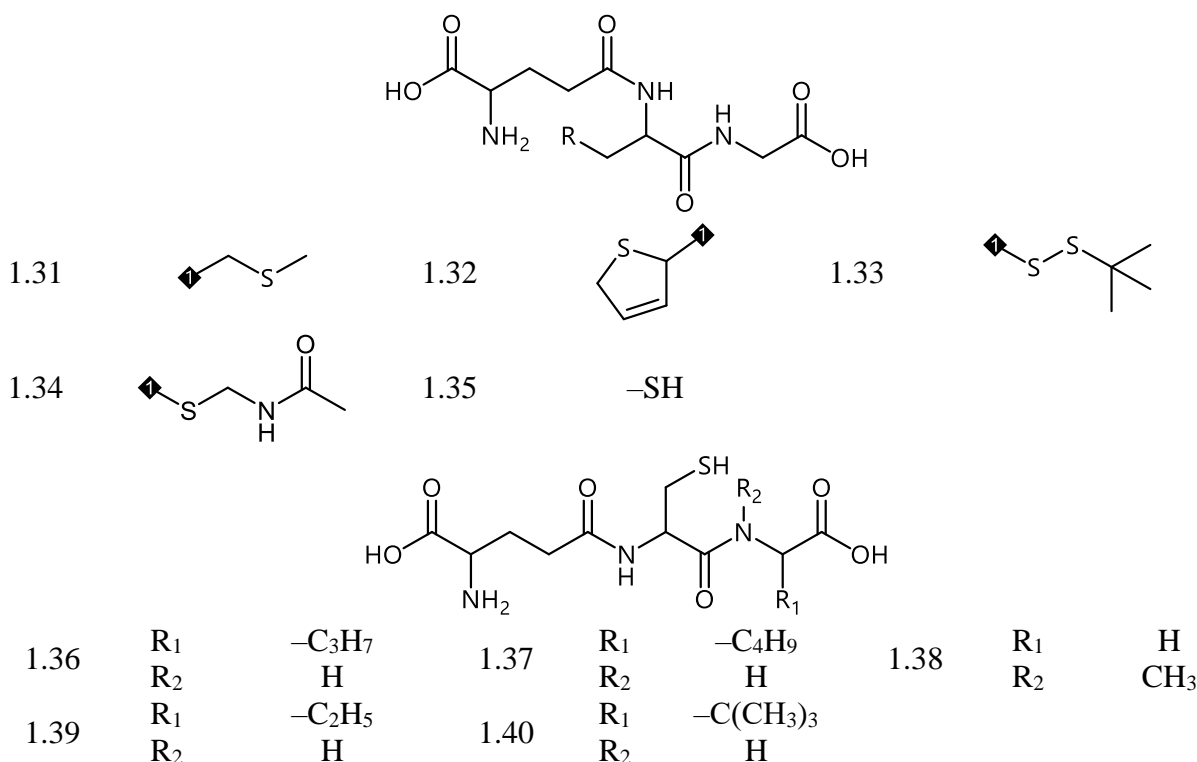
Важливими для зв'язування є області X, Y і Z:

1. Область X, яка оточена Gly12, Arg13, Arg100, Ile104, Tyr108, Ile203 та Asn204. Тому ці амінокислоти відіграють провідну роль при фіксації інгібіторів **1.24-1.30**.

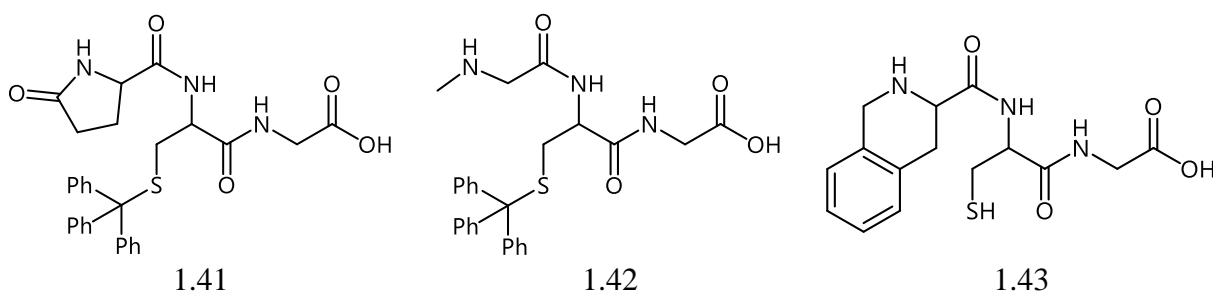




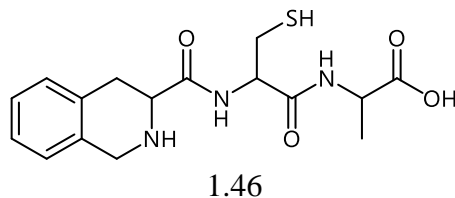
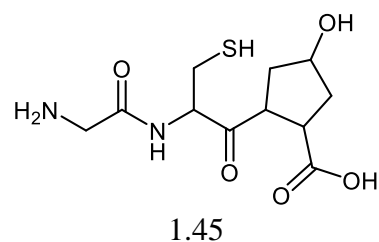
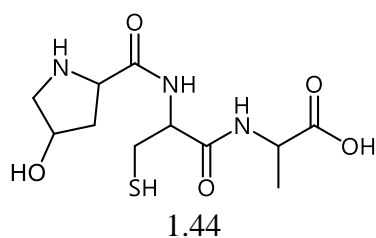
2. Область Y це місце, де глутамат взаємодіє із Arg13, Gln51, Leu52, Pro53, Gln64, Ser65, Asn66 та Glu97. Для сполук **1.31-1.35** та **1.36-1.40** важливими є ці амінокислоти, оскільки саме з ними при зв'язуванні реалізуються водневі, електростатичні та Ван-дер-Ваальсові взаємодії.



3. Область Z оточена Phe8, Arg13, Trp38, Lys44, Gly50, Gln51 та Leu52 та характерна для зв'язування **1.41-1.46**. Основною їх особливістю є наявність  $\pi$ - $\pi$  стекингу взаємодії із залишками Phe8 та  $\pi$ - $\sigma$  взаємодії із залишками Arg13 [52, 53].

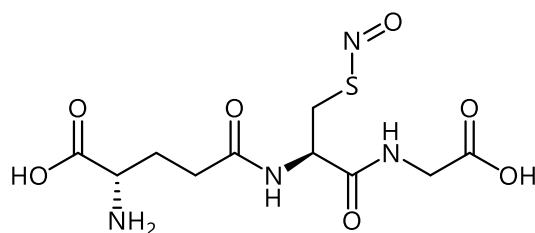






*Інгібітори, що кон'югують із Н- та G-центрами ферменту:*

**(2S)-2-аміно-4-{[(1R)-1-[(карбоксиметил)карбамоіл]-2-(нітросульфаніл)етил]карбамоіл}бутанова кислота або S-нітрозоглутатіон є інгібітором щодо GSTаз (IC<sub>50</sub> = 25.5мМ).**

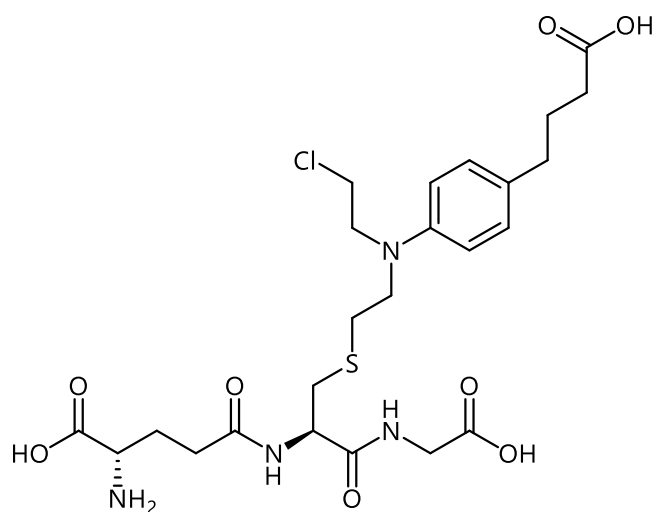


**(1.47).**

Нітрозогрупа **1.47** зв'язується із Н-центром. Можливо три варіанта зв'язування: перший – фрагмент NO стабілізується молекулою H<sub>2</sub>O, через яку опосередковано взаємодіє із залишками Arg13 і Tyr108; другий – NO стабілізується шляхом взаємодії із залишками Arg13 (взаємодія із бічним ланцюгом) і Tyr7; третій – фрагмент NO стабілізується шляхом взаємодії із залишками Arg13 (головний ланцюг) і Tyr7. Підтвердження саме такої ролі GSNO як конкурентного інгібітора GSTаз опубліковано в [54].

Фізіологічна роль і функції GSTаз добре вивчені, але участь у механізмах зберігання нітроген(II) оксиду досі викликають питання. У ЦНС NO виконує роль медіатора і, можливо, впливає на розвиток різних захворювань. Як відомо, NO транспортується із низькомолекулярними сполуками, що містять тиольні групи. Тому S-нітрозоглутатіон (GSNO) здатен до зберігання NO в клітині та може приймати участь у реакціях транснаїтрозилювання [55].

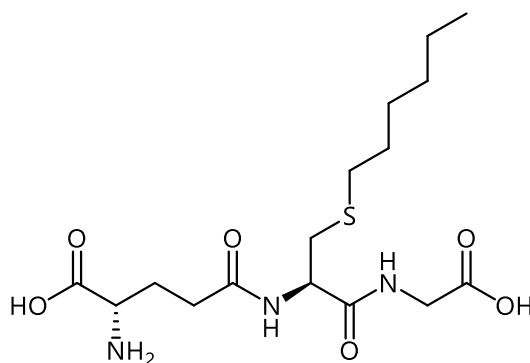
**(2S)-2-Аміно-4-[[[(1R)-1-[(карбоксиметил)карбамоїл]-2-[(2-[[4-(3-карбоксипропіл)феніл](2-хлоретил)аміно}етил)сульфаніл]етил]карбамоїл}бутанова кислота або хлорамбуцил глутатіон кон'югат**



**(1.48).**

Зв'язується із Н- та G-центрами ферменту ( $IC_{50} = 19.6\text{мМ}$ ). GSH фрагмент, що зв'язується із G-центром, утворює зв'язки із Trp38, Gln51, Asp98, Gln64, Ser65, Leu52 і Ser65 (бічного ланцюга) та Ван-дер-Ваальсові взаємодії із залишком Arg13. Ароматичне кільце **1.48** утворює  $\pi$ - $\pi$  стекінг із залишком Phe8 на відстані 4,17 Å. Карбоксильна група **1.48**, шляхом Ван-дер-Ваальсових взаємодій, утворює зв'язок із залишком Val35 та водно-опосередковано взаємодіє із залишками Asn204 та Gly207. Тіольна група кон'югату направлена до залишку Tyr7 [55].

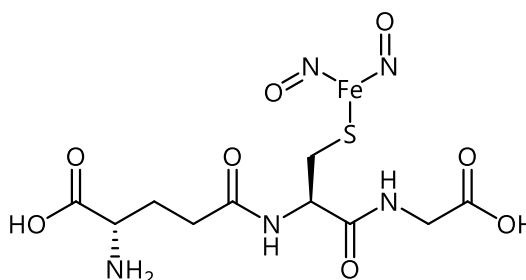
**(2S)-2-Аміно-4-[[[(1R)-1-[(карбоксиметил)уврбамоїл]-2-(гексисульфо-ніл)етил]карбамоїл}бутанова кислота або S-гексилглутатіон** Зв'язується із Н- та G-центрами ферменту ( $K_i = 4.75\text{мМ}$ ).



**(1.49).**

Гексиловий хвіст, зв'язується із залишком Arg13 на Н-центрі, а глутатіонова частина інгібітора займає суперпозицію субстрату. При цьому Trp234 зв'язується з С-кінцевою карбоксильною групою, позиціонуючи глутатіонову частину в активний центр. Карбоксильна група GSH додатково взаємодіє із залишками His40 та Lys53. [56, 57].

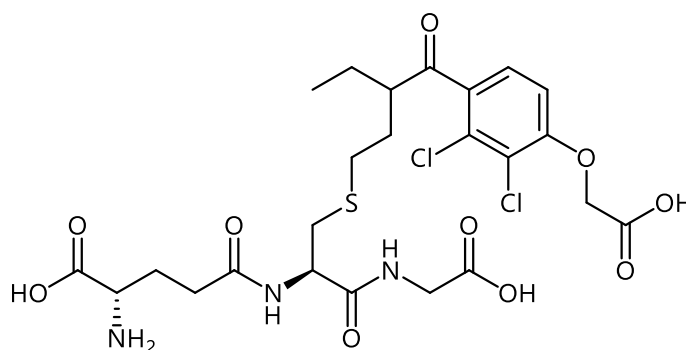
**(2S)-2-Аміно-4-[[[(1R)-1-[(карбоксиметил)карбамоіл]-2-[(динітрозоферро)сульфаніл]етил]карбамоіл}бутанова кислота або комплекс динітрозил-диглутатіоніл феруму**



**(1.50).**

Після приєднання **1.50** в активний центр атом Феруму набуває спотвореної тетраедричної форми, взаємодіючи із залишком Trp7, GSH і двома нітрито-групами. Залишок Trp7 ковалентно зв'язується із лігандом, а залишки Trp108 і Asn204 –водно-опосередковано із Оксигеном нітрито-групи [58].

**(2S)-2-Аміно-4-[[[(1R)-2-({4-[4-(карбоксиметокси)-2,3-дихлорфеніл]-3-етил-4-оксобутил}сульфаніл)-1-[(карбоксиметил)карбамоіл]етил]карба-моіл} бутанова кислота або кон'югат глутатіон-етакринової кислоти (EA-GSH)**

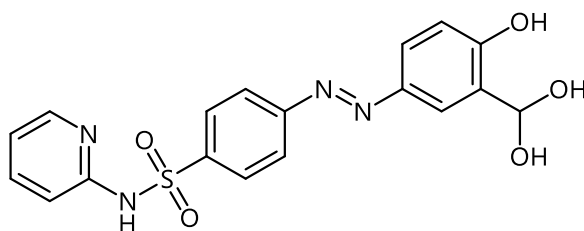


**(1.51).**

Приєднується до Н-центру ( $IC_{50} = 21.1\text{mM}$ ) з незначними змінами в позиціях залишків щодо Н-центру: Val35 і Gln36 (входять до  $\alpha$ -спіралі). Також

зміщенню піддається залишок Phe8, фенільне кільце якого обертається на 128° щодо ліганду. Такі зміни призводять до розширення ділянки приєднання інгібітора. Ароматичне кільце, приєднане до Н-центру, утворює  $\pi$ - $\pi$  взаємодію із залишком Phe8 на відстані 4,6 Å [59]. Крім того, на Н-центрі утворюються додаткові взаємодії EA-GSH із ферментом через залишки Ile104 та Val10 [52].

**4-[(1E)-2-[3-(дигідроксиметил)-4-гідроксифеніл]діазен-1-іл]-N-(піридин-2-іл)бензен-1-сульфонамід або сульфазалазин (1.52)**

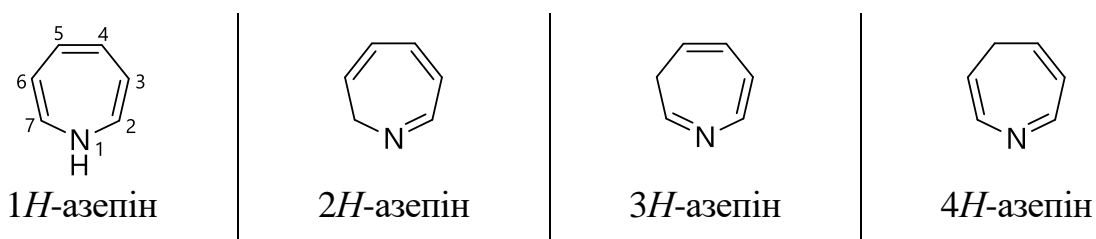


(1.52).

Приєднується до Н- та G-центрів ферменту ( $K_i = 24\text{мМ}$ ). Бензиловий фрагмент опосередковано утворює  $\pi$ - $\pi$  стекінг із залишком Phe8 та  $\pi$ - $\sigma$  зв'язок із залишком Gly205. Атоми Оксигену у інгібіторному комплексі утворюють водневі зв'язки із залишками Val35, Tyr7 та Arg13 [40].

#### 1.4. Загальна характеристика азепінів

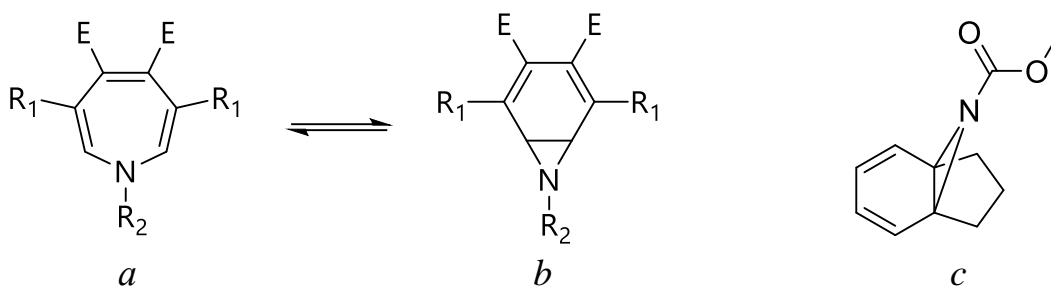
Азепін – семичленний гетероцикл, що містить одним атомом Нітрогену. Залежно від його положення щодо подвійного зв'язку, азепін існує у вигляді наступних ізомерів [60, 61]:



Будова ізомерів азепіну підтверджується даними УФ-,  $^1\text{H}$ -ЯМР-,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопії [62, 63]. Вільні 1H-азепіни зустрічаються не часто, але електронакцепторні замісники у положенні C1 підвищує їх стійкість. Стійкість ізомерів азепіну зменшується у наступному ряді [63, 64]:

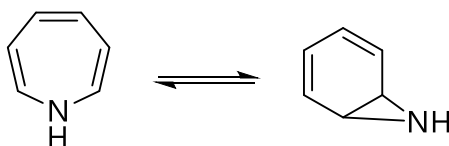


Особливістю хімії азепінів є його здатність до валентної ізомерії, яку називають азепін-норкардієною [65] (a) і (b) [66].

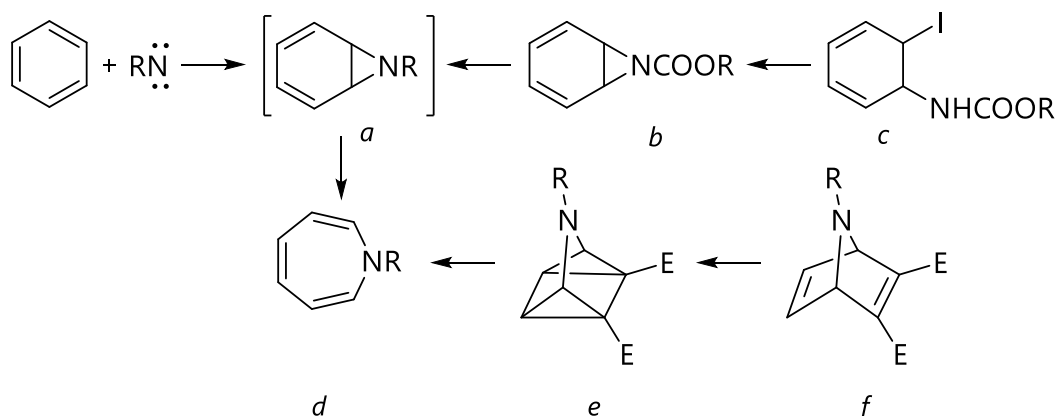


Авторами [67] описано перетворення 1*H*-азепіну у імінобензену або азаноркардієнову структуру (c). Подальші дослідження [68] свідчать, що сполука a (де,  $R_1 = Ar$ ,  $R_2 = n$ -тозил,  $E = CO_2CH_3$ ), при 20 C, являє собою суміш ізомерів a і b у кількісному співвідношенні 97 : 3. Також авторами [69] доведено, що для b та 4*H*-азепіну енергетично вигідна остання структура.

Для азепінів характерна валентна таутомерія. Але, на відміну від вуглеводнів та їх гетероциклічних аналогів, для яких вона встановлена, для азепінів чітко не виявлено існування азепінової структури у рівновазі азепін-N-норкардієн [70]:



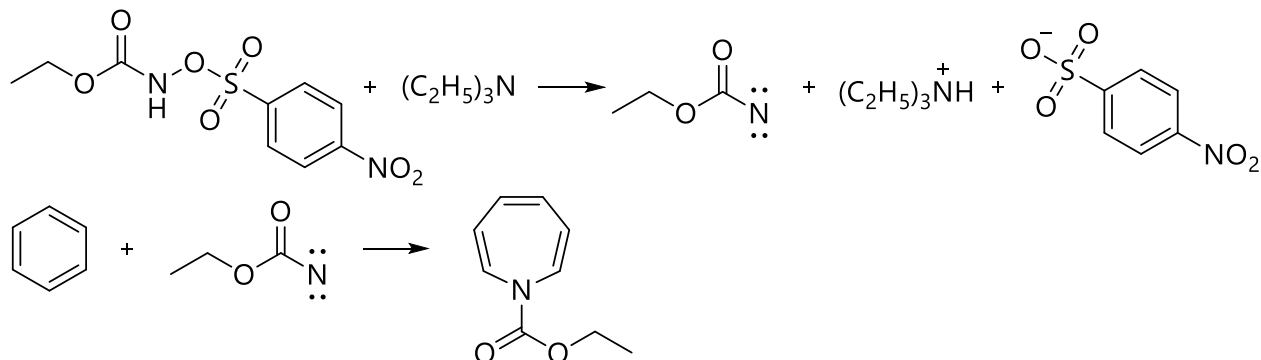
Щодо одержання азепінів, то загальні методи їх синтезу наведено на схемі:



Перші спроби синтезу азепінів [62, 67, 71] – розширення азаноркардієну. Але вони обмежені утворенням лише похідних 1*H*-азепінів, що містять електронакцепторні замісники атомі Нітрогену, які стабілізують цикл [72]. Серед відомих способів синтезу похідних азепінів виділяється  $\alpha$ -

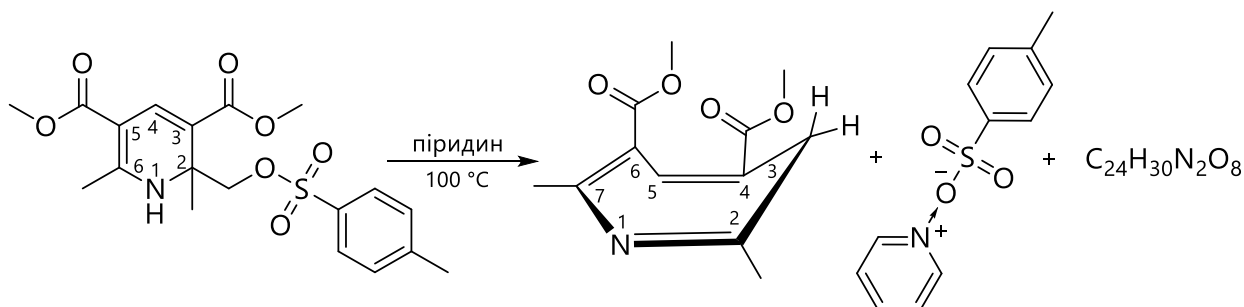
елімінування нітрону із бенzenом з подальшим розширення кільця до азепінового. Дана реакція проходить у дві стадії:

- утворення синглетного нітрону;
- взаємодія утвореного нітрону з бенzenом:

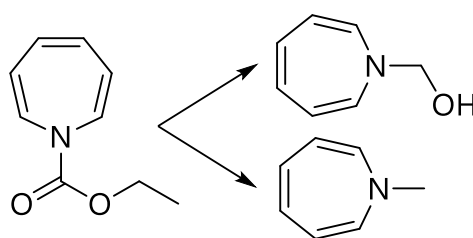


Крім вище зазначених, можна відмітити і інші методи одержання похідних азепінів [60–62, 71, 73]:

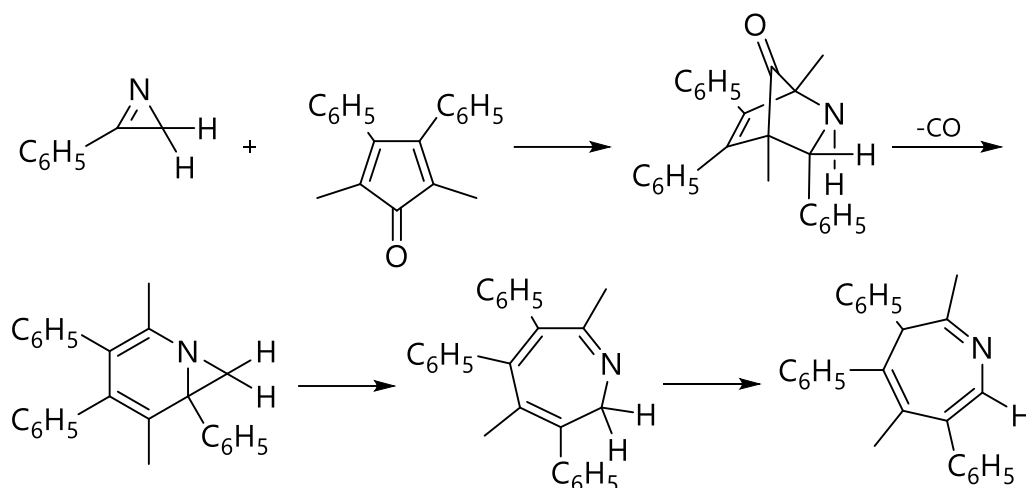
- розширенні дигідропіридинового кільця:



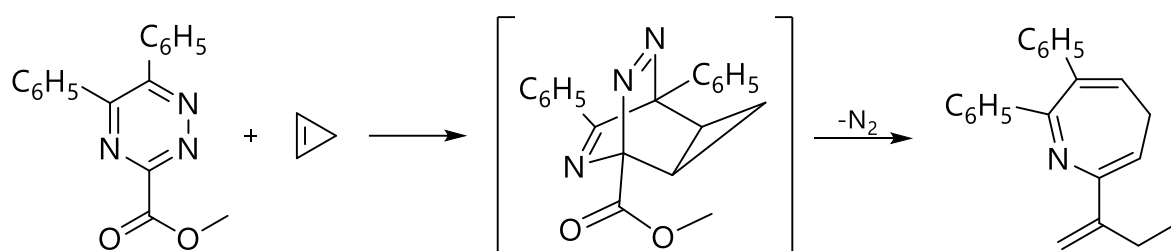
- відновлення N-карбоетоксіязепіну:



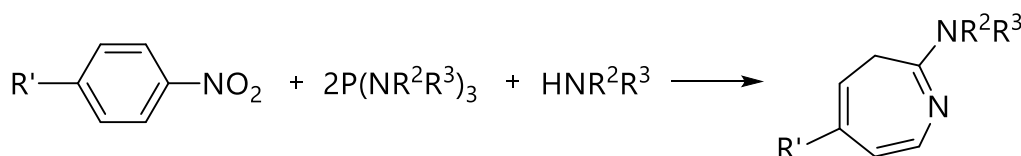
- взаємодія феніл похідних 1-азирину із похідними дифенілциклопентадієнону:



– реакція 1,3,4-триазину з циклопропеном:



– у присутності трифеніл- або трибутилфосфіну взаємодія діетиламіну з *para*-похідними нітробензену:



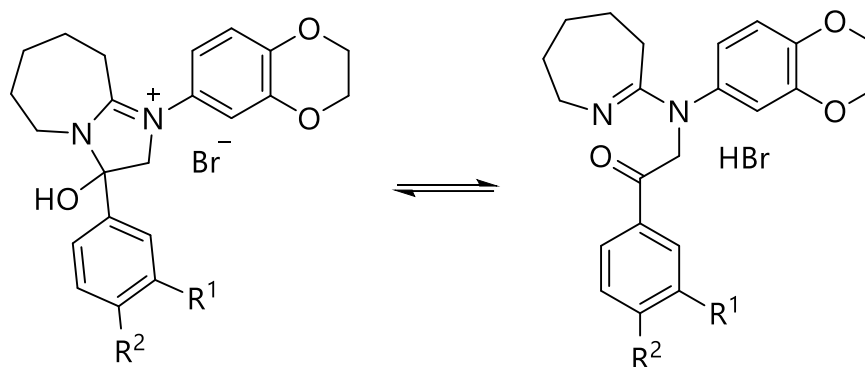
Азепін, як полієнова система, може вступати в реакції електрофільного приєднання, але розрахунки розподілу електронної густини свідчать про його не значну реакційну здатність. Ймовірно, присутній індукційний ефект атома Нітрогену, що зумовлює зсув електронної густини в системі, який дезактивує подвійні зв'язки [73]. Стосовно стабільності 3*H*-азепінів, то вона підтверджена експериментально. Крім того, для них характерні реакції приєднання по подвійному зв'язку N1–C2, що підтверджується заміщення 2-етоксигрупи на аміногрупу [72–74].

### 1.5. Фармакологічна активність похідних азепінів

На сьогодні фармація використовує близько 30 лікарських препаратів, що містять у своїй структурі азепіновий цикл. Фармакологічна активність цих препаратів зумовлена їх взаємодією рецепторами ЦНС, що подовжують

гальмівний вплив ГАМК. Серед таких лікарських препаратів можна відмітити: діазепам [74], флюнітразепам [75], лоразепам [76], мідазолам [77], клоназепам [78], хлордіазепоксид [79]. Як анестезійні препарати можна відмітити мідазолам, діазепам і лоразепам [80].

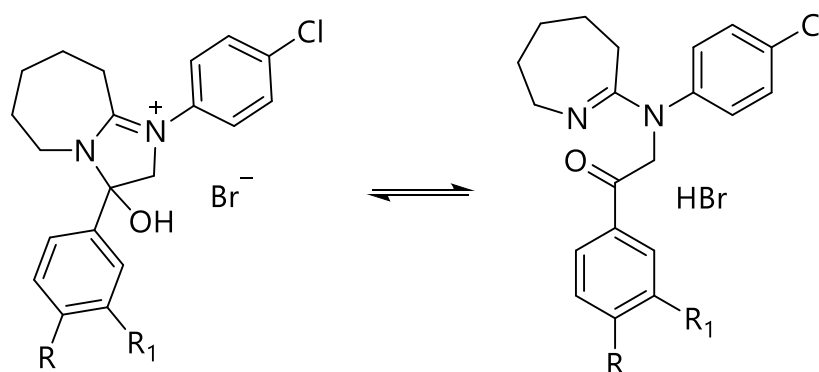
Авторами [81] досліджено протівірусну активність похідних 3*H*-азепінів та порівняно їх активність із відомими протівірусними препаратами "Рибавірин" і "Амізон":



$R = R^1 = H$ ;  $R = F$ ,  $R^1 = H$  (a);  $R = Cl$ ,  $R^1 = H$ ,  $R = Br$ ,  $R^1 = H$  (b);  $R = OC_2H_5$ ,  $R^1 = H$  (c);  $RR^1 = -C_2H_4O-$  (d).

Авторами доведено активність сполуки a ( $SI > 32$ ,  $IC_{50} > 100$  мкг/мл) щодо вірусу Flu A H1N1 California/07/2009 у концентраціях, менших у 2,8 рази, ніж для Рибавірину ( $SI > 37$ , але  $IC_{50} > 320$  мкг/мл), та в 15,1 разу ніж для Амізону.

У роботі [82] досліджено протівірусну активність щодо штаму грипу А H1N1 California/07/2009 і грипу А H3N2 Brisbane/10/2007A

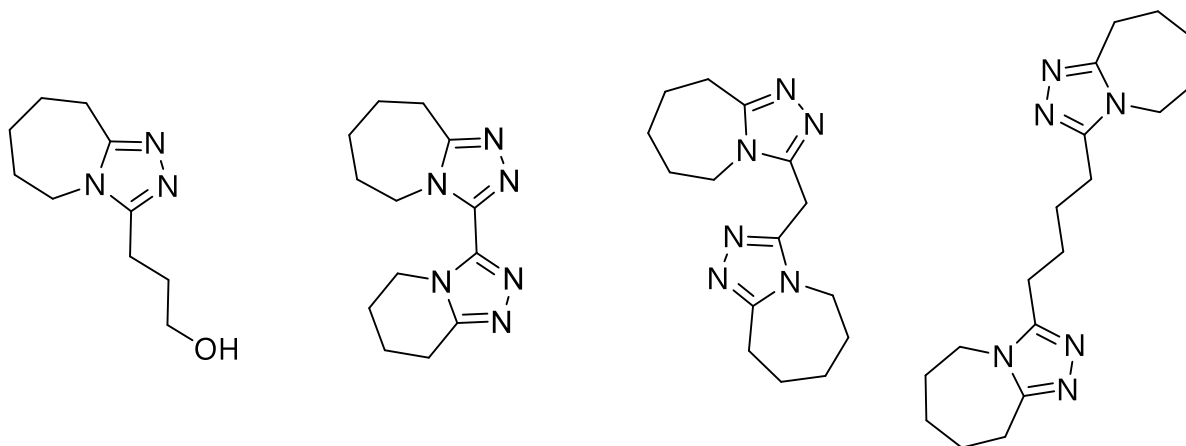


a)  $R = R_1 = H$ ; b)  $R = F$ ,  $R_1 = H$ ; c)  $R = Cl$ ,  $R_1 = H$ ; d)  $R = Br$ ,  $R_1 = H$ ; e)  $R = OCH_3$ ,  $R_1 = H$ ; f)  $R = CH_3$ ,  $R_1 = H$ ; g)  $R = NO_2$ ,  $R_1 = H$ ; h)  $RR_1 = OCH_2O$ ; i)  $RR_1 = OCH_2CH_2O$ .

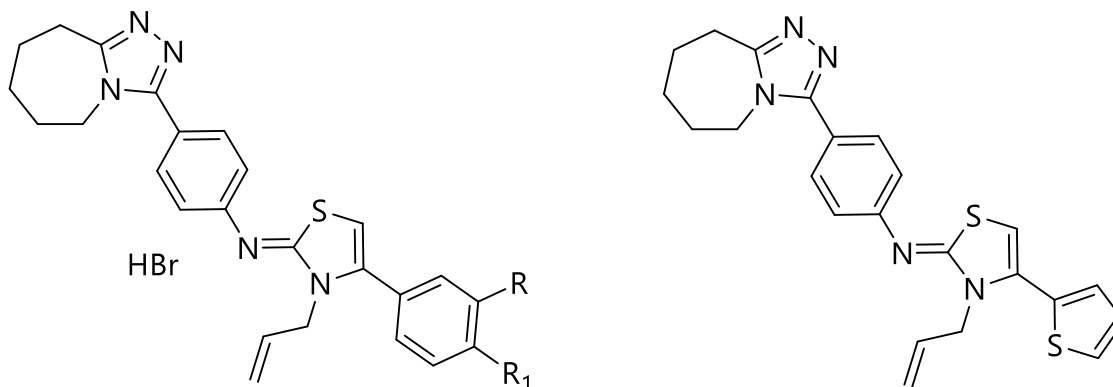
Показано, що сполуки виявляють *in vitro* активність щодо вірусів Flu A H1N1 California/07/2009 та Flu A H3N2 Brisbane /10/2007.



Авторами [83] досліджено анальгезуючу активність похідних 3-заміщених 5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]азепіну у тестах "гаряча пластина" та "оцтовокислі корчі". Встановлено, що досліджувані сполуки виявляють високий рівень зміни латентного періоду реакції, який перевищує такий для натрій диклофенаку (у 1,3 і 1,7 разу відповідно).

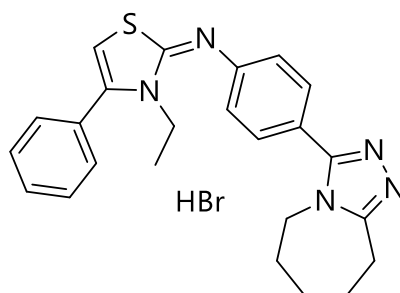


У роботі [84] досліджено *in vivo* анальгезуючі властивості похідних азепінів на моделях "гаряча пластина" та "оцтовокислі корчі". Показано, що досліджувані сполуки виявляють помірну анальгетичну дію порівняно з кеторолаком. Доведено, що на анальгетичну активність впливає замісник у третьому положенні тіазольного циклу:

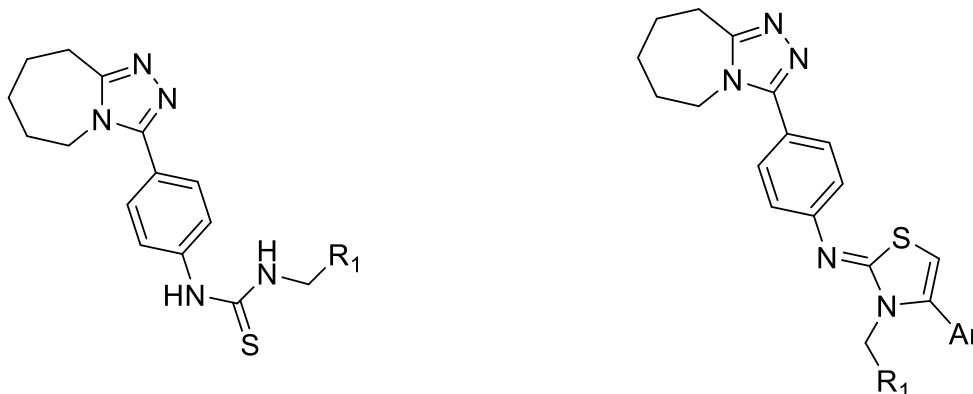


де, R = H; R<sub>1</sub> = a) H, b) CH<sub>3</sub>, c) C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, d) OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, e) Br, f) NO<sub>2</sub>; g) R = R<sub>1</sub> = -OCH<sub>2</sub>O-; h) R = R<sub>1</sub> = -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-; i) R = R<sub>1</sub> = Cl

Предметом патенту на корисну модель [85] є гідробромід (2*Z*)-3-етил-4-феніл-N-(4-{5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]азепін-3-іл}феніл)-2,3-дигідро-1,3-тіазол-2-імін, що виявляє високу анальгезуючу активність порівняно з кеторолаком:

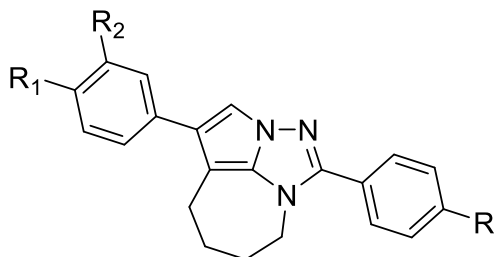


Серед похідних 3-(4<sup>1</sup>-амінофеніл)-6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]триазоло [4,3-а]азепінів досліджено протизапальну та анальгезуючу активність [86]:



$R_1 =$  a)  $\text{CH}_3$ , b)  $\text{CH}=\text{CH}_2$ .  $\text{Ar} =$  H, 4- $\text{OCH}_3$ , 4- $\text{OEt}$ , 4- $\text{Cl}$ .

Протипухлинну активність похідних 1,4-діарил-5,6,7,8-тетрагідро-2,2а,8а-триазациклопента[сd]азуленів вивчено *in vitro* на 60 лініях ракових клітин (лейкемії, легень, товстого кишківника, ЦНС, меланоми, яєчників, нирок, простати, молочної залози) [87]. Активність синтезованих сполук досліджено за процедурою оцінки мітотичної активності методом флуоресцентного фарбування.



де 2–4 а)  $R = \text{H}$ , б)  $R = \text{Br}$ . 5–7 а):  $R, R_1, R_2 = \text{H}$ , б)  $R, R_2 = \text{H}, R_1 = \text{CH}_3$ ; с)  $R, R_2 = \text{H}, R_1 = \text{OCH}_3$ ; д)  $R, R_2 = \text{H}, R_1 = \text{OC}_2\text{H}_5$ ; е)  $R = \text{H}, R_1R_2 = -\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ; ф)  $R, R_2 = \text{H}, R_1 = \text{Cl}$ ; г)  $R, R_2 = \text{H}, R_1 = \text{Br}$ ; х)  $R = \text{Br}, R_2 = \text{H}, R_1 = \text{CH}_3$ ; і)  $R = \text{Br}, R_2 = \text{H}, R_1 = \text{OCHF}_2$ ; j)  $R = \text{Br}, R_1, R_2 = \text{OCH}_3$ ; к)  $R = \text{Br}, R_1R_2 = -\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ .

## 1.6. Заключення. Постановка задачі

Аналіз літературних джерел щодо фармакологічної активності похідних азепінів дозволяє константувати, що вони виявляють широкий спектр біологічної активності. Тому, синтез нових похідних азепінів для моделювання інгібіторів глутатіон-*S*-трансферази має не лише науковий, а й практичний інтерес.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### 2.1. Матеріали

Для синтезу нових похідних 3-арил-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепін-3-їл)-акрилонітрилів нами використані наступні хімічні реактиви:

1. Спирт етиловий – за ДСТУ 4221:2003;
2. Диметилсульфоксид (ДМСО) ЧДА;
3. Диметилформамід (ДМФА) – ЧДА;
4. Ізопропанол – ХЧ;
5. Калій карбонат –ГОСТ10690-73;
6. Вода дистильована (H<sub>2</sub>O) – за ГОСТ 6709-72.

### 2.2. Хімічний аналіз

Структуру синтезованих сполук доведено за допомогою елементного аналізу, мас-спектроскопії та <sup>1</sup>H ЯМР. Спектри ЯМР <sup>1</sup>H одержано на Varian VXR-300 або Varian Mercury 400 (внутрішній еталон – TMS) у DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Температури плавлення синтезованих сполук визначено на приладі Electrothermal IA 9200.

Структури, назви сполук та розрахунок елементного аналізу нових похідних 3-арил-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепін-3-їл)-акрилонітрилів визначено за допомогою програми ChemAxon Marvin Sketch.

### 2.3. Молекулярний докінг

Молекулярний докінг (або молекулярне стикування) - метод молекулярного моделювання, який дозволяє передбачити найбільш вигідну для утворення стійкого комплексу орієнтацію і положення однієї молекули по відношенню до іншої.

Вихідною інформацією для докінгу слугують тривимірні структури білка (рецептора) і ліганду, конфірмаційна рухливість і взаєморозташування яких моделюється в процесі докінгу. Результатом моделювання є конформація ліганду, яка найкращим чином взаємодіє з активним центром ферменту.

Це здійснюється за допомогою операції, при якій одну молекулу наближають до іншої, неперервно обчислюючи енергію взаємодії між ними при різних орієнтаціях та конформаціях, поступово встановлюючи найвигіднішу взаємну орієнтацію.

Знання оптимальної молекулярної орієнтації може бути використане для передбачення сили асоціації або спорідненості між двома молекулами.

Молекулярний докінг було здійснено в область активного центру ланцюга А людської GSTP1-1 (PDB код 20GS [88]). Попередньо з кристалу фермента було вилучено молекули води, ліганди та В ланцюг. Трьохмірні структури лігандів були підготовлені програмою MarvinSketch, та оптимізовані в силовому полі MMFF94s в програмі Avogadro [52]. Параметрові файли для докінгу були підготовлені за допомогою програми MGLTools. Докінг було здійснено програмами AutoDock 4.2 та AutoDock Vina. Головним завданням цих програм, є передбачення ефективності зв'язування потенційних інгібіторів ферментом та дослідження впливу хімічної природи і конформації замісників в молекулі інгібітора на характер зв'язування з ферментом [89].

Білкові структури глутатіон-*S*-трансферази для докінгу було завантажено з RCSB Protein Data Bank [52, 90] або змодельовано та підготовлено за допомогою програми Discovery Studio.

Результати, що отримані за допомогою програми AutoDock 4.2, дозволяють проаналізувати мінімальну енергію зв'язування ліганда з макромолекулою, ймовірність розміщення ліганда в активному центрі білка в положенні, що відповідає найнижчій енергії зв'язування [90, 91].

Оцінку енергій зв'язування лігандів після молекулярної динаміки було проведено програмою AutoDock 4.2 з використанням параметру *epdb* попередньої, здійснивши корекцію їх часткових атомних зарядів.

## 2.4. Молекулярна динаміка

На сьогодні інструментальні методи визначення динаміки структури (поведінки) білків, зокрема ЯМР спектроскопія, мають обмеження на розмір досліджуваної системи. Тому протягом останнього десятиліття широкого вжитку набули дослідження поведінки білків *in silico* методами, серед яких особливе місце посідають розрахунки молекулярної динаміки білків та їх комплексів. Особлива цінність методів розрахунку молекулярної динаміки полягає в тому, що вони дають змогу розрізнити й оцінювати нюанси структури або поведінки білків, які неможливо зафіксувати іншими методами, зокрема виявляти узгоджені рухи дистантних (віддалених одна від одної) частин білка та дистантні ефекти амінокислотних замінів [92].

Отже, молекулярна динаміка - комп'ютерне моделювання руху атомів і молекул у газах, рідинах та твердих тілах. Можливості молекулярної динаміки обмежені рівнем обчислювальної техніки. В класичній молекулярній динаміці можна розглянути еволюцію систем сотень тисяч частинок до часу в кілька наносекунд. Такий проміжок часу дозволяє прослідкувати за встановленням термодинамічної рівноваги у системі.

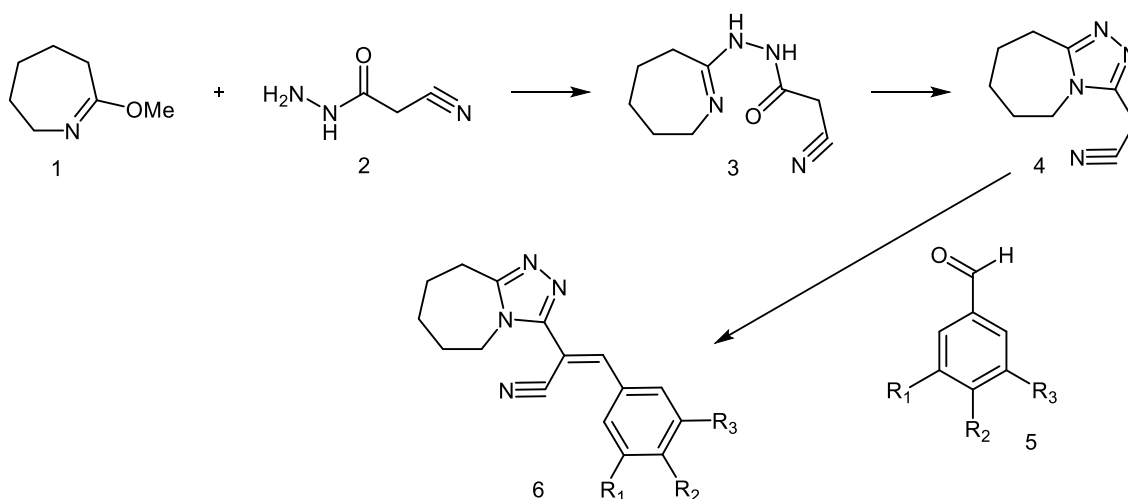
Молекулярна динаміка передбачає кількісне вивчення руху молекулярних систем по поверхнях потенціальної енергії, де на відміну від кінематики, яка вивчає тільки властивості руху, враховується природа діючих сил. Чисельний розрахунок руху атомів у молекулі, або індивідуальних атомів чи молекул у твердому тілі, рідині чи газі здійснюється згідно з законами руху Ньютона. Сили, що діють на атоми, розраховуються з використанням силових полів молекулярної механіки. Результатом розрахунку за методом молекулярної динаміки є траєкторія [93].

Молекулярну динаміку (МД) виконано програмою NAMD 2.10 [94], з використанням силового поля CHARMM27 та CHARMM36. Параметризацію лігандів було виконано на сервері SwissParam [95]. Попередню підготовку файлів для МД здійснено плагінами Solvate та Autoionize програми VMD 1.9.2 [96].

## РОЗДІЛ III. СИНТЕЗ ПОХІДНИХ 1,3,5-ТРИАЗИНІВ

### 3.1. Синтез похідних 2-(4,6-диморфолін-4-їл-1,3,5-триазин-2-їл)-*N*-арилгідразинкарботіоамідів

Отже, предметом нашого дослідження є похідні 2-{5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]азепін-3-їл}-3-(3,4,5-тризаміщеніфеніл)проп-2-енітрили, що синтезовані за схемою [97–101]:



*a*  $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = H.$

*b*  $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H.$

*c*  $R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3, R_3 = OCH_3.$

*d*  $R_1 = OC_2H_5, R_2 = OH, R_3 = H.$

*e*  $R_1 = OC_2H_5, R_2 = CH_3COO, R_3 = H.$

*f*  $R_1 = H, R_2 = C_2H_5COO, R_3 = H.$

*g*  $R_1 = H, R_2 = CH_3COO, R_3 = H.$

*h*  $R_1 = H, R_2 = C_2H_5COO, R_3 = OCH_3.$

*i*  $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = OH.$

*j*  $R_1 = H, R_2 = CH_3COO, R_3 = OCH_3.$

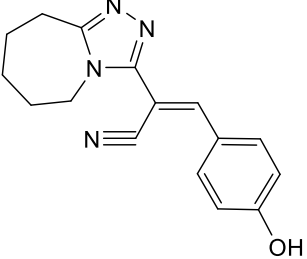
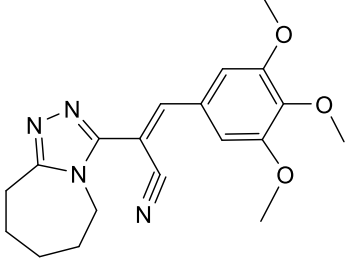
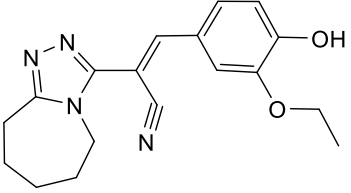
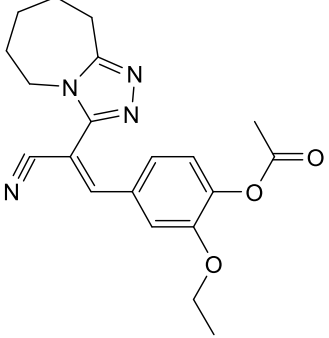
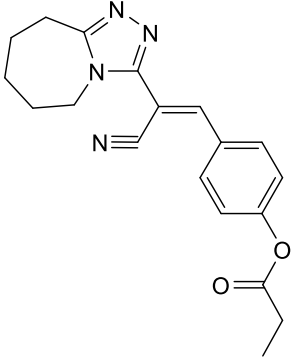
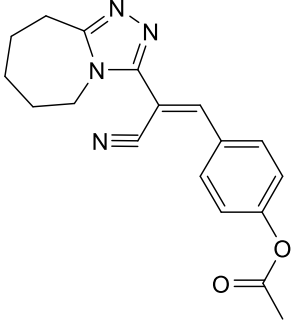
Склад та будову одержаних сполук підтверджено елементним аналізом та даними ЯМР  $^1H$ -спектроскопії.

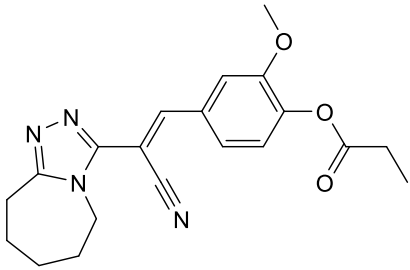
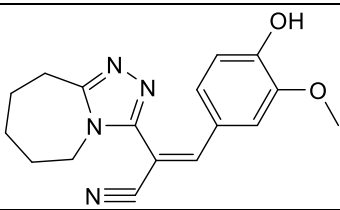
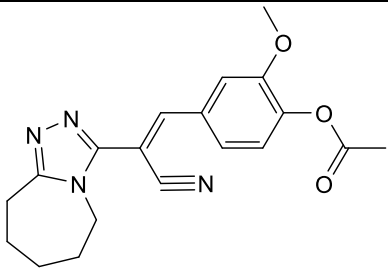
Таблиця 3.3.

Хімічні структури синтезованих потенційно біологічно активних сполук.

	Сполука	$M_r$	$T_{пл.}, ^\circ C$	Вихід
3.6a		308,4	182–183	63



<b>3.6b</b>		280,3	245–247	69
<b>3.6c</b>		354,4	155–156	60
<b>3.6d</b>		324,4	187–188	60
<b>3.6e</b>		366,4	158–159	66
<b>3.6f</b>		336,4	128–129	75
<b>3.6g</b>		322,4	175–176	79

3.6h		366,4	152–153	65
3.6i		310,4	214–215	63
3.6j		352,4	158–159	68

**3-(4-етоксифеніл)-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепін-3-іл)проп-2-еннітрил 6a.** Суміш 1.76 г (0.01 моля) (6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепін-3-іл)-ацетонітрилу **4** та 1.5 г (0.01 моля) 4-етоксибензальдегіду **5a** в 60 мл етанолу з краплиною піперидину кип'яють із зворотним холодильником протягом 6-ти годин. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури. Осад, що утворився, відфільтровують та сушать. Вихід 1.94 г (63 %).  $T_{пл.} = 182–183$  °C (з етанолу). Аналіз. Вираховано для  $C_{18}H_{20}N_4O$ , %: N 18.2. Знайдено, %: N 18.4.  $^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 1.37 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $CH_2CH_3$ ), 1.61 – 1.68 (2H, m, 7- $CH_2$ ), 1.72 – 1.79 (2H, m, 8- $CH_2$ ), 1.78 – 1.86 (2H, m, 6- $CH_2$ ), 2.94 – 2.98 (2H, m, 9- $CH_2$ ), 4.12 – 4.19 (4H, m,  $CH_2CH_3 + 5-CH_2$ ), 7.76 (1H, s, CH), 7.12 and 7.98 (4H, d-d,  $J = 9.0$  Hz,  $C_6H_4$ ).

Синтез **3-(4-гідроксифеніл)-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепін-3-іл)проп-2-еннітрил 6b** здійснено аналогічно сполуці **6a**. Вихід 1.93 г (69 %).  $T_{пл.} = 245–247$  °C (з етанолу). Аналіз. Вираховано для  $C_{16}H_{16}N_4O$ , %: N 20.0. Знайдено, %: N 19.8.  $^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 1.60– 1.67 (2H, m, 7- $CH_2$ ), 1.72 – 1.79 (2H, m, 8- $CH_2$ ), 1.78 – 1.86 (2H, m,

6-CH<sub>2</sub>), 2.94 – 2.97 (2H, m, 9-CH<sub>2</sub>), 4.12 – 4.15 (2H, m, 5-CH<sub>2</sub>), 6.95 і 7.90 (4H, d-d,  $J=8.7$  Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.70 (1H, s, CH), 10.5 (1H, s, OH).

**2-(6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]тріазоло[4,3-а]азепін-3-іл)-3-(3,4,5-триметоксифеніл)проп-2-еннітрил бс.** Вихід 2.61 г (60 %).  $T_{пл.} = 155-156$  °C (з ізо-пропанола). Аналіз. Вираховано для C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>, %: N 12.9. Знайдено, %: N 13.2. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$ , ppm: 1.71 – 1.77 (2H, m, 7-CH<sub>2</sub>), 1.84 – 1.89 (2H, m, 6,8(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 3.10 – 3.13 (2H, m, 9-CH<sub>2</sub>), 3.79 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.85 (6H, s, 2OCH<sub>3</sub>), 4.29 – 4.33 (2H, m, 5-CH<sub>2</sub>), 4.81 – 4.99 (1H, widened s., HBr), 7.45 (2H, s, C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>), 7.93 (1H, s, CH).

**3-(3-етокси-4-гідрокси-феніл)-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]тріазоло[4,3-а]азепін-3-іл)проп-2-еннітрил бd.** Вихід 1.94 г (60 %).  $T_{пл.} = 187-188$  °C (з етанолу). Аналіз. Вираховано для C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, %: N 17.3. Знайдено, %: N 17.6. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$ , ppm: 1.60– 1.67 (2H, m, 7-CH<sub>2</sub>), 1.72 – 1.79 (2H, m, 8-CH<sub>2</sub>), 1.78 – 1.86 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2.94 – 2.97 (2H, m, 9-CH<sub>2</sub>), 4.12 – 4.15 (2H, m, 5-CH<sub>2</sub>), 6.95 і 7.90 (4H, d-d,  $J=9.7$  Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.70 (1H, s, CH), 10.5 (1H, s, OH).

**[4-[2-ціано-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]тріазоло[4,3-а]азепін-3-іл)вініл]-2-етокси-феніл]ацетат бe.** Вихід 2.42 г (66 %).  $T_{пл.} = 158-159$  °C (з ізо-пропанола). Аналіз. Вираховано для C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>, %: N 15.3. Знайдено, %: N 15.4. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$ , ppm: 1.62– 1.69 (2H, m, 7-CH<sub>2</sub>), 1.74 – 1.80 (2H, m, 8-CH<sub>2</sub>), 1.79 – 1.87 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2.30 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 2.96 – 2.99 (2H, m, 9-CH<sub>2</sub>), 3.85 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.16 – 4.19 (2H, m, 5-CH<sub>2</sub>), 7.31 (1H, d-d,  $J=8.4$  Hz, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 7.60 (1H, d-d,  $J=8.4$  Hz, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 7.77 (1H, s, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 7.86 (1H, s, CH).

**[4-[2-ціано-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]тріазоло[4,3-а]азепін-3-іл)вініл]феніл]пропаноат бf.** Вихід 2.52 г (75 %).  $T_{пл.} = 128-129$  °C (з ізо-пропанола). Аналіз. Вираховано для C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, %: N 16.7. Знайдено, %: N 16.6. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$ , ppm: 1.16 (3H, t,  $J=7.5$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1.61– 1.68 (2H, m, 7-CH<sub>2</sub>), 1.74 – 1.79 (2H, m, 8-CH<sub>2</sub>), 1.78 – 1.86 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2.65 (2H, q,  $J=7.5$  Hz, COOCH<sub>2</sub>), 2.96 – 2.99 (2H, m, 9-CH<sub>2</sub>), 4.16 – 4.19 (2H, m, 5-CH<sub>2</sub>), 7.37 і 8.04 (4H, d-d,  $J=8.7$  Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.89 (1H, s, CH).

**[4-[2-ціано-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепін-3-іл)вініл]феніл]ацетат 6g.** Вихід 2.54 г (79 %).  $T_{пл.} = 175-176$  °C (з ізо-пропанолу). Аналіз. Вираховано для  $C_{18}H_{18}N_4O_2$ , %: N 17.4. Знайдено, %: N 17.5.  $^1H$  NMR (300 MHz, DMSO-d6),  $\delta$ , ppm: 1.62– 1.68 (2H, m, 7-CH<sub>2</sub>), 1.73 – 1.80 (2H, m, 8-CH<sub>2</sub>), 1.79 – 1.86 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2.31 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 2.95 – 2.99 (2H, m, 9-CH<sub>2</sub>), 4.15 – 4.19 (2H, m, 5-CH<sub>2</sub>), 7.37 і 8.03 (4H, d-d,  $J=8.7$  Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.88 (1H, s, CH).

**[4-[2-ціано-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепін-3-іл)вініл]-2-метокси-феніл]пропаноат 6h.** Вихід 2.38 г (65 %).  $T_{пл.} = 152-153$  °C (з ізо-пропанолу). Аналіз. Вираховано для  $C_{20}H_{22}N_4O_3$ , %: N 15.3. Знайдено, %: N 15.5.  $^1H$  NMR (300 MHz, DMSO-d6),  $\delta$ , ppm: 1.16 (3H, t,  $J=7.5$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1.62– 1.69 (2H, m, 7-CH<sub>2</sub>), 1.74 – 1.80 (2H, m, 8-CH<sub>2</sub>), 1.79 – 1.86 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2.63 (2H, q,  $J=7.5$  Hz, COOCH<sub>2</sub>), 2.96 – 2.99 (2H, m, 9-CH<sub>2</sub>), 3.84 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.16 – 4.19 (2H, m, 5-CH<sub>2</sub>), 7.31 – 7.78 (3H, m, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 7.87 (1H, s, CH).

**3-(4-гідрокси-3-метокси-феніл)-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепін-3-іл)проп-2-еннітрил 6i.** Вихід 1.95 г (63 %).  $T_{пл.} = 214-215$  °C (з етанолу). Аналіз. Вираховано для  $C_{17}H_{18}N_4O_2$ , %: N 18.1. Знайдено, %: N 18.2.  $^1H$  NMR (300 MHz, DMSO-d6),  $\delta$ , ppm: 1.60– 1.67 (2H, m, 7-CH<sub>2</sub>), 1.72 – 1.79 (2H, m, 8-CH<sub>2</sub>), 1.78 – 1.86 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2.94 – 2.97 (2H, m, 9-CH<sub>2</sub>), 4.12 – 4.15 (2H, m, 5-CH<sub>2</sub>), 6.95 і 7.90 (4H, d-d,  $J=9.7$  Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.70 (1H, s, CH), 10.5 (1H, s, OH).

**[4-[2-ціано-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5H-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепін-3-іл)вініл]-2-метокси-феніл]ацетат 6j.** Вихід 2.39 г (68 %).  $T_{пл.} = 158-159$  °C (з ізо-пропанолу). Аналіз. Вираховано для  $C_{19}H_{20}N_4O_3$ , %: N 15.8. Знайдено, %: N 15.6.  $^1H$  NMR (300 MHz, DMSO-d6),  $\delta$ , ppm: 1.62– 1.69 (2H, m, 7-CH<sub>2</sub>), 1.74 – 1.80 (2H, m, 8-CH<sub>2</sub>), 1.79 – 1.87 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2.30 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 2.96 – 2.99 (2H, m, 9-CH<sub>2</sub>), 3.85 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.16 – 4.19 (2H, m, 5-CH<sub>2</sub>), 7.31 (1H, d-d,  $J=8.4$  Hz, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 7.60 (1H, d-d,  $J=8.4$  Hz, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 7.77 (1H, s, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 7.86 (1H, s, CH).

## РОЗДІЛ 3. *IN SILICO* ДОСЛІДЖЕННЯ АЗЕПІНІВ ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ GSTази

### 3.1. Умови та способи зв'язування інгібіторів з GSTазою

Аналіз закономірностей зв'язування інгібіторів із GSTазою дозволив установити, що вони (рис. 3.7.) одночасно приєднуються як до G-центру (зв'язування глутатіону із залишками Tyr7, Arg13, Trp38, Lys44, Leu52, Gln64 і Ser65) так і до H-центру (зв'язування із залишками Tyr7, Phe8, Arg13, Val35, Ile104, Tyr108 та Gly205).

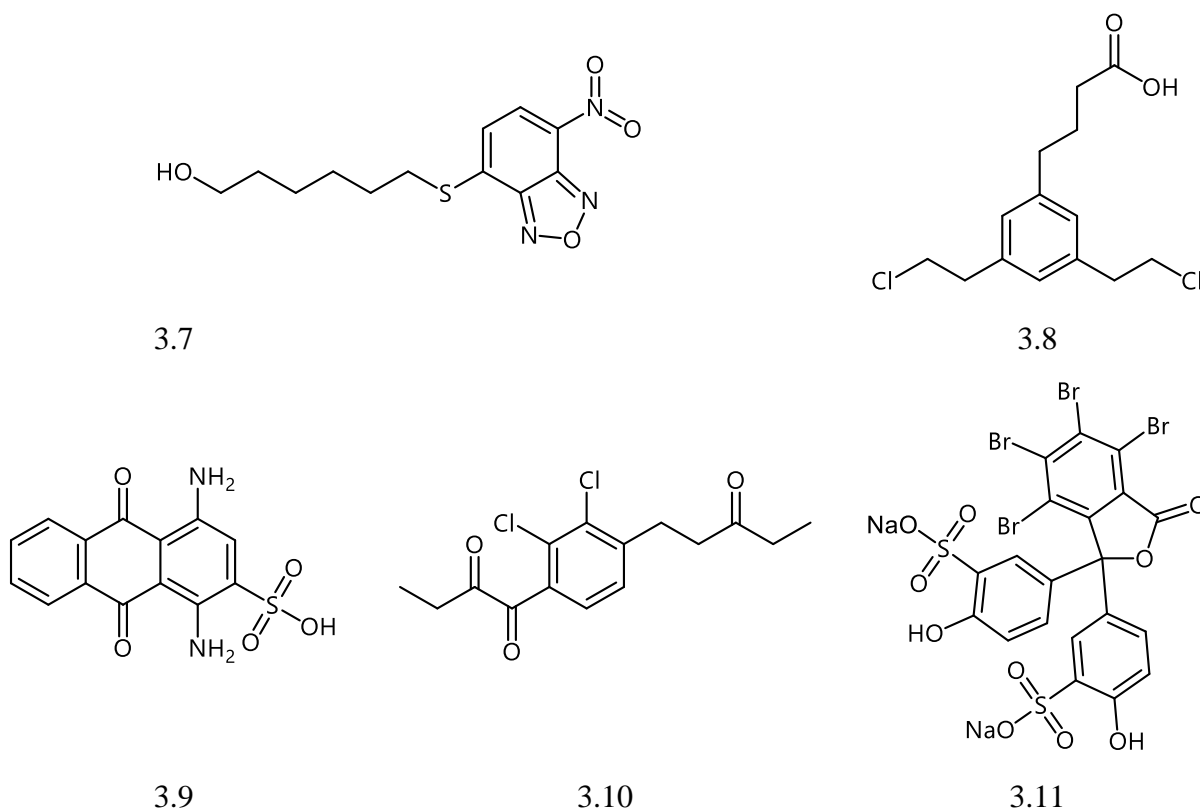


Рис. 3.1. Структури інгібіторів, згідно даних RCSB PDB в комплексі із GSTазою (**3.7** – NBDHEX; **3.8** – хлорамбуцил; **3.9** – цибакрон блакитний; **3.10** – етакринова кислота; **3.11** – бромосульфалін).

Слід відмітити, що G-центр складається, в основному, із полярних амінокислот, серед яких найважливішою для зв'язування GSH є Tyr7. При кон'югації G-центру з глутатіоном, останній активується шляхом стабілізації тіолятної форми та набує енергетично вигідної орієнтації щодо нуклеофільної атаки. H-центр зв'язує великі молекули (>400Да) з

ароматичними системами через  $\pi$ - $\pi$  стекінг та  $\pi$ - $\sigma$  взаємодію із залишками Phe8 та Tyr108.

Інгібітори GSTP1-1, шляхом Ван-дер-Ваальсові взаємодії, зв'язуються із залишками Phe8, Arg13, Tyr108, Gly205 та Val35. Тому, ці залишки відіграють провідну роль при зв'язуванні інгібітора в активному центрі фермента. Область активного центру GSTP1-1 схематично показано на рис. 3.2. Довжина взаємодій між інгібітором та залишками амінокислот становлять: Phe8 та Tyr108 – 16,66 Å, Arg13 та Gln39 – 20,56Å, Arg13 та Gly205 – 11,01Å.

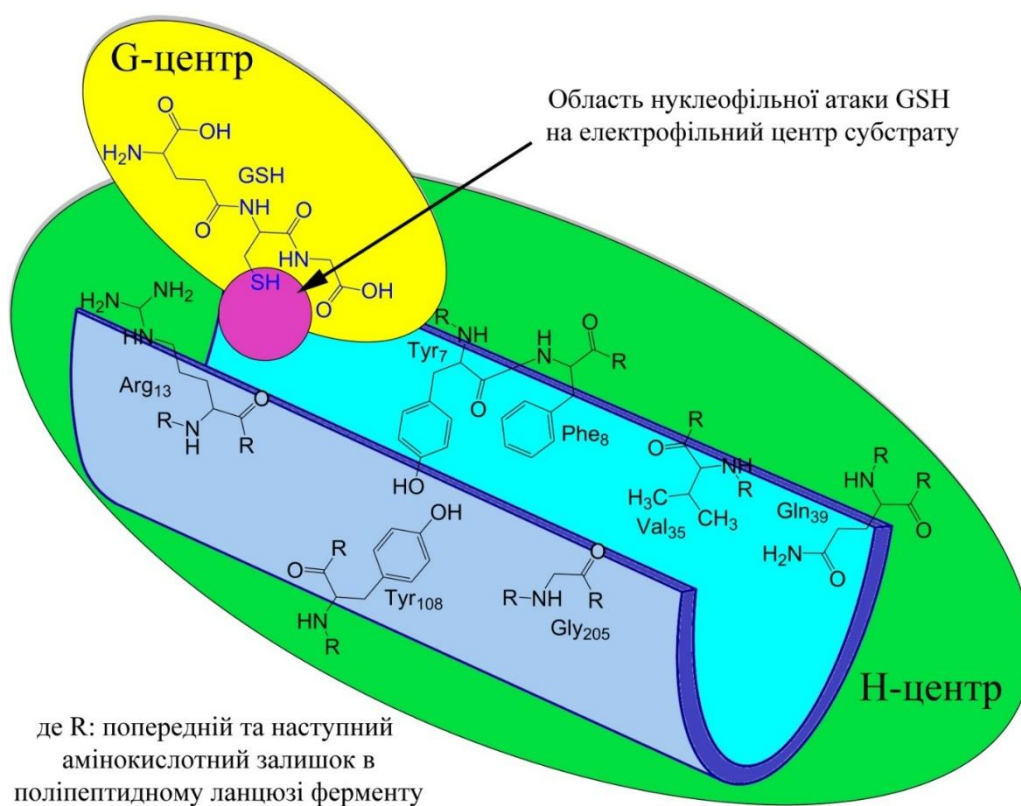


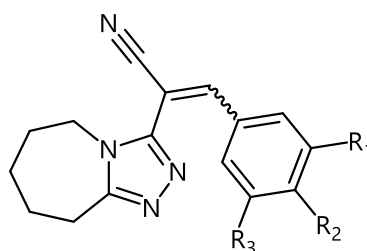
Рис.3.2. Схематична область активного центру GSTP1-1

Згідно вище викладеного, GSTP1-1 повинна мати структуру, що містить гідрофобний фрагмент або напівгідрофобний та містити молекули води, донор або акцептор  $H^+$ . Залежно від будови та місця розміщення інгібітора, залишки амінокислот можуть бути як донором так і акцептором протонів.

### 3.2. Оптимізація *in silico* інгібітора GSTази

Похідні азепінів – гетероциклічні структури [81–88], які широко вивчаються як білдінг-блоки та вихідні сполуки для пошуку потенційних лікарських засобів. Серед похідних азепінів є сполуки, що виявляють антибактеріальну та противірусну активність [98–101].

Метою даного дослідження є віртуальний пошук перспективних інгібіторів GST класу P серед похідних 2-{5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-[1,2,4]триазоло [4, 3-*a*]азепін-3-іл}-3-(3,4,5-тризаміщенихфеніл)проп-2-еннітрилів **3.6c-f**.



*a* R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = H.

*b* R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH, R<sub>3</sub> = H.

*c* R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>.

*d* R<sub>1</sub> = OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = OH, R<sub>3</sub> = H.

*e* R<sub>1</sub> = OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>COO, R<sub>3</sub> = H.

*f* R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>COO, R<sub>3</sub> = H.

*g* R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>COO, R<sub>3</sub> = H.

*h* R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>COO, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>.

*i* R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = OH.

*j* R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>COO, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>.

Нами проведено комп'ютерну оптимізацію та розрахунки для структур **3.6a-f**, що є інгібіторами ферменту. Молекулярний докінг досліджуваних сполук проведено в область активного центру GSTази.

Таблиця 3.1.

Прогнозована енергія зв'язування похідних азепінів в активному центрі GSTP1-1.

Сполука	Енантіомер		
	<i>RR</i>	<i>RS</i>	<i>SS</i>
	Δ <i>G</i> , ккал/моль		
<b>3.6a</b>	-5	-4,880	-5,71
<b>3.6b</b>	-6,96	-6,490	-6,53
<b>3.6c</b>	-5,04	-5,290	-5,1
<b>3.6d</b>	-5,04	-4,710	-3,97
<b>3.6e</b>	-2,94	-2,250	-3,21
<b>3.6f</b>	-5,28	-6,710	-6,9

<b>3.6g</b>	-3,99	-4,040	-4,42
<b>3.6h</b>	-5,34	-5,600	-4,79
<b>3.6i</b>	-1,37	-2,900	-2,5
<b>3.6j</b>	-6,17	-5,210	-3,27

Результати докінгу (табл. 3.1) свідчать, що серед похідних азепінів **3.6a-f** є структури, що можуть інгібувати активність GST. Аналіз отриманих даних дозволяє зробити висновок, що найефективнішими інгібіторами GST можуть бути як *RS*- так і *SS*-енантіомери **3.6c**.

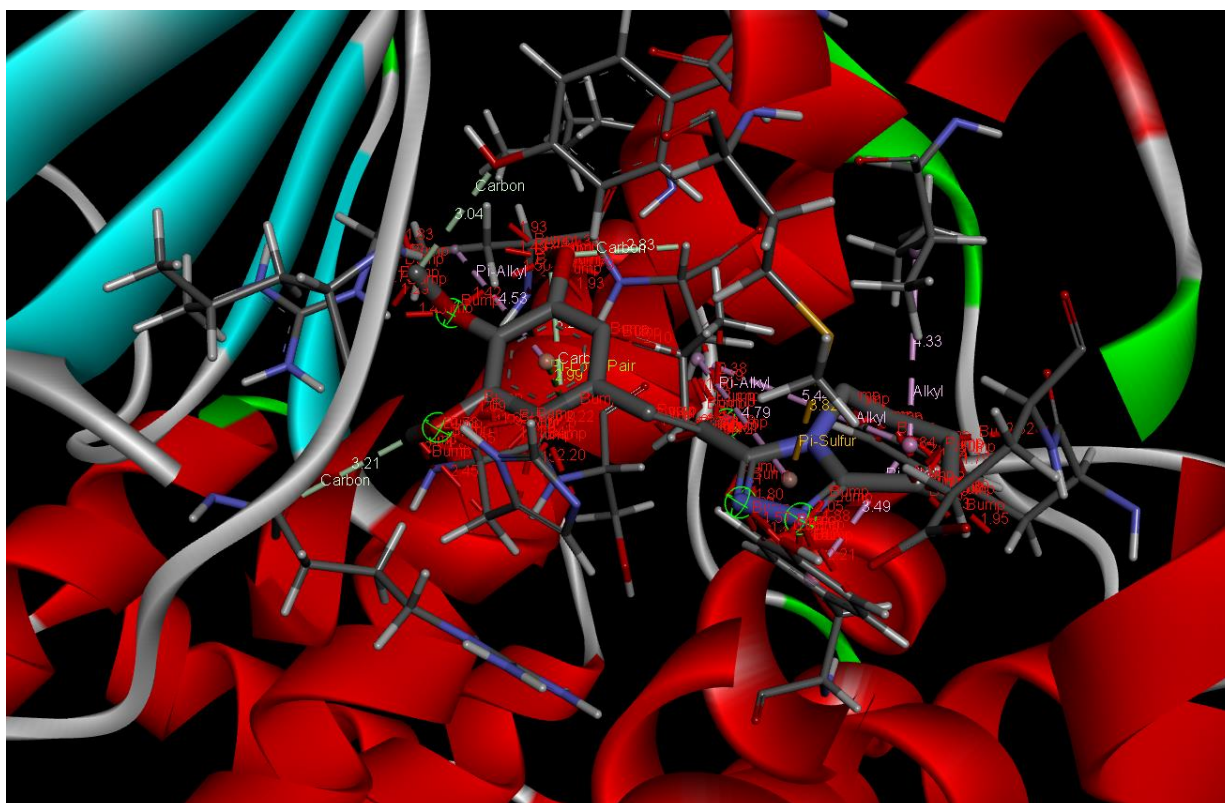


Рис. 3.3. Способи зв'язування ліганду **6c** в області активного центру GSTP1-1.

Аналіз зв'язування інгібіторів **3.6a-f** у зоні активного центру GST дозволяє виокремити два способи кон'югації лігандів (рис. 3.3.). У випадках *RS*- так і *SS*-енантіомерів ліганди знаходяться як у Н-центрі так і G-центрі, що свідчить на конкуренцію інгібіторів з GSH та іншим субстратом. Цікаво, що утворення комплексів незалежить від стеричної будови замісників у ароматичному кільці.

Фіксація **3.6c** в області G-центру ферменту забезпечується водневими зв'язками із залишками Tyr7, Cys101, Tyr108, Asn204. Окрім того, реалізується  $\pi$ -катионне зв'язування із Arg13 та водневі взаємодії з залишками Tyr7, Leu52 та



Gln51. Також присутні електростатичні, гідрофобні та Ван-дер-Ваальсові взаємодії між інгібітором та амінокислотними залишками ферменту, що його оточують.

Таким чином, запропонована нами структура 2-(6,7,8,9-тетрагідро-5*H*-[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]азепін-3-іл)-3-(3,4,5-триметоксифеніл)проп-2-еннітрил (**3.6c**) може бути перспективною субстанцією для подальших досліджень.

## ВИСНОВКИ

1. Узагальнено наукову літературу щодо глутатіон-*S*-трансфераз, її інгібіторів та похідних азепінів як біологічно активних сполук.
2. Проаналізовано фермент-інгібіторні комплекси бази даних Protein Data Bank, для пошуку активних амінокислотних залишків, залучених до зв'язування.
3. Виявлено, що досліджувані сполуки можуть бути перспективними інгібіторами глутатіон-*S*-трансферази ніж відомі інгібітори, що були раніше досліджені *in vitro*.
4. Встановлено, що 2-(6,7,8,9-тетрагідро-5*H*-[1,2,4]триазоло[4,3-*a*]азепін-3-іл)-3-(3,4,5-триметоксифеніл)проп-2-еннітрил може бути перспективною сполукою для конструювання інгібіторів глутатіон-*S*-трансферази.
5. Матеріали досліджень доповідались і обговорювались на VII Міжнародній заочній науково-практичній конференції молодих учених "Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній хімії" (Ніжин, 2020 р.) та Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю "Хімічна наука та освіта в контексті сучасних інтеграційних процесів" (Київ, 2020 р.).
6. Матеріали магістерської роботи можуть бути використані для цілеспрямованого синтезу похідних азепінів як інгібіторів GSTази.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ketterer B., Meyer D. J., Coles B., Taylor J. B., Pemble S. E. in Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms (Shankel, D. M., Hartman, P. E., Kada, T. & Hollaender, A., eds.). 1986. *Plenum Press, New York*. p. 103-126.
2. Pemble S, Shroeder KR, Spenser SR, Meyer DJ, Ketterer B, Taylor JB Human glutathione S-transferase (GSTT1) cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J*. 1994. Vol. 300. Is. 1. P. 271-276
3. Tan K. H., Meyer D. J., Coles B., Ketterer B. Lipid Peroxidation in Choline-Methionine Deficiency. *FEBS Lett*. 1986. Vol. 207. P. 231-233.
4. Gonzales F. The study of xenobiotic-metabolizing enzymes and their role in toxicity in vivo using targeted gene disruption. *J. Toxicol. Lett*. 1998. Vol. 102. Is. 34. P. 161-166.
5. Batist G., Tulpule A., Sinha B. [et al.] Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *Biol. Chem*. 1986. Vol. 261. Is. 33. P. 1544-1554.
6. Gupta V., Singha S. V., Ahmad H. [et al.]. Glutathione and glutathione S-transferases in a human plasma cell line resistant to melphalan. *Biochem. Pharmacol*. 1989. Vol. 38. Is. 12. P. 1993-2000.
7. K. Nakagawa, J. Yokota, M. Wada [at el.]. Levels of glutathione S-transferase  $\pi$  mRNA in human lung cancer cell lines correlate with the resistance to cisplatin and carboplatin. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*. 1988. Vol. 79. Is. 3. P. 301-304.
8. Peters W. H., Roelofs H. M. Biochemical characterization of resistance to mitoxantrone and adriamycin in Caco-2 human colon adenocarcinoma cells: a possible role for glutathione S-transferases. *Cancer Res*. 1992. Vol. 52. Is. 1. P. 1886-1890.
9. Beier D., Schulz J. B., Beier C. P. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. *Mol. Cancer*. 2011. Vol. 10. Is. 4. P. 56-64.

10. Townsend D. M., Tew K. D. The role of glutathione S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 2003. Vol. 22. Is. 47. P. 7369-7375.
11. Mathe N., Kalyanasundaram M., Balaraman K. Glutathione S-transferase inhibitors. *Expert Opin*. 2006. Vol. 16. P. 431-444.
12. Слончак А. М., Оболенська М. Ю. Структура і функції глутатіон S-трансферази P1-1. *Укр. біохім. журн.* 2009. Т. 81. № 1. С. 5-11.
13. IUBMB Enzyme Nomenclature. : веб-сайт. URL: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/5/1/18.html> (дата звернення: 14.11.2020).
14. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 249. Is. 22. P. 7130–7139.
15. Kamisaka K., Habig W. H., Ketley J. N. et al. Multiple forms of human glutathione S-transferase and their affinity for bilirubin. *Eur. J. Biochem.* 1975. Vol. 60. Is. 1. P. 153–161.
16. Jakoby W. B. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1978. Vol. 46. P. 383–414.
17. Bass N. M., Kirsch R. E., Tuft S. A. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1977. – 492, N 1. – P. 163–175.
18. Mannervik B., Jansson H. Binary combinations of four protein subunits with different catalytic specificities explain the relationship between six basic glutathione S-transferases in rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. Is. 17. P. 9909–9912.
19. Jakoby W. B., Ketterer B., Mannervik B. Glutathione transferases: nomenclature. *Biochem. Pharmacol.* 1984. Vol. 33. Is. 16. P. 2539–2540.
20. Mannervik B., Awasthi Y. C., Board P. G. et al. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.* 1992. Vol. 282. Is. 1. P. 305–306.
21. Commandeur J. N. M., Stijntjes G. J., Vermeulen N. P. E. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-

- conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol. Rev.* 1995. Vol. 47. Is. 2. P. 271–330.
22. Mannervik B., Alin P., Guthenberg C. et al. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *PNAS.* 1985. Vol. 82. Is. 21. P. 7202–7206.
  23. Sheehan D., Meade G., Foley V. M., Dowd C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 2001. Vol. 360. Is. 1. P. 1–16.
  24. Vuilleumier S. Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? *J. Bacteriol.* 1997. Vol. 179. Is. 5. P. 1431–1441.
  25. Tamaki H., Yamamoto K., Kumagai H. Expression of two glutathione S-transferase genes in the yeast *Issatchenkia orientalis* is induced by o-dinitrobenzene during cell growth arrest. *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181. Is. 9. P. 2958–2962.
  26. Dixon D. P., Davis B. G., Edwards R. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. Is. 34. P. 30859–30869.
  27. Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. - Pharmacol. Toxicol.* 2005. Vol. 45. Is. 7. P. 51-88.
  28. Dann A. T., Kenyon A. P., Seed P. T. [at el.]. Glutathione S-transferase and liver function in intrahepatic cholestasis of pregnancy and pruritus gravidarum. *Reprod. Biol.* 2000. Vol. 91. Is. 6. P. 127-129.
  29. Ketterer B., Harris J.M., Talaska G., Meyer D.J. [at el.]. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ. Health. Perspect.* 1992. Vol. 98. P. 87-94.
  30. Wang W., Ballatori N. Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. *Pharmacological reviews.* 1998. Vol. 50. P. 335-352.

31. Hegazy U.M., Tars K., Hellman U., Mannervik B. Modulating catalytic activity by unnatural amino acid residues in a GSH-binding loop of GST P1-1. *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 376. P. 811-826.
32. M. A. Norrgard, U. Hellman, B. Mannervik. Cys-X Scanning for Expansion of Active-site Residues and Modulation of Catalytic functions in a Glutathione Transferase. *Biol. Chem.* 2011. Vol. 19. P. 16871-16878.
33. K. Nakagawa, J. Yokota, M. Wada [at el.]. Levels of glutathione S-transferase  $\pi$  mRNA in human lung cancer cell lines correlate with the resistance to cisplatin and carboplatin. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*. 1988. Vol. 79. Is. 3. P. 301-304.
34. U.M. Hegazy, B. Mannervik, G. Stenberg. Functional role of the lock and key motif at the subunit interface of glutathione transferase P1-1. *Biol. Chem.* 2004. Vol. 10. P. 9586-9596.
35. H. Dirr, P. Reinemer, R. Huber X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferase. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Biol. Chem.* 1994. Vol. 15. P. 645-661.
36. R.W. Wang, D. J. Newton, A. R. Johnson [at el.] Site-directed mutagenesis of glutathione S - transferase Ya Ya. *Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 23961-23965.
37. C. J. Wilce, P. G. Board, S. C. Feil, M. W. Parker. Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. *The EMBO Journal*. 1995. Vol. 14. P. 2133-2143.
38. J. D. Hayes, R. C. Strange. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic. Res.* 1995. Vol. 22. P. 193-207.
39. J. D. Hayes [at el.]. Glutathione transferase. *Pharmacol. Toxicol.* 2005. Vol. 45. P. 51-88.
40. W. Dekant. Chemical-induced nephrotoxicity mediated by glutathione S-conjugate formathion. *Toxicol Lett.* 2001. Vol. 124. P. 21-36.

41. P. Turella, J. Z. Pederson, A. M. Caccuri [at el.]. Glutathione transferase superfamily behaves like storage proteins for dinitrosyl-diglutathionyl-iron comp-lex in heterogeneous systems. *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 42294-42299.
42. М. Діксон, Е. Уебб. Ферменти. Мир. 1982. Р. 515.
43. Р. Маррі, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуелл. Біохімія людини: в 2-х томах. Мир. 1993. 384 с.
44. В. М. Бочков, А. Б. Добровольський. Клінічна біохімія. 2005. Р. 512.
45. М. Є. Кучеренко. Біохімія. Київ: Вища школа. 1988.
46. De Luca C., Raskovic D., Pacifico V. et al. The search for reliable biomarkers of disease in multiple chemical sensitivity and other environmental intolerances. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 2011. Vol. 8. Is. 7. P. 2770–2797.
47. Gauci C. G., Jayashi C. M., Gonzalez A. E. et al. Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis by immunization with novel recombinant antigens. *Vaccine.* 2012. Vol. 30. Is. 26. P. 3824–3828.
48. G. Filomeni, P. Turella, M. L. Dupuis, O. Forini [at el.] 6-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol, a specific glutathione S-transferase inhibitor, overcomes the multidrug resistance (MDR)-associated protein 1- mediated MDR in small cell lung cancer. *Mol. Cancer. Ther.* 2008. Vol. 7. P. 371-378.
49. L. J. Parker, S. Ciccone, L.C. Italiano, A. Primavera [at el.] The anti-cancer drug chlorambucil as a substrate for the human polymorphic enzyme glutathione transferase P1-1: kinetic properties and crystallographic characterization of allelic variants. *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 380. P. 131-234.
50. W. H. Ang, L. J. Parker, A. De Luca, L. Juillerat-Jeanneret [at el.] Rational design of an organometallic glutathione transferase inhibitor. *Angew. Chem.Int.Ed.Engl.* 2009. Vol. 148. P. 3854-3857.
51. X. Yang, G. Liu, H. Li, Y. Zhang [at el.] Novel oxadiazole analogues derived from ethacrynic acid: design, synthesis, and structure-activity relationships in

- inhibiting the activity of glutathione S- transferase P1-1 and cancer cell proliferation. *J. Med. Chem.* 2010. Vol.53. P. 1015-1022.
52. A.J. Oakley, M. Lo Bello, M. Nuccetelli, A.P. Mazzetti, M.W. Parker The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site). *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 291. P. 913-926.
  53. A. Procopio, S. Alcaro, S. Cundari, A. De Nino [at el.] Molecular modeling, synthesis, and preliminary biological evaluation of glutathione S-transferase inhibitors as potential therapeutic agents. *J. Med. Chem.* 2005. Vol. 48. P. 6084-6089.
  54. A. Zompra, N. Georgakis, E. Pappa, T. Thireou [at el.] Glutathione analogues as substrates or that discriminate between allozymes of the MDR-involved human glutathione transferase P1-1. *Peptide Science.* 2016. Vol.106. P. 330-345.
  55. R. Tellez-Sanz, E. Cesareo, M. Nuccetelli, A. M. Aguilera [at el.]. Calorimetric and structural studies of the nitric oxide carrier S- nitrosoglutathione bound to human glutathione transferase P1-1. *Protein Science.* 2006. Vol. 15. P. 1093-1105.
  56. Діксон М., Уебб Е. Ферменти. Мир. 1982. P. 515.
  57. U. M. Hegazy, K. Tars, U. Hellman, B. Mannervik. Modulating catalytic activity by unnatural amino acid residues in a GSH-binding loop of GST P1-1. *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 376. P. 811-826.
  58. K. Tars, A. Larsson, A. Shokeer, B. Olin [at el.] Structural basis of the suppressed catalytic activity of wild-type human glutathione transferase T 1-1 compared to its W234R Mutant. *J. Mol. Biol.* 2006. Vol. 355. P. 96-105.
  59. E. Cesareo, L. J. Parker, J. Z. Pedersen, M. Nuccetelli, A. P. Mazzetti [at el.] Nitrosylation of human glutathione transferase P 1-1 with dinitrosyl diglutathionyl iron complex in Vitro and in Vivo. *Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 42172-42180.
  60. Гетероциклические соединения. / под. ред. Эльдерфилд Р. М. : Индательство иностранной литературы. 1960. 612 с.



61. Иванский В.И. Химия гетероциклических соединений. М.: Высшая школа. 1978.
62. Общая органическая химия. Под ред. Д. Бартона и У.Д. Оллиса. Т.8. Азотсодержащие гетероциклы. Под ред. П.Г. Сэммса. – Пер. с англ. Под ред. Н.К. Кочеткова. М. : Химия, 1985. – с. 752 с.
63. Azepine. : веб-сайт. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6451476#section=Depositor-Supplied-Synonyms> (дата звернения: 14.11.2020).
64. Anderson D. L., Hassner A., Cycloadditions. XVII. Cycloaddition of 1-azirines with cyclopentadienones. Formation of 2H- and 3H-azepines, and mechanistic interpretation. 1974. *J. Org. Chem.* Vol. 39. P. 3070.
65. Carstensen-Oeser E. 3.5-Diphenyl-2.4.6.7-tetrakis(metoxycarbonyl)-3H-azepine C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>8</sub>. 1972. *Chem. Ber.* P. 105.
66. L. A. Paquette, *Angew. Chem. Internal. Edn.* 1971. Vol. 10. P. 11.
67. L. A. Paquette, in «Non-Benzenoid Aromatics» ed. J P, Snyder, Academic Press, New York. 1969. vol. 1. p. 287.
68. L. A. Paquette, D. E. Kuhla, J. H. Barrett, and R. J. Haluska Unsaturated heterocyclic systems. LII. General synthetic entry to derivatives of 1H-azepine. *J. Org. Chem.* 1969. Vol. 34. Is. 10. P. 2866–2878.
69. H Gunther, J. B. Pawliczek, B. D. Tunggal, H. Prinzbach, and R. H. Levin, Protonenresonanz-Spektroskopie ungesättigter Ringsysteme, XVIII. Ein Benzolimin-1H-Azepin-Gleichgewicht. *Chem. Ber.* 1973. Vol. 106. Is. 3. P. 984–995.
70. A Steigel J. Saueur, D. A. Kleier, and G. Binsch, Nitrogen analogs of cycloheptatrienes and norcaradienes. Nuclear magnetic resonance study of their thermodynamic and kinetic properties. *J. Amer Chem. Soc.* 1972. Vol. 94. P. 2770–2779.
71. W. Lwowski, Nitrenes and the Decomposition of Carbonylazides. *Angew. Chem. Internal. Edn.* 1967. Vol. 6. P. 897–906.

72. R. A. Abramovitch, T. D. Bailey, T. Takaya, and V. Uma, Reaction of methanesulfonyl nitrene with benzene. Attempts to generate sulfonyl nitrenes from sources other than the azides. *J. Org. Chem.* 1974. Vol. 39. P. 340–345.
73. J. M. Photis, Nitrene insertion reactions. 1. Dimethyl N-carbethoxyazepines and their cycloaddition reaction products. *J. Heterocyclic Chem.* 1970. Vol. 7. P. 1249–1256.
74. J. M. Photis, Nitrene insertion reactions. Part III. The steric effect of the Isopropyl and t-butyl groups. 1,6 Type cycloaddition of tetracyanoethylene to 1H-azepines. *J. Heterocyclic Chem.* 1971. Vol. 8. P. 729-733.
75. Diazepam. *Вікіпедія* : веб-сайт. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Diazepam> (дата звернення: 14.11.2020).
76. Flunitrazepam. *Вікіпедія* : веб-сайт. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Flunitrazepam> (дата звернення: 14.11.2020).
77. Lorazepam. *Вікіпедія* : веб-сайт. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Lorazepam> (дата звернення: 14.11.2020).
78. Midazolam. *Вікіпедія* : веб-сайт. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Midazolam> (дата звернення: 14.11.2020).
79. Clonazepam. *Вікіпедія* : веб-сайт. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Clonazepam> (дата звернення: 14.11.2020).
80. Chlordiazepoxide. *Вікіпедія* : веб-сайт. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Chlordiazepoxide> (дата звернення: 14.11.2020).
81. Бондар В.М. Доморацький ОЕ. Бензодіазепіни в практиці лікаря медицини невідкладних станів. *Медицина неотложных состояний*. 2013. № 7(54). С. 134–141
82. С. А. Демченко, Т. А. Бухтіарова, Л. С. Бобкова, А. М. Демченко Синтез і протівірусна активність похідних 1-(2,3-дигідробензо[1,4]діоксан-6-іл)-3-арил-3-гідрокси-2,5,6,7,8,9-3H-імідазо[1,2-a]азепінію та субстанції Амізону. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2018. № 1(57). с. 26–31

83. S. A. Demchenko, O. E. Yadloviskyi, L. S. Bobkova, A. M. Demchenko Synthesis and antiviral activity of derivatives of 1-(41-chlorophenyl)-3-aryl-3- hydroxy-2,5,6,7,8,9-hexahydro-3H-imidazo[1,2-a]azepinium for Flu A H1N1 California/07/2009 and Flu A H3N2 Brisbane/10/2007. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2018. № 6(61). с. 44–51
84. С. А. Демченко, Н. М. Чаленко, Т. А. Бухтіарова, Н. М. Серединська, Л. С. Бобкова, О. Є. Ядловський, А. М. Демченко Синтез й анальгезуюча активність 6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепінів. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2018. № 4–5(60). с. 25–31
85. С. А. Демченко 1, Г. О. Єр'оміна, Л. О. Перехода, Т. А. Бухтіарова, Л. С. Бобкова, А. М. Демченко Синтез та анальгезуючі властивості похідних (3-алліл-4-арил-3Н-тіазол-2-іліден)-[4-(6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепін-3-іл)феніл]амінів. *Фармацевтичний журнал*. 2017. № 1. с. 67–73.
86. Гідробромід (3-етил-4-феніл-3Н-тіазол-2-іліден)-[4-(6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло-[4,3-а]азепін-3-іл)феніл]аміну, що проявляє анальгезуючу активність : пат. №111015 Україна : МПК С07В 43/00 А61К 31/427 (2006.01) А61Р 29/ (2006.01). Заявка № u 2016 04704; Заявл. 26.04.16. Опубл. 25.10.16. Бюл. № 20.
87. Демченко С.А., Єр'оміна Г. О., Перехода Л.О., Демченко А.М. Синтез та властивості похідних 3-(41-амінофеніл)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4] триазоло[4,3-а]азепінів // Матеріали ХХІV Української конференції з органічної хімії Полтава 19-23 вересня 2016 р. – с. 217
88. Demchenko S. A., Fedchenkova Yu. A., Bobkova L. S., Artemchuk L. P., Demchenko A. M. The synthesis and the study of the antitumor activity of 1,4-di-aryl-5,6,7,8-tetrahydro-2,2a,8atriazacyclopenta[cd]azulene derivatives. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. 2019. Т. 17. вип. 1(65). с. 3–12
89. H. Alonso, A. A. Bliznyuk, J. E. Gready. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med. Res. Rev.* 2006. Vol. 26. Is. 5. P. 531-568.

90. RCSB. Protein Data Bank. : веб-сайт. URL: <http://www.rcsb.org> (дата звернення: 14.11.2020).
91. R. D. Whelan, C. J. Waring, C. R. Wolf [et al.]. Over-expression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase PI in MCF-7 cells selected for vincristine resistance in vitro. *Int. J. Cancer Res.* 1992. Vol. 52. P. 241-246.
92. G. M. Morris, D. S. Goodsell, M. E. Pique, [at el.] Automated docking of flexible ligands to flexible receptors. *J Mol. Recognit.* 2011. Vol. 9. Is. 1. P. 1-5.
93. О. Ю. Нипорко Молекулярна динаміка білків: класичні силові поля і надійність траєкторій. *Ukrain. Bioorg. Acta.* 2013. P. 53-67.
94. Ш. М. Туса, О. В. Савицький, О. І. Корнелюк. Комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки мутантної форми тирозил-тРНК синтетази G41R, асоційованої з нейропатією. *The Ukrain. Biochem. J.* 2015. Vol. 87. Is. 8. P. 142-153.
95. J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, [et al.]. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. of Comput. Chem.* 2005. Vol. 26. P. 1781-1802.
96. V. Zoete, M. A. Cuendet, A. Grosdidier [et al.] Swissparam, a fast force field generation tool for small organic molecules. *J. of comput. Chem.* 2011. Vol. 32. Is. 11. P. 2359-2368.
97. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 1996. Vol. 14. Is. 1. P. 33-38.
98. Demchenko, S. A., Yeromina, H. O., Perekhoda, L. O., Bukhtiarova, T. A., Bobkova, L. S., Demchenko, A. M. Synthesis and analgesic properties of (3-allyl-4-aryl-3H-thiazol-2-ylidene)-[4-(6,7,8,9-tetrahydro-5H-[1,2,4]triazolo[4,3-a]azepin-3-yl)phenyl]amine derivatives. *Farmatsevtichnyi Zhurnal.* 2018. Vol. 1. P. 67-73.
99. 3-(4-гідроксифеніл)-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5н-[4,3-а]азепін-3-їл)акрилонітрил, що проявляє аналгетичну та протизапальну активності : пат. № 135585 Україна : Інтелектуальна власність. 10.07.2019, бюл. № 13.

100. Кисорець К.С. Похідні 3-арил-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло [4,3-а]азепін-3-їл)-акрилонітрилів та їх ймовірна біологічна активність / Кисорець К.С., Циганков С.А., Демченко А.М., Суховєєв В.В. // Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній хімії : матеріали VII Міжнародної заочної науково-практичної конференції молодих учених (Ніжин, 21 квітня 2020 р.) / за заг. ред. В.В.Суховєєва. – Ніжин : НДУ ім. Миколи Гоголя, 2020. – с. 58–60
101. Кисорець К.С. Ймовірна біологічна активність похідних 3-арил-2-(6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,3-А]азепін-3-їл)-акрилонітрилів / К.С.Кисорець, С.А.Циганков, А.М.Демченко, В.В.Суховєєв // Всеукраїнська науково-практична інтернет-конференція з міжнародною участю «Хімічна наука та освіта в контексті сучасних інтеграційних процесів» (21 жовтня 2020 р.), НПУ імені М.П.Драгоманова, м. Київ. С.