

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**  
**Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії**

**Васильченко Олександр Володимирович**

УДК 547.885: 615.281.8+615.281.9

**НОВІ АНТИБАКТЕРІЙНІ ТА ПРОТИВІРУСНІ СПОЛУКИ СЕРЕД  
АРИЛАМІДІВ ТРИЦИКЛІЧНИХ КАРБОНОВИХ КИСЛОТ**

02.00.10 — біоорганічна хімія

Дисертація на здобуття наукового ступеня  
кандидата хімічних наук

Науковий керівник:

Говорун Дмитро Миколайович  
Доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України

Київ – 2015

## ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ .....	5
ВСТУП .....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Біологічна активність похідних ТГКК.....	12
1.1.1 Біологічна активність природних похідних ТГКК.....	12
1.1.2. Біологічна активність синтетичних похідних ТГКК.....	20
1.2. Синтез похідних ТГКК.....	33
1.3. Характеристика біологічних моделей застосовуваних у роботі.....	42
1.3.1. ДНК-залежна РНК-полімераза фагу Т7.....	42
1.3.2. Вірус бичачої вірусної діареї.....	44
1.3.3. Бактерійні штами.....	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	47
2.1. Прилади та реагенти.....	47
2.2. Процедура докінгу ліганду в рецептор.....	47
2.3. Реакція транскрипції <i>in vitro</i> .....	48
2.4. Мікробіологічні дослідження.....	49
2.5. Дослідження антивірусна активності сполук.....	50
2.6. Тест на цитотоксичність.....	50
2.7. Запис спектрів флуоресценції.....	51
2.8. Визначення logD сполук.....	51
2.9. Визначення розчинності сполук.....	52
2.10. Розрахунок фізико-хімічних параметрів.....	53
2.11. Методики синтезу сполук та їхня характеристика.....	53
РОЗДІЛ 3. СИНТЕЗ НОВИХ ТГКК ТА ЇХНІХ АРИЛАМІДІВ .....	63
3.1 Синтез 9-заміщених феназин-1-карбонових кислот та їхніх ариламідів.....	63
3.1.1. Вибір замісників та їхнього положення для модифікації ФКК-1.....	63
3.1.2. Синтез 9-заміщених ФФК-1.....	64

3.1.3. Синтез ариламідів 9-заміщених феназин-1-карбонових кислот.....	66
3.1.4. Характеристика спектрів $^1\text{H}$ ЯМР ариламідів 9-заміщених ФКК-1 .....	67
3.2. Синтез 8-метил-ТБТ-6-та ТБТ-8-карбонових кислот та їхніх ариламідів .....	70
3.2.1. Вибір положення для введення карбоксильної груп.....	70
3.2.2. Синтез 8-метил-ТБТ-6 та ТБТ-8 карбонових кислот .....	71
3.2.3. Синтез ариламідів 8-Ме-ТБТ-6- та ТБТ-8-карбонових кислот .....	72
3.2.4. Таутомерні форми ТБТ та особливості спектрів $^1\text{H}$ ЯМР .....	73
РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ТГКК	
ТА ЇХНІХ АРИЛАМІДІВ.....	78
4.1 Визначення впливу синтезованих сполук на синтез РНК in vitro.....	78
4.1.1.Дослідження впливу 9-заміщених ФКК-1 та їхніх ариламідів на синтез РНК in vitro.....	79
4.1.2. Дослідження впливу похідних ТБТ на синтез РНК in vitro.....	81
4.2 Дослідження антибактерійної активності ТГКК та їхніх ариламідів.....	84
4.2.1. Дослідження антибактерійної активності 9-заміщених ФКК-1 та їхніх ариламідів.....	84
4.3.2. Дослідження антибактерійної активності 8-метил-ТБТ-6- та ТБТ-8- карбонових кислот та їхніх ариламідів.....	86
4.3. Дослідження антивірусної активності ариламідів ТГКК.....	89
4.3.1. Дослідження антивірусної активності ариламідів ФКК-1 .....	89
4.3.2. Дослідження антивірусної активності ариламідів ТБТКК.....	91
4.4. Моделювання способу взаємодії ариламідів ТГКК з каталітичним сайтом РНКП Т7.....	94
4.4.1. Моделювання способу взаємодії ариламідів 9-заміщених ФКК-1 з каталітичним сайтом РНКП Т7.....	94
4.4.2 Моделювання способу взаємодії ариламідів ТБТКК з каталітичним сайтом РНКП Т7.....	99
4.5. Дослідження зв'язування ТБТ-8-п-трифлуорометилфенілкарбоксаміду (4.20) з ДНК.....	104

4.6. Дослідження відповідності ТГКК та їхніх ариламідів правилам Ліпінського.....	108
4.7. Визначення ліпофільності та розчинності сполук <b>3.26</b> та <b>4.20</b> .....	111
РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ ГІБРИДНИХ СПОЛУК	
ТРИ- ТА БІЦИКЛІЧНИХ ГЕТЕРООСНОВ.....	114
5.1. Обумовлення вибору сполук для дослідження.....	114
5.2. Синтез та спектральні характеристики трициклічно-біциклічних гібридних .....	116
5.3. Дослідження біологічної активності трициклічно-біциклічних гібридних сполук.....	118
5.3.1. Дослідження впливу трициклічно-біциклічних гібридних сполук на синтез РНК in vitro .....	118
5.3.2. Дослідження зв'язування трициклічно-біциклічних гібридних сполук з ДНК.....	120
5.3.3. Дослідження антибактерійної активності трициклічно-біциклічних гібридних сполук .....	121
5.4. Моделювання способу взаємодії трициклічно-біциклічних гібридних сполук з каталітичним сайтом РНКП <b>T7</b> .....	123
5.5. Дослідження відповідності трициклічно-біциклічних гібридних сполук правилам Ліпінського .....	128
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ РОБОТИ.....	
6.1. Синтез ТГКК та їхніх ариламідів .....	130
6.2. Дослідження впливу ТКГГ та їхній ариламідів на синтез РНК in vitro .....	131
6.3. Дослідження антибактерійної дії ТГКК та їхніх ариламідів .....	132
6.4. Дослідження протівірусної дії ТГКК та їхніх ариламідів.....	134
6.5. Моделювання взаємодії ариламідів ТГКК з каталітичною кишенею РНКП <b>T7</b> .....	136
6.6. Дослідження гібридних сполук три- та біциклічних гетеро основ.....	137
ВИСНОВКИ.....	138
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	139

## СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

БАС – біологічно активні сполуки  
ВБВД – вірус бичачої вірусної діареї  
ВГС – вірус гепатиту С  
ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія  
ДМСО – диметилсульфоксид  
ДМФА – диметилформамід  
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота  
КДІ – карбонілдіімідазол  
МІК – мінімальна інгібувальна концентрація  
НК – нуклеїнова кислота  
ПККНТ – перещеплювала культура клітин нирки теляти  
ПМР – протонний магнітний резонанс  
РНК – рибонуклеїнова кислота  
РНКП Т7– ДНК-залежна РНК-полімераза фага Т7  
ТБТ – триазинобензотіазин (3-оксо-2,4-дигідро-2Н-[1,2,4]триазино[5,6-  
b][1,4]бензотіазин)  
ТБТКК – триазинобензотіазинкарбонова кислота  
ТГС – трициклічні гетероароматичні системи  
ТГКК – трициклічні гетероароматичні карбонові кислоти  
ТШХ – тонкошарова хроматографія  
ФКК-1 – феназин-1-карбонова кислота  
ХТІ – хіміотерапевтичний індекс  
ЯМР – ядерний магнітний резонанс  
АсОН – оцтова кислота  
Arg – аргінін  
Asp – аспагнінова кислота  
CC<sub>50</sub> – концентрація сполуки, що вбиває 50% клітин  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – хлористий метилен  
Cys – цистеїн

EC<sub>50</sub> – концентрація сполуки, що зменшує репродукцію вірусу на 50%

EtOH – етиловий спирт

Gly – гліцин

His – гістидин

IC<sub>50</sub> – концентрація сполуки, що знижує активність ферменту на 50%

Ile – ізолейцин

LD<sub>50</sub> – концентрація сполуки, що вбиває 50% піддослідних тварин

Met – метіонін

PBS – водно-фосфатний буфер

PDB – protein data bank

Ph – феніл

Pu – піридин

Tyr – тирозин

Ser – серин

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Нині розвиток біоорганічної хімії обумовлений, здебільшого, необхідністю пошуку нових сполук з оригінальною структурою та комплексом прогнозованих біологічних властивостей. Особливо велика потреба такого гатунку сполук у медицині та фармації.

Одним із підходів створення нових біологічно активних сполук (БАС) із прогнозованою активністю є синтез речовин – аналогів відомих активних сполук, цей метод ще називають *ligand base*. Така методологія вигідно вирізняється тим, що новосинтезовані похідні з великою долею ймовірності матимуть модульовану біологічну активність, подібну до такої у попередників та/або призводити до появи якісно нових видів активності.

Відомо, що планарні поліциклічні гетероароматичні сполуки мають широкий спектр біологічної дії та здатні пригнічувати роботу ДНК- і РНК-синтезувальних та інших білково-нуклеїнових комплексів. Механізми дії таких речовин полягають як у взаємодії з білками, так і з нуклеїновими кислотами. ДНК- і РНК-синтезувальні комплекси є одними із загальноприйнятих мішеней для антивірусної та антибактерійної терапії, оскільки їхнє інгібування може блокувати репродукцію патогенів.

До класу трициклічних гетероароматичних карбонових кислот (ТГКК) та їхніх похідних входять сполуки, що проявляють широкий спектр біологічної активності. Одним із найвідоміших представників цього класу є феназин-1-карбонова кислота (ФКК-1) – природний антибіотик, що демонструє антимікробну дію. Синтетичні аміді ФКК-1 та її ізостерних кислот також відомі як сполуки, що мають біологічні властивості: антимікробну, протипухлинну, антигепатитну тощо. Потенціал сполук цього класу ще не вичерпаний. Подальша функціоналізація трициклічних гетероароматичних сполук, а саме – синтез на їхній основі нових карбонових кислот – продовжує залишатися доволі

актуальною задачею. Модифікація останніх відкриває можливість до синтезу широкого спектру їхніх біологічно активних похідних.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалася у рамках бюджетних тем відділу квантової і молекулярної біофізики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України «Дослідження фізико-хімічних механізмів спонтанних точкових мутацій ДНК, спричинених її прототропною таутомерією» (номер державної реєстрації 0105U005339, 2006-2010 рр.); «Фізико-хімічна природа спонтанних та індукованих аналогами нуклеотидних основ транзицій та трансверсій» (номер державної реєстрації 0110U000690, 2011-2015 рр.); та конкурсної теми «Розроблення новітніх технологій синтезу інгібіторів вірусної реплікації - потенційних терапевтичних агентів проти вірусу гепатиту С» (номер державної реєстрації – 0113U006254, 2013-2014 р.р.), і частково у рамках бюджетної теми відділу синтетичних біорегуляторів Інституту молекулярної біології і генетики НАН України «Конструювання гетероциклічних конденсованих сполук – регуляторів ферментів системи біосинтезу нуклеїнових кислот" (номер державної реєстрації – 0107U003344, 2008-2012 р.р.).

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи полягає у синтезі нових ариламідів гетероароматичних трициклічних карбонових кислот – інгібіторів синтезу РНК з антибактерійною та противірусною дією.

*Для досягнення цієї мети вирішували наступні завдання:*

- синтезувати серії нових ариламідів 9-заміщених ФКК-1, триазинобензотіазин карбонових кислот (ТБТКК) та підтвердити їхню структуру;
- виявити та оцінити здатність отриманих сполук впливати на синтез РНК у модельній системі транскрипції *in vitro* на основі ДНК-залежної РНК-полімерази бактеріофагу Т7 (РНКП Т7);
- дослідити антибактерійну та противірусну активність синтезованих сполук *in vitro*;



- вивчити біологічну активність трициклічно-біциклічних гібридних сполук з жорстким закріпленням псевдоарилкарбоксамідної групи;
- провести аналіз залежності структура-активність для виявлених інгібіторів синтезу РНК та сполук з антибактерійною та противірусною дією;
- за допомогою докінгу визначити можливий спосіб взаємодії досліджуваних речовин з транскрипційним комплексом РНКП Т7.

*Об'єкт дослідження* – синтезовані похідні ФКК-1 та ТБТКК.

*Предмет дослідження* – синтез і хімічна модифікація досліджуваних сполук та визначення їхньої біологічної активності у тест-системах *in vitro* та *in silico*.

*Методи дослідження* – хімічний синтез, тонкошарова хроматографія (аналіз перебігу реакцій та реакційних сумішей), рідинна хроматографія (очистка та аналіз чистоти продуктів), ЯМР- та мас-спектрометрія (підтвердження структури сполук), молекулярно-біологічні методи синтезу РНК, гель-електрофорез (візуалізація продуктів транскрипції), флуоресцентна мікроскопія, комп'ютерне моделювання, бактерійний та антивірусний скринінг *in vitro*.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Синтезовано та підтверджено будову 8-метил-ТБТ-6- і ТБТ-8-карбонових кислот і низки їхніх ариламідів. Вперше серед представників ариламідів 9-заміщених ФКК-1 та ТБТКК виявлено ефективні інгібітори синтезу РНК. Запропоновано спосіб/механізм взаємодії розроблених інгібіторів з амінокислотними залишками каталітичного сайту РНКП Т7. Серед ариламідів обох досліджених класів сполук вперше виявлено інгібітори низки умовно-патогенних і патогенних бактерій та вірусу бичачої вірусної діареї (ВБВД). Висунуто припущення, що їхня біологічна активність пов'язана із здатністю цих сполук суттєво пригнічувати синтез РНК. Вперше показано здатність ариламідів ТБТКК зв'язуватися з ДНК.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено та апробовано зручні методи синтезу *o*-амінотіофенолбензойних кислот – вихідних “білдінг-блоків” для створення трициклічних гетероароматичних карбонових кислот. З їхнім використанням синтезовано нові 8-метил-ТБТ-6- і ТБТ-8-карбонові кислоти

та серії їхніх ариламідів. Синтезовано дві нові серії ариламідів 9-метил- та 9-метоксифеназин-1-карбонових кислот.

Серед інгібіторів синтезу РНК виявлено сполуки з ефективними противірусними та антибактерійними властивостями, які можуть бути використані як ефективні попередники терапевтичних препаратів.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом проведено критичний огляд наукової літератури за темою дисертації, розроблено і проведено синтез нових *орто*-амінотіофенолбензойних кислот, ТБТКК та їхніх ариламідів. Вдосконалено методи синтезу 9-заміщених ФКК-1, їхні ариламиди синтезовано спільно із Костіною В. Г. (відділ синтетичних біорегуляторів Інституту молекулярної біології і генетики НАН України). Автором проведено ферментативний скринінг *in vitro* синтезованих сполук у системі транскрипції РНКП Т7. Скринінг *in silico* у моделі каталітичної кишені РНКП Т7 та з'ясування можливого способу взаємодії інгібіторів з ензимом проводився спільно з к.х.н Платоновим М. О. (відділ молекулярної та квантової біофізики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України). Дослідження антимікробних властивостей синтезованих сполук проводилися за безпосередньої участі здобувача у Інституті ветеринарної медицини НААН України (м. Київ) спільно з к.б.н. Дерябіним О. М. Антивірусний скринінг проводився за безпосередньої участі здобувача в ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського» АМН України (м. Київ) спільно з д.б.н. Рибалко С. Л. Планування дослідження та обговорення отриманих результатів проведено спільно з к.х.н. Пальчиковською Л. Г. (відділ молекулярної та квантової біофізики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України) та науковим керівником роботи.

**Апробація результатів дисертації.** Результати роботи доповідалися на фахових наукових конференціях: IX всеукраїнська конференція студентів та аспірантів “Сучасні проблеми хімії”, 14-16 травня 2008 р., м. Київ; III Міжнародна конференція молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери”, 18-21 листопада 2008 р., м. Харків; XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 3-6 квітня 2012 р., м. Львів; IX

международная научно-техническая конференция “Актуальные вопросы биологической физики и химии”, 22-26 апреля 2013 г., г. Севастополь, Украина; I International Scientific Conference of Students and PhD Students “Cell Technology Week 2013”, 14-17 May 2013, Kyiv.

**Публікації.** Матеріали дисертаційної роботи опубліковано у 6 статтях в наукових фахових журналах, а також у 5 тезах доповідей на наукових фахових конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження, які викладено у трьох розділах, аналізу та узагальнення результатів роботи, висновків та переліку використаних джерел, який нараховує 156 найменувань. Дисертація містить 65 рисунків, 13 таблиць та 23 схем синтезу. Загальний обсяг дисертації становить 155 сторінок машинописного тексту.

## РОЗДІЛ 1

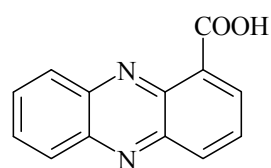
### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Біологічна активність похідних ТГКК

##### 1.1.1. Біологічна активність природних похідних ТГКК

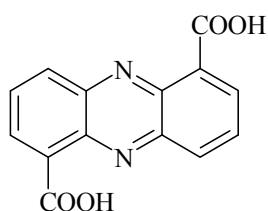
До природних похідних ТГКК, що проявляють біологічну активність, відноситься широкий клас антибіотиків бактерійного походження. До таких належать виявлені серед вторинних метаболітів бактерій *Pseudomonas* та *Streptomyces* похідні феназин-1-карбонової кислоти (ФКК-1) відомої під назвою Туберміцин В (1.1), через її здатність значно пригнічувати ріст *Mycobacterium tuberculosis*. ФКК-1 разом з феназин-1,6-дикарбоновою кислотою (1.2) є прекурсором для метаболітичного утворення інших феназинів [1, 2].

Туберміцин В та Хлорорафін (суміш один до одного феназин-1-карбоксаміду та його 5,10-дигідропохідної (1.3)) ефективно інгібують ріст *Bacillus cereus* (МІК < 0,5 мкг/мл), але проявляють посередню активність щодо *Micrococcus luteus* та *Staphylococcus aureus* (МІК > 5 мкг/мл). Феназин-1,6-дикарбонова кислота (1.2) інгібує вільнорадикальне окислення, що каталізується ферментом ксантиноксидазою [3].



ФКК-1, Туберміцин В

1.1



ФКК-1,6-дикарбонова кислота

1.2

Рис 1.1. ФКК-1 та ФКК-1,6

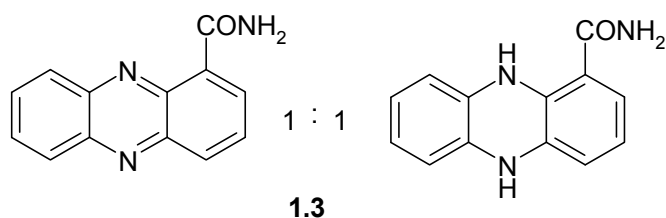
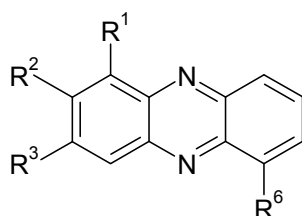


Рис 1.2. Хлорорафін

Слабкі антибіотики Фенкоміцин (феназин-1,6-дикарбонової кислоти монометилловий естер) (**1.4**) та його 5,10-дигідро похідна, що виділені з ґрунтових та морських штамів *Streptomyces*, відповідно [4, 5]. Мікометоксин В – 6-метоксифеназин-1-карбонової кислоти метилловий естер (**1.5**), що виділений з *S. luteoreticul*, показує високу антибактерійну активність щодо патогенних мікобактерій, включаючи деякі їхні резистентні штами [6].

Фенацеїн (**1.6**) (джерело – *S. tanashiensis-zaomyceticus*) та Ломофунгін (**1.8**) (ґрунтовий штам *S. lomondensis*) інгібують ангіотензин-перетворюючий фермент – мішень для лікування гіпертензії, зі значенням  $IC_{50}$  рівним 0,13 та 0,16 мкМ, відповідно. Вважається, що механізм дії цих антибіотиків полягає у хелатуванні ними каталітичних йонів  $Zn^{2+}$ , а гідрофобні замісники в положенні 1 та 6 є важливими для розташування та утримання лігандів в активному сайті фермента. Ломофунгін демонструє помірну антибактерійну активність як проти грампозитивних, так і проти грамнегативних бактерій, а Фенацеїн є менш активним агентом [7-10].

Похідна монометилового естеру феназин-1,6-дикарбонової кислоти SB212021 (**1.7**) та її тіоетеровий аналог SB212305 (**1.10**), що виділені з неіндифікованого стрептоміцету, демонструють низьку антибактерійну активність, проте мають здатність інгібувати цинк залежну метало- $\beta$ -лактамазу бактерії *Bacillus cereus* подібно Фенацеїну та Ломофунгїну шляхом хелатування атому металу в активному сайті ферменту зі значеннями  $IC_{50}$  50 та 68 мкМ, відповідно [12].



сполук	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>6</sup>	тривіальна
<b>1.4</b>	COOH	H	H	COOCH <sub>3</sub>	Фенкоміцин
<b>1.5</b>	COOH	H	H	CH <sub>2</sub> OH	Мукометоксин В
<b>1.6</b>	COOH	H	ОН	ОН	Фенацеїн
<b>1.7</b>	COOH	ОН	H	COOCH <sub>3</sub>	SB212021

Рис 1.3. Антибіотики феназинового ряду.

Інша сірковмісна похідна ФКК-1 – Дифеназинтіонін (**1.11**), виділена з *S. griseus* ISP 5236, є інгібітором ліпідної пероксидації через свої потужні антиоксидантні властивості [12].

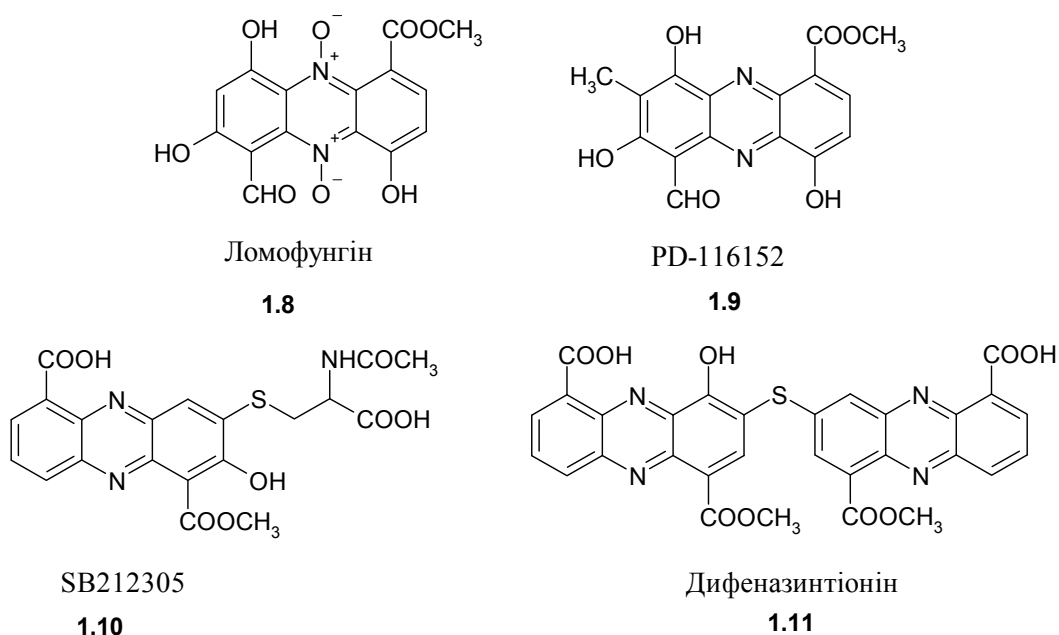


Рис 1.4. Антибіотики феназинового ряду.

Похідна ФКК-1 PD-116152 (**1.9**) демонструє високу антибактерійну активність щодо *Streptococcus pneumoniae* (МІК = 0,46 мкг/мл). Протипухлинні властивості PD-116152 досліджувалася на клітинах лімфоїдної лейкемії L1210 та аденокарциноми. Ефективність канцеростатичної дії сполуки **1.9** по відношенню до обох видів клітин характеризується значеннями EC<sub>50</sub> рівними 0,52 та

0,71 мкг/мл відповідно. Також ця сполука проявляє помірну *in vivo* активність щодо клітин лімфоїдної лейкемії P-388 [13, 14].

Похідні 6-гідроксиметил-ФКК-1 Грізіолутеїн А (1.12) та В (1.13), що виділені з *S. Griseoluteus* і демонструють антибактерійну активність щодо широкого спектру грампозитивних та грамнегативних бактерій [15-21].

Сендоміцин А (1.14) та його N,N-диметилсериновий естер Сендоміцин В (1.15), ідентифіковані у бактерії *Streptomyces endus subsp aureus*, мають широкий спектр антибіотичної дії та канцеростатичну активність [6, 22].\

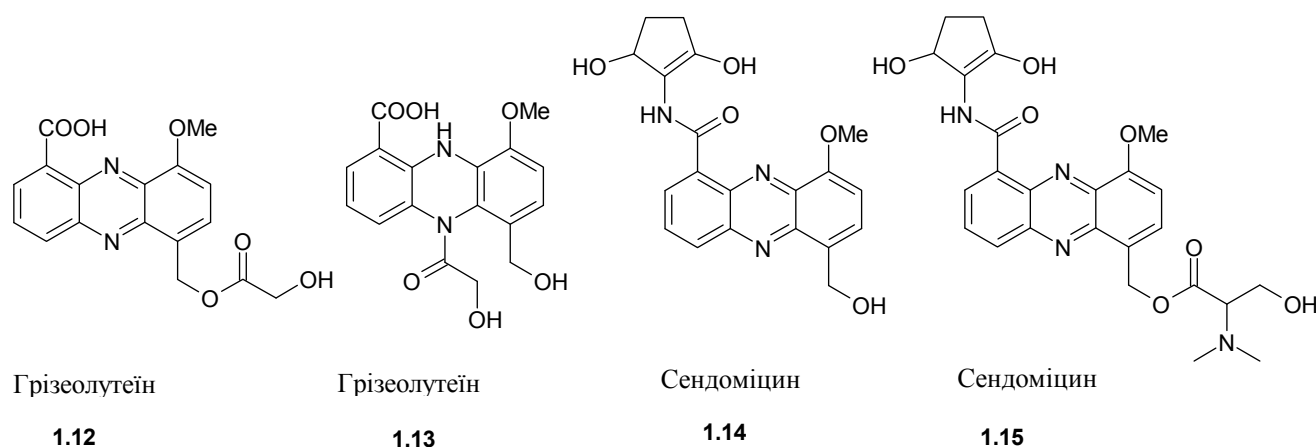


Рис 1.5. Антибіотики феназинового ряду.

Ендофеназини А-D (1.16-1.19) та Туберміцин В (1.1) були виділені з *Streptomyces anulatus* – симбіотичних мікроміцетів [23, 24]. Ендофеназини А (1.16) та D (1.19) демонструють високу антибіотичну активність щодо грампозитивних бактерій та деяких грибів, тоді як Ендофеназини В (1.17) та С (1.18) не впливають на ріст досліджуваних мікроорганізмів. Ендофеназин D (1.19) та туберміцин В (1.1) демонструють гербіцидний ефект щодо *Lemna minor* та інгібують ріст грибів *Botrytis cinerea*, проте жодна з цих сполук не пригнічує ріст грамнегативних бактерій *Agrobacterium tumefaciens* DSM 30205, *Escherichia coli* K12, *Proteus mirabilis* ATCC 35501, *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090 і *Chlorella fusca* [23, 24].

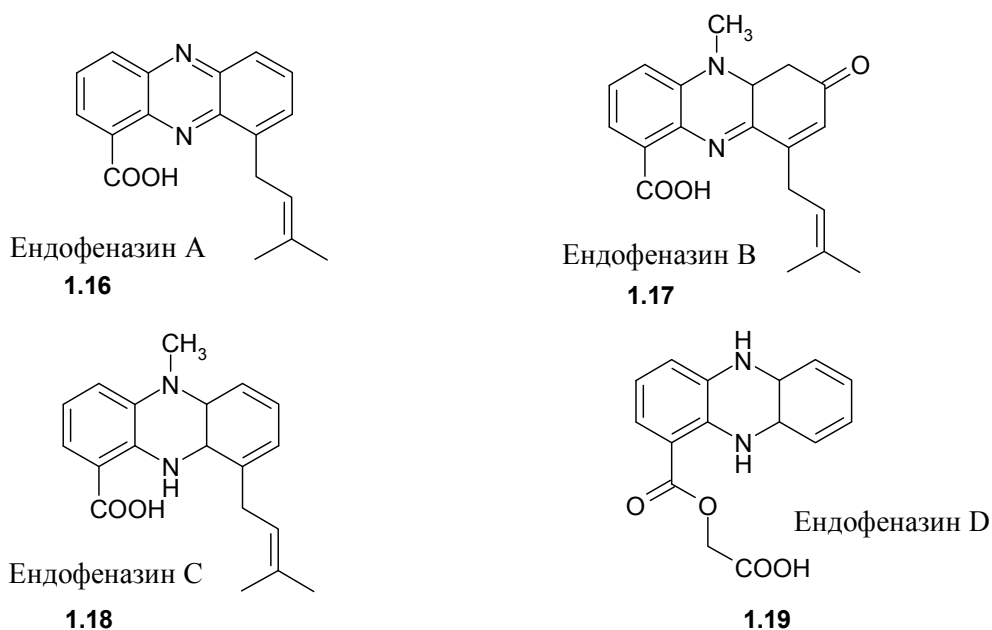


Рис 1.6 Ендофеназини А-Д.

Бентоціанін С (1.20), виділений з *S. prunicolor*, ефективно пригнічує утворення вільних радикалів і запобігає пероксидації ліпідів в мікросомах печінки пацюків зі значенням  $IC_{50} = 0,29$  мкг/мл [25, 26]. Ця активність є в понад 40 разів вищою за активність вітаміну Е. Також повідомляється, що Бентоціанін С (1.20) інгібує гемоліз еритроцитів пацюків зі значенням  $IC_{50} = 1,3$  мкг/мл [27].

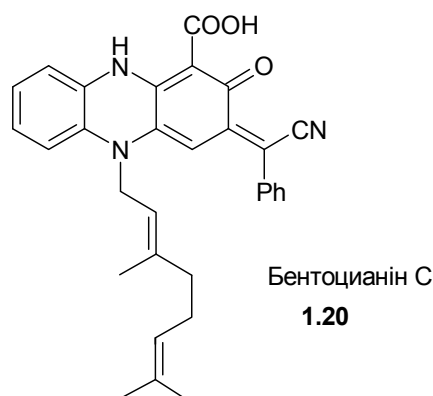


Рис 1.7. Бентоціанін С.

Сафенова кислота – 6-(1-гідроксиетил)-ФКК-1 (1.21) присутня серед метаболітів різних штамів *Streptomyces* [17]. Скелетон сафенової кислоти входить до структур монофеназинових похідних 1.22-1.24, яким притаманна антибіотична активність, та до структур ди-феназинів 1.25-1.27 з антиоксидантною дією. Бактерія *S. antibioticus* продукує сафенову кислоту (1.21), її метиловий естер, 6-



ацетил-ФКК-1, набір різних естерів сафенової кислоти з жирними кислотами та Сафенаміцин (**1.24**) [28]. Останній був ізольований також з *S. canaries* та демонструє високу антибіотичну активність, особливо щодо грампозитивних бактерій (МІК < 0,35-0,001 мкг/мл), вибірково канцеростатичну дію та ряд інших видів біологічної активності [17, 28, 29]. Естер сафенової кислоти DC-86-M (**1.22**), виділений з ґрунтових штамів *C. luteogriseus*, демонструє високу активність проти грампозитивних і слабку – проти грамнегативних бактерій (МІК < 0,3-0,1 та 100-25 мкг/мл, відповідно), та помірну протипухлинну дію [30, 31].

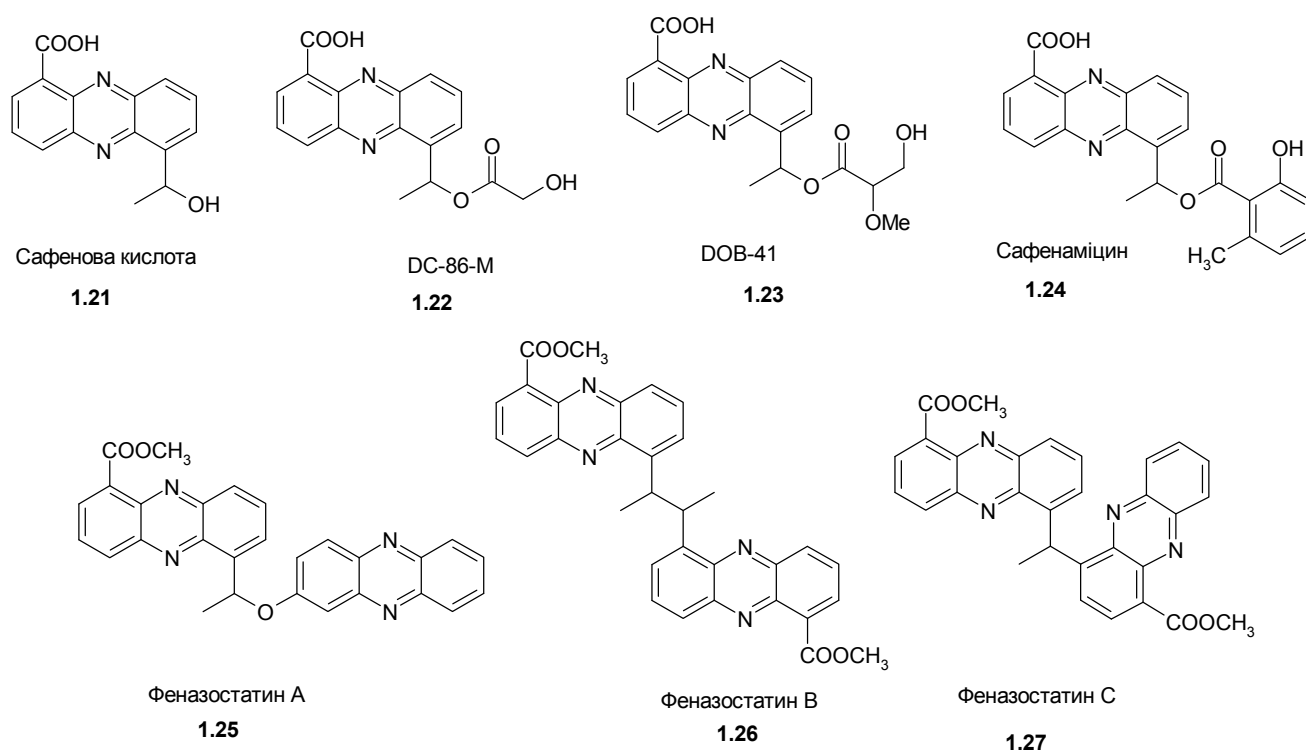


Рис 1.8. Сафенова кислота та її похідні.

Похідна ФКК-1 DOB-41 (**1.23**), виділена з ґрунтових бактерій, демонструє високу активність проти низки досліджуваних грампозитивних мікроорганізмів (МІК = 0,78-0,1 мкг/мл) і помірковану активність, щодо лімфоїдної лейкемії P388 [32].

Феназостатини А, В і С (**1.25-1.27**), що виділені із *Streptomyces sp.* 833, активно пригнічують утворення вільних радикалів та захищають нервові клітини від глутаматної токсичності без жодних цитотоксичних ефектів. Слід зазначити, що рівень протекторної дії феназостатинів А, В і С є вдвічі вищим, ніж у

Ідебенону, що застосовується для захисту мозку, наприклад, при старечій розумовій відсталості. Також Феназостатини демонструють антиоксидантну активність, у деяких випадках, значно вищу, ніж вітамін Е. Феназостатин В (**1.26**) є інгібітором ензиму фосфодіестерази [33-35].

Вуглеводовмісні природні похідні ФКК-1 є дуже рідкісними вторинними метаболітами. Виявлені представники даного класу сполук є похідними 6-дезоксид-глюкопіранози. Із *Streptomyces sp.* були виділені 2-О- та 3-О-(6-дезоксид- $\alpha$ -L-глюкопіранозил)-естери сафенової кислоти (**1.28**, **1.29**, відповідно) у суміші  $\alpha$ - та  $\beta$ -аномерів. Зазначені сполуки демонструють помірну активність щодо широкого спектру грамнегативних та грампозитивних бактерій, проте цитотоксичної та протипухлинної дії у них не виявлено [36].

Інша низка вуглеводовмісних природних похідних ФКК-1 (6-дезоксид- $\alpha$ -L-глюкопіранозидові естери) – Аестівофоеніни А, В та С (**1.30-1.32**) та Феназовіридин (**1.33**). Феназовіридин (**1.33**), що виділений з *Streptomyces sp. HR04*, був першим глюкоконьюгованим феназином з антиоксидантною активністю. Він демонструє високу інгібувальну активність пероксидації жирів у гомогенаті мозку пацієнтів, вищу, аніж для відомих антиоксидантів (вітамін Е та С), а також значну захисну активність проти гострої гіпоксії у мишей [37].

Аестівофоеніни **1.30-1.32**, ізолювані з *S. purpeofuscus*, демонструють антиоксидантну активність та протекторну функцію нервових клітин через інгібування L-глютаматної токсичності [38].

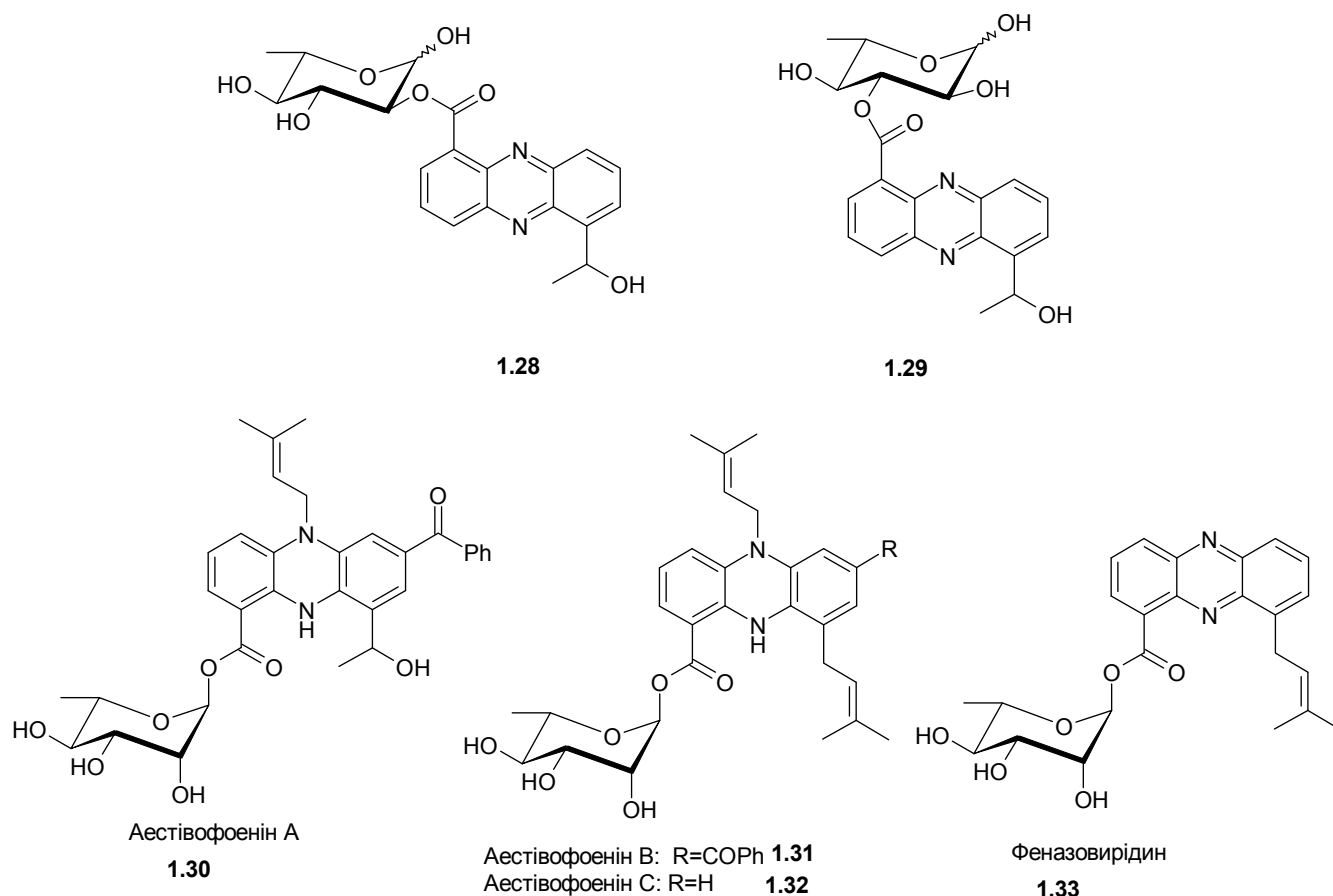


Рис 1.9. Вуглеводовмісні похідні ФКК-1.

Амінокислотні естери Грізеолутеїнової кислоти (1.34-1.36) – Пелагіоміцини А-С виділені з морських грамнегативних бактерій *Pelagibacter variabilis*, зібраних з макроводоростей. 3-гідроксивалінова похідна – пелагіоміцин А (1.34) проявляє значну антибіотичну активність щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій (МІК < 5,2-0,05 мкг/мл), однак дріжджі виявилися нечутливими до нього. Пелагіоміцин А також демонструє канцеростатичний ефект на лініях клітин *HeLa*, *BALB3T3*, та *BALB3T3/H-ras* зі значеннями  $IC_{50}$  у межах від 0,7 до 0,04 мкг/мл та слабку інгібувальну дію щодо лейкемії P388 [39].

Пелагіоміцин А (1.34) демонструє активність в 40 разів вище за Грізеолутенову кислоту (1.37), що вказує на те, що амінокислотне заміщення може бути важливим для проникнення сполуки через клітинну мембрану. Жодне з похідних Грізеолутеїнової кислоти не демонструє зв'язування з ДНК, проте вони інгібують синтез ДНК, РНК та білків. Цитотоксична та протипухлинна активність Пелагіоміцину А спостерігається *in vitro* та *in vivo*. Він є слабоактивним та

високотоксичним [39, 40]. D-Аланілгрізеолутеїнова кислота (**1.38**) демонструє антибіотичну активність проти грампозитивних та грамнегативних бактерій, в тому числі патогену *Erwinia* [41].

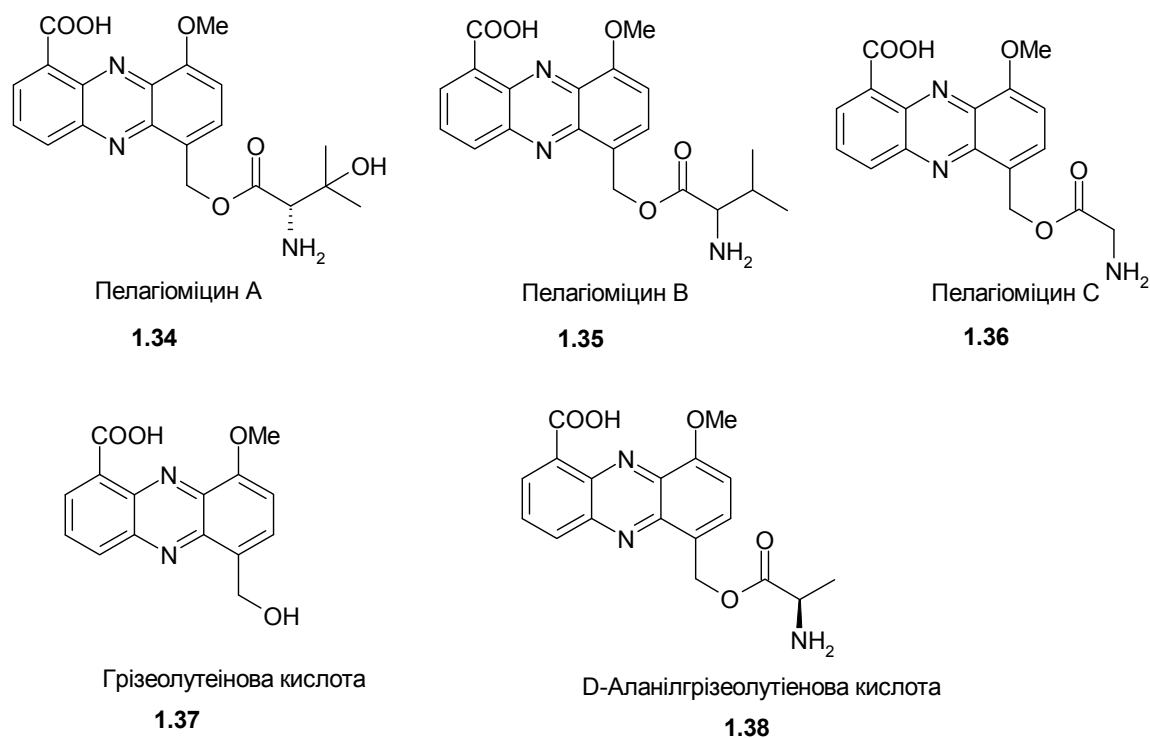


Рис 1.10. Антибіотики феназинового ряду.

### 1.1.2. Біологічна активність синтетичних похідних ТГКК

Відома значна кількість синтетичних похідних ТГКК, яка фактично повністю представлена їхніми карбоксамідами.

На рис. 1.11 Зображено загальну структуру похідних ТГКК, де виділені ключові положення, заміщення яких може суттєво впливати на біологічну активність отриманих сполук.

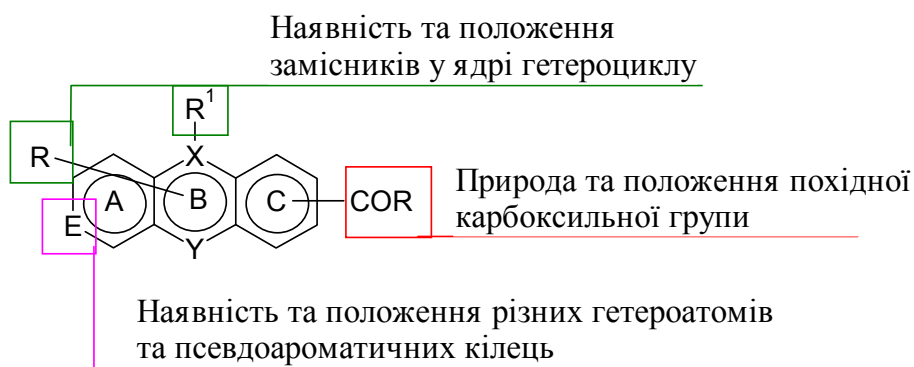


Рис. 1.11. Зображення ключових фрагментів, від яких залежить тип та ефективність біологічної активності похідних ТГКК.

Положення, сполучення і природа атомів Y, X, E визначають тип гетерооснови, а наявність карбоксильної групи – їхню приналежність до ТГКК.

Природні поліциклічні гетероароматичні сполуки, та їхні синтетичні аналоги, у тому числі і карбонові кислоти та їхні похідні, як правило мають множинну біологічну активність. Похідні феназин-1-карбонової кислоти, проявляють як протипухлинну [42-45], так і антибактерійну [46], у тому числі антимікобактерійну [47] активність. Похідні актидон-4-карбонової кислоти демонструють протипухлинні [48-50] та противірусні властивості, у тому числі є ефективними інгібіторами реплікації вірусу гепатиту С [51-53].

Широкі дослідження проводилися відносно протипухлинної активності похідних ТГКК.

Дослідження протипухлинної активності карбоксамідних похідних ТГКК (**1.I**) на широкому спектрі пухлинних ліній проводилися групою новозеландських вчених з Оклендського університету на чолі з William A. Denny. [54, 55]. Скринінг бібліотеки карбоксамідів ТГКК виявив, що найбільш ефективним амідним фрагментом є N,N-диметилетиленамід (**1.II**), рис. 1.12. Протипухлинну дію амідів ТГКК автори пов'язують із їхньою здатністю взаємодіяти з ДНК, ефективність якої, вірогідно, залежить від структури карбоксамідного фрагменту. У такий спосіб сполуки блокують функціонування топоізомераз I/II, що і обумовлює пригнічення проліферації або загибель пухлинних клітин [56].

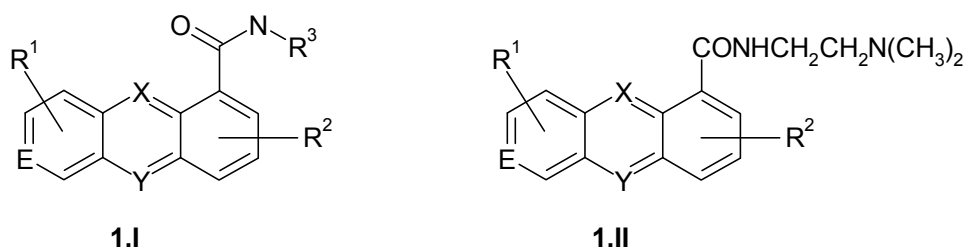


Рис. 1.12. Найбільш вживана модифікація карбоксильної групи серед похідних ТГКК, що проявляють протипухлинну активність.

Структурно-функціональний аналіз біологічної активності карбоксамідів ТГКК виявив її значну залежність від положення карбоксамідного фрагменту у центральному гетероциклі. Для симетричних ТГКК таких, як ФКК-1 (рис. 1.13.А), є лише два різних положення, а для сполук, структура яких представлена на рис. 1.13.Б, таких положень чотири.

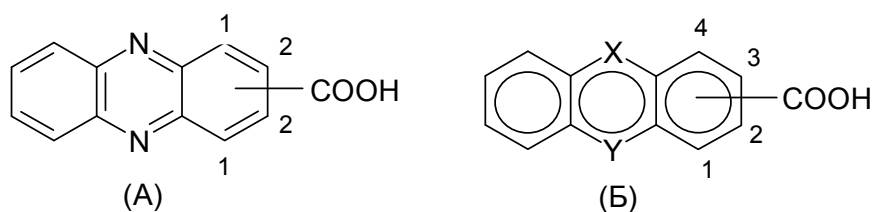
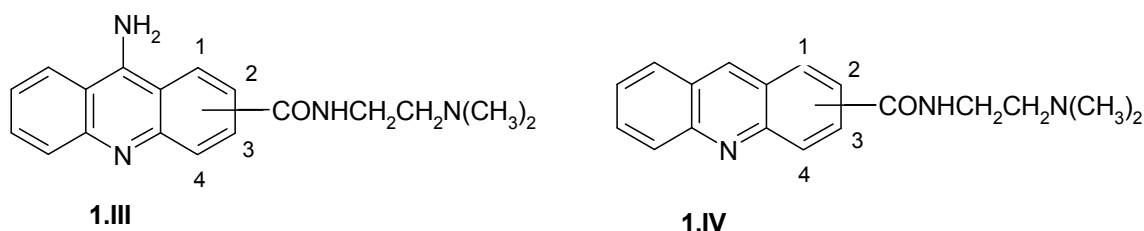


Рис. 1.13. Положення карбоксильної групи в симетричних і не симетричних ТГКК.

Залежність протипухлинної активності від положення карбоксамідного фрагменту досліджувалася для 9-аміноакридинового (1.III) та акридинового гетероциклов (1.IV), рис. 1.14 [57, 58]. Показано, що найактивнішим є «4» так зване «пері-положення» карбоксамідної групи. Сполуки, що містять карбоксамідну групу у положеннях 1 - 3, не проявляють протипухлинної дії, тоді як 4-карбокаміди демонструють високу протипухлинну активність.



положення аміду	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210	положення аміду	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210
1	>2000	1	17900
2	>2000	2	9300
3	>2000	3	8100
4	15	4	105

Рис. 1.14. Залежність протипухлинної активності від положення N,N-диметилетиленкарбоксаміду для 9-аміноакридинового та акридинового гетероциклів.

Автори дослідження вважають, що така залежність активності від розташування карбоксильної групи пов'язана з утворенням внутрішньо молекулярного Н-зв'язку (рис. 1.15), який може стабілізувати положення молекули в біологічній мішені, а також завадити протонуванню атому азоту, що буде сприяти проникненню речовин через мембрану клітини.

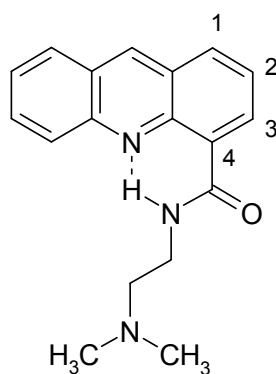
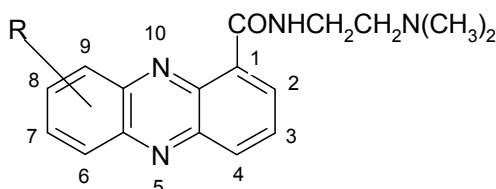


Рис. 1.15. Утворення внутрішньо-молекулярного Н-зв'язку між амідним протоном та циклічним атомом нитрогену, при «пері» положенні карбоксамідної групи.

Дослідження впливу природи та положення замісників на протипухлинну активність амідів феназин-1-карбонової кислоти показали, що заміщення у положення 9 збільшує активність сполук у більш ніж 100 разів у порівнянні з

незаміщеними карбоксамідами ФКК-1 (рис. 1.16) [56]. Модифікація положення 3 збільшує активність лише в 10 разів, а введення замісників в інші положення, або не впливає на активність, або збільшує її мінімально. Найефективнішим, в більшості випадків, виявилось введення метильної групи та атома хлору [56].



положення замісника	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210	положення замісника	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210	положення замісника	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210
H	1400	4-OMe	550	8-Me	630
2-OMe	1620	6-Me	820	8-OMe	1150
2-Cl	14900	6-OMe	5000	8-Cl	670
3-Me	410	6-Cl	780	9-Me	42
3-OMe	830	7-Me	1500	9-OMe	48
3-Cl	160	7-OMe	410	9-Cl	11
4-Me	400	7-Cl	1140		

Рис. 1.16. Протипухлинна активність N,N-диметилетиленамідів заміщеної ФКК-1.

Структурні аналоги (**1.V** та **1.VI**) активного аміді ФКК-1 (**1.VII**), рис. 1.17, не демонструють протипухлинної активності. Також показано, що введення об'ємних замісників (NHPh, чи OPh) в положення 9 ФКК-1 значно зменшує протипухлинну активність N,N-диметилетиленаміді ФКК-1 [45].

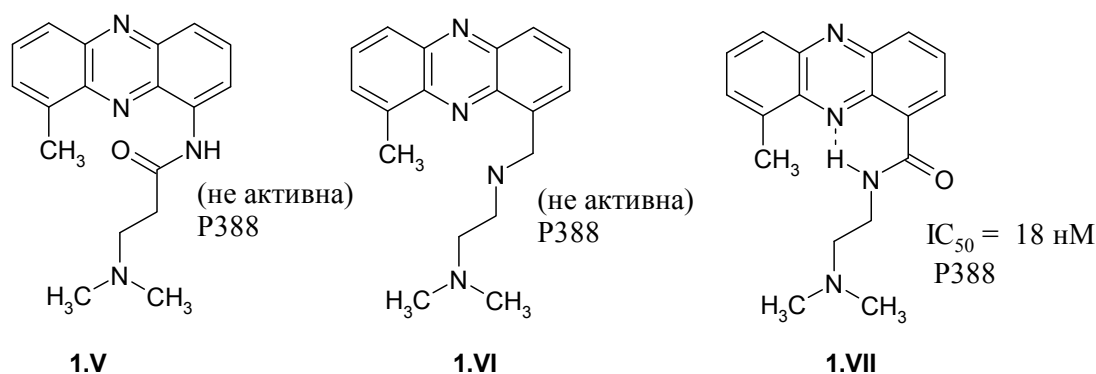
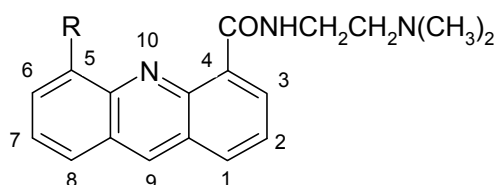


Рис. 1.17. Вплив модифікації карбоксамідної групи на протипухлинну активність феназінів.



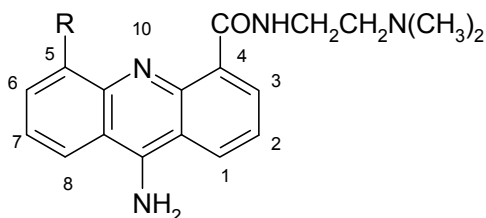
Схожа ситуація спостерігається для амідів акрідин-4-карбонової кислоти, рис 1.18 [57]. Карбоксаміди із замісниками у положеннях 1 і 2 демонструють помірну протипухлинну дію. Найефективнішою виявилася функціоналізація положення 5, що є аналогічним положенню 9 у ФКК-1. Активність таких сполук зростає у понад 15 разів у порівнянні з незаміщеним аналогом. Протипухлинна дія карбоксамідів із замісниками у положенні 6 значно залежить від природи замісника.



положення замісника	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210	положення замісника	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210	положення замісника	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210
H	105	3-Me	12700	7-Me	200
1-Me	37	5-Me	4,3	7-OMe	640
1-OMe	8,8	5-OMe	12	7-Cl	250
1-Cl	33	5-Cl	6,9	8-Me	140
2-Me	130	6-Me	121	8-OMe	158
2-OMe	30	6-OMe	210	8-Cl	160
2-Cl	31	6-Cl	6,4	9-Me	150

Рис. 1.18. Протипухлинна активність N,N-диметилетиленамідів заміщеної акрідин-4-карбонової кислоти.

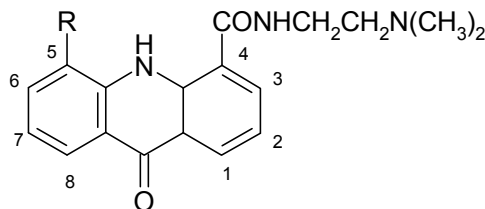
У випадку 9-аміноакрідинового гетероциклу, найефективнішим є заміщення в положення 5, рис. 1.19 [59].



положення замісника	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210	положення замісника	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210	положення замісника	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210
H	15	5-Me	0,47	7-Me	605
1-OMe	0,55	5-OMe	4,3	7-OMe	670
1-Cl	4,8	5-Cl	2,9	7-Cl	722
2-Me	590	6-Me	55	8-Me	340
2-OMe	2,9	6-OMe	15	8-OMe	220
2-Cl	300	6-Cl	105	8-Cl	250
3-OMe	300				

Рис. 1.19. Протипухлинна активність N,N-диметилетиленамідів заміщеної 9-аміноакридин-4-карбонової кислоти.

Така сама залежність протипухлинної активності сполук спостерігається і для карбоксамідного похідного акридон-4-карбонової кислоти, рис. 1.20 [48].

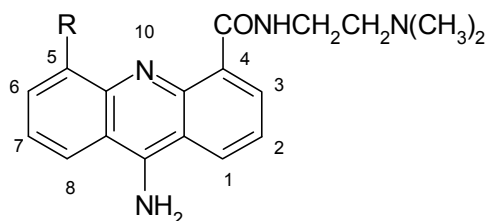


положення замісника	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210	положення замісника	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210	положення замісника	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210
H	1700	2-NO <sub>2</sub>	910	6-NO <sub>2</sub>	1200
1-NO <sub>2</sub>	550	5-NO <sub>2</sub>	83	7-NO <sub>2</sub>	3500

Рис. 1.20. Протипухлинна активність N,N-диметилетиленамідів заміщеної акридон-4-карбонової кислоти.

Цікаві результати отримано при дослідження впливу замісників на протипухлинну активність N,N-диметилетиленамідів 9-аміноакридин-4-карбонової кислоти, рис. 1.21 [60]. Положення 5 у карбоксамідах виявилося

унікальним. Всі 5-заміщені похідні незалежно від природи замісника продемонстрували *in vivo* антілейкемічну дію, а ті, які мають електронно-акцепторні замісники показали активність *in vivo* і на солідній пухлині легень Льюїса.



положення замісника	EC <sub>50</sub> , nM, L1210	положення замісника	EC <sub>50</sub> , nM, L1210	положення замісника	EC <sub>50</sub> , nM, L1210
H	15	5-OMe	4,3	5-NO <sub>2</sub>	1,6
5-CH <sub>3</sub>	0,47	5-OPr	3,3	5-NH <sub>2</sub>	18
5-Ph	1,1	5-F	1,4	5-CF <sub>3</sub>	5,7
5-Ph-п-NO <sub>2</sub>	3,6	5-Cl	2,9	5-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2,8
5-Ph-п-NH <sub>2</sub>	5,5	5-Br	2,5	5-CN	0,9

Рис. 1.21. Протипухлинна активність N,N-диметилетиленамідів 9-аміноакрідин-4-карбонової кислоти заміщеної в положення 5.

Дослідження впливу природи і положення додаткового гетероатома у центральному на протипухлинну активність здійснювали для карбоксамідів акрідин-1-карбонової та акридон-4-карбонової кислот [48]. Виявилося, що введення атомів нітрогену в різні положення гетероциклу негативно впливає на протипухлинну активність сполук. На думку авторів додаткове протонування молекули може призводити до зменшення здатності проникнення сполук через клітинну мембрану. Однак введення замісника в «пері» положення таких сполук, значно підвищує їхню протипухлинну активність.

$R = \text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$

Гетероцикл	$EC_{50}$ , нМ, L1210	Гетероцикл	$EC_{50}$ , нМ, L1210	Гетероцикл	$EC_{50}$ , нМ, L1210
I	1700	V	>40000	VIII	830
II	5500	VI	105	IX	12300
III	>40000	VII	490	X	4400
IV	>40000				

Рис. 1.22. Протипухлинна активність N,N-диметилетиленамідів акридон-4-карбонової та акрідин-1-карбонової кислот з додатковим атомом нітрогену в центральному гетероциклі.

У наступній роботі тих самих авторів визначалася залежність протипухлинної активності карбоксамідів ТГКК від структури корового гетероциклу [50]. Необхідними умовами для відтворення біологічної дії є наявність компланарного хромофору для взаємодії з ДНК та присутність атому оксигену або ароматичного нітрогену у «пері-положенні» до карбоксаміду. Найбільш ефективними гетероциклами, за їхніми даними, виявилися акрідин (I), та оксантрен (IX), рис. 1.23.

$R = \text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$

Гетероцикл	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210	Гетероцикл	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210	Гетероцикл	EC <sub>50</sub> , нМ, L1210
I	15	VI	6300	XI	>22000
II	150	VII	6500	XII	4500
III	150	VIII	1600	XIII	4400
IV	150	IX	14	XIV	4000
V	1700	X	>22000		

Рис. 1.23. Протипухлинна активність N,N-диметилетиленамідів різних ТГКК.

Спираючись на аналіз літературних даних можна зробити висновок, що на рівень протипухлинної дії похідних ТГКК впливає, насамперед, положення карбоксамідного фрагменту та природа корового гетероциклу. У свою чергу, замісники корового гетероциклу, особливо у «пері» положенні, здатні ефективно підвищувати протипухлину активність базової сполуки.

Інформація щодо антибактерійних та противірусних властивостей синтетичних похідних КТКК досить обмежена.

Синтетичні ариламіді незаміщеної ФКК-1 (рис. 1.24) демонструють достатньо ефективне пригнічення ряду патогенних бактеріальних культур, а саме: *Micrococcus sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *S. Aureus* [46].

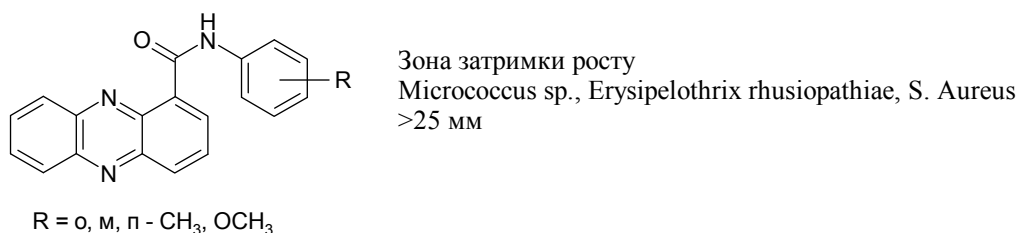


Рис. 1.24. Антибактерійна активність ариламідів ФКК-1.

Серія ариламідів ФКК-1 досліджувалася проти дикого штаму *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* та ряду її резистентних штамів [47]. Ефективність зазначених сполук за показниками МІК спостерігалася на рівні відомих протитуберкульозних препаратів ізоніазиду та рифампіцину. Найефективнішими виявилися ариламіди ФКК-1 з трифлуорометильною групою у різних положеннях ариламідного фрагменту (рис. 1.25.), до яких були чутливими майже всі досліджувані штами *M. Tuberculosis*.

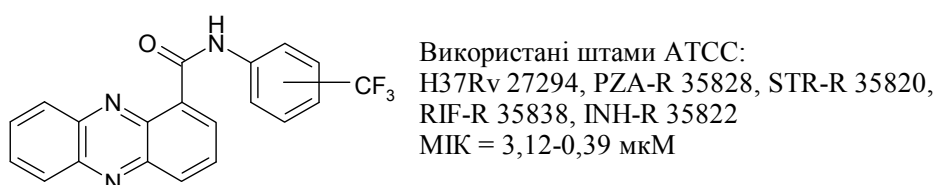


Рис. 1.25. Антимікобактерійна активність ариламідів ФКК-1.

Слід підкреслити, що антимікобактерійна активність представлених ариламідів ФКК-1 значно перевищує таку для вихідної ФКК-1.

Автори дослідження вважають, що однією з мішеней для цих сполук можуть бути бактерійні РНК-синтезувальні комплекси, так як ариламіди ФКК-1 достовірно інгібують синтез РНК в системі транскрипції на основі ДНК-залежної РНК-полімерази фагу Т7 (РНКП Т7) *in vitro*.

Для амідів акридон-4-карбонової кислоти (рис. 1.26) досліджувалася активність щодо вірусу гепатиту С (ВГС) [52].

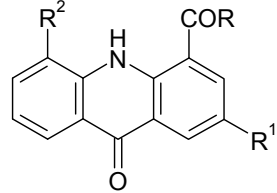
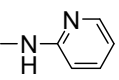
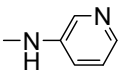
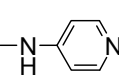
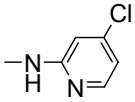
Показано, що ариламіди акридон-4-карбонової кислоти ефективно блокують функціонування реплікону ВГС. Високу активність проявляють піриламіди, а найефективнішим у цій серії виявився ортопіридиламід – сполука XII (рис. 1.26) за відсутності значної токсичності.

№	EC <sub>50</sub> , мкМ (XTI)	№	EC <sub>50</sub> , мкМ (XTI)	№	EC <sub>50</sub> , мкМ (XTI)
I	>100 (-)	VI	>100 (-)	XI	11,1 (3,5)
II	5,6 (1)	VII	12,9 (7,1)	XII	10,2
III	14,9 (5,2)	VIII	>100 (-)	XIII	4,3 (2,4)
IV	>100 (-)	IX	9,0	4'-azacitidine	1,4
V	>100 (-)	X	6,5 (1,1)		

Рис. 1.26. Антигепатитна активність амідів акридон-4-карбонової кислоти.

Продовження цих досліджень стосувалося заміщення корового гетероциклу [53]. З'ясувалося, що малі замісники у пері положенні (рис. 1.27), як і у випадку протипухлинної активності, збільшують активність, тоді як об'ємні замісники негативно впливають на ефективність інгібіторної дії сполук.

Однак у даному випадку більш значний вплив на активність мав якісний склад карбоксаміду, а не заміщення в акридоновому циклі, що говорить про ключову роль карбоксамідного фрагменту в інгібуванні реплікації ВГС цим класом речовин.

	№	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R	R=
	I	H	OMe	a	a) 
	II	H	OMe	б	б) 
	III	H	OMe	г	в) 
	IV	Cl	OMe	а	г) 
	V	Cl	OMe	б	
	VI	Cl	OMe	г	
	VII	F	OMe	а	
	VIII	F	OMe	б	
	IX	F	OMe	г	
	X	H	OCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	в	

№	EC <sub>50</sub> , мкМ (XTI)	№	EC <sub>50</sub> , мкМ (XTI)	№	EC <sub>50</sub> , мкМ (XTI)
I	2,3 (1,1)	V	0,96 (20)	IX	>100 (-)
II	3,5 (>38)	VI	>100 (-)	X	>100 (-)
III	>100 (-)	VII	>100 (-)	4'-azacitidine	1,4 (>200)
IV	5 (3,2)	VIII	0,98 (>1000)	ribavirin	17,6 (60)

Рис. 1.27. Анти ВГС активність піридиламідів заміщеної акридон-4-карбонової кислоти.

Автори обох досліджень продемонстрували, що однією з можливих мішеней для обох серій похідних акридон-4-карбонової кислоти є вірусна геліказа, що відповідає за релаксацію молекул вірусної РНК, і за своєю функцією подібна топоізомеразам I/II, інгібування яких зумовлює протипухлинну активність сполук.

Іншою ймовірною мішенню цього класу ТГКК може бути вірусна РНК-залежна РНК-полімераза NS5b. Здатність інгібувати синтез РНК для акридон-4-арилкарбоксамідів, як і для серії феназин-1-арилкарбоксамідів, досліджувалася у модельній системі транскрипції на основі РНКП T7. Показано, що ариламиди незаміщеної акридон-4-карбонової кислоти ефективно інгібують процес транскрипції. Таким чином можна передбачати, що інгібувальна дія і інших похідних ТГКК може бути пов'язана з інгібуванням РНК-реплікативних комплексів, що може призводити до різних видів біологічної активності такого класу сполук.



## 1.2. Синтез похідних ТГКК

Систематизувати підходи до синтезу ТГКК доволі важко адже для їхнього синтезу використовують методи, що включають різні шляхи. Так введення карбоксильної групи може відбуватися, як до створення трициклічної системи так і після формування центрального гетероциклу. Сама трициклічна система може бути створення з виділенням проміжної сполуки (з двома моно циклічними фрагментами), так і прямим синтезом трициклічного остову. «Бокові» та «центральне» кільця можуть бути ароматичними під час створення трициклічної системи, або ж «ароматизуватися» після її створення. Також самі трициклічні системи можуть піддаватися модифікаціям, таким як окиснення чи декарбоксилювання, для синтезу шуканих сполук. На рис. 1.28 представлена загальна структура ТГКК і ключові точки від яких залежать підходи до синтезу того чи іншого гетероциклу.

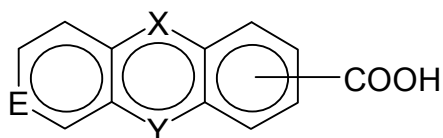


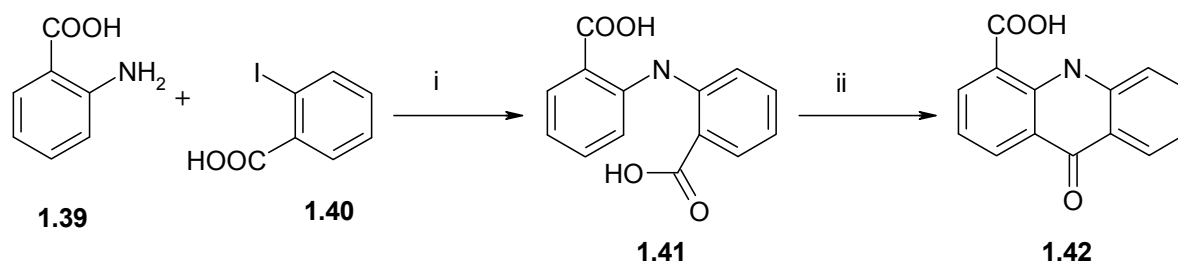
Рис. 1.28. Загальна структура ТГКК.

Розглянемо приклади використання різних підходів для синтезу ТГКК. Спочатку розберемо підходи в яких трицикл синтезується з карбоксильною групою, одночасно розглянемо різні методи побудови трициклічних систем.

В залежності від методології побудови гетероароматичного остову можна виділити два підходи до синтезу таких трициклічних сполук:

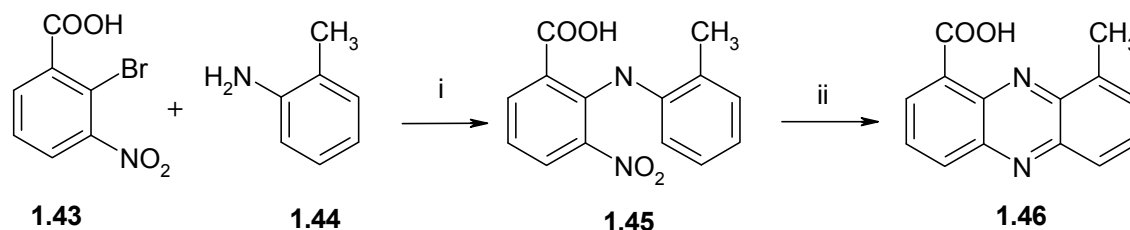
1) Двохстадійний процес з виділенням проміжної сполуки. В свою чергу в залежності від моменту введення атому «Y»:

1.1) Введення мостикового атому «Y», на першій стадії – стадії утворення проміжного продукту, як було проведено для синтезу акридон-1-карбонової кислоти (**1.42**), схема 1.1 [60]. Такий самий підхід використовувався для синтезу 9-метилфеназин-1-карбонової кислоти **1.20** (схема 1.2 [56]), та під час синтезу метилового естеру акрідин-1-карбонової кислоти **1.53** (схема 1.3 [61]).



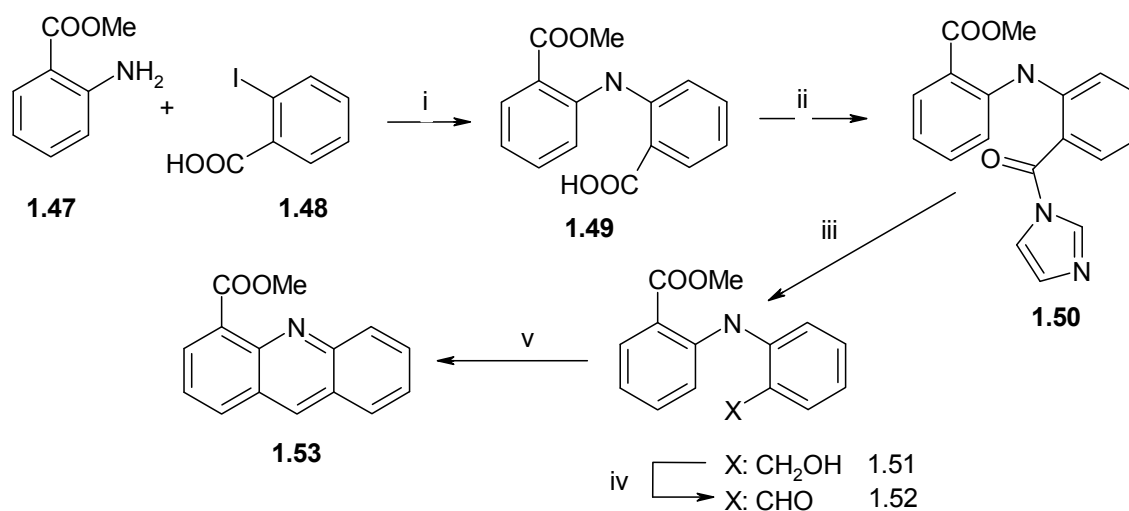
(i) Cu, CuI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ДМСО, 110 °С, 1 год.; (ii) ПФК, 100 °С, 1 год.

Схема 1.1. Синтез акридон-1-карбонової кислоти (1.42).



(i) Cu, CuCl, N-етилморфолін, бутан-2,3-діол, 70 °С, 15 год.; (ii) NaBH<sub>4</sub>, EtOH, Na, кип. 1 год.

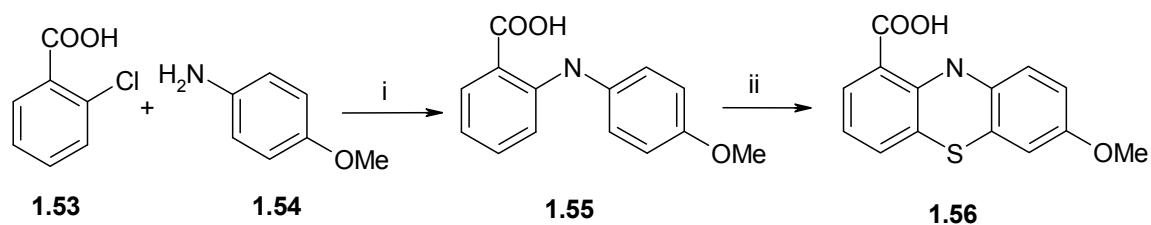
Схема 1.2. Синтез феназин-1-карбонової кислоти (1.46).



(i) CuI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ДМСО, 110 °С, 1 год.; (ii) КДІ, ТГФ, 20 °С, 15 год.; (iii) NaBH<sub>4</sub>, Н<sub>2</sub>О, 20 °С, 30 хв; (iv) MnO<sub>2</sub>, Me<sub>2</sub>CO, кип. 18 год.; (v) CF<sub>3</sub>COOH, 20-40 °С, 15 год., N<sub>2</sub>.

Схема 1.3. Синтез метилового естеру акрідин-1-карбонової кислоти (1.53).

1.2) Введення атому «Y», на стадії утворення гетеротрициклу, як було проведено для синтезу 7-метоксифенотіазін-4-карбонової кислоти (1.56), схема 1.4 [62].

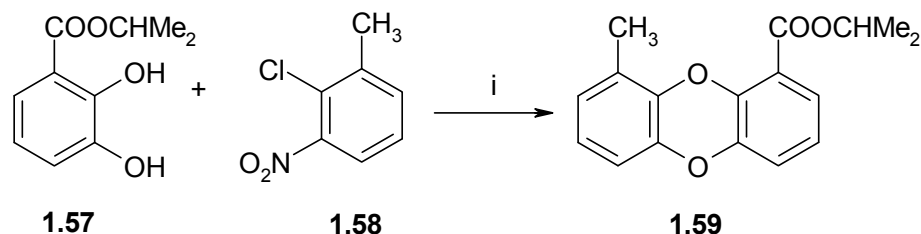


(i)  $\text{Cu}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , ДМФА, 100 °С, 1 год.; (ii) S,  $\text{I}_2$ , ДМФА, 80 °С, 3 год.

Схема 1.4. Синтез 7-метоксифенотіазін-4-карбонової кислоти (**1.56**)

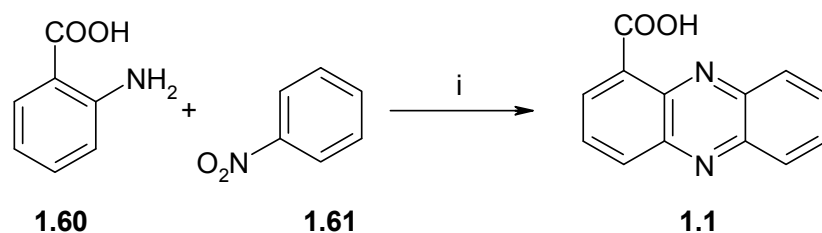
Слід відзначити, що при такому підході до синтезу трициклічної системи, зв'язувальні атоми «Х» та «Y» спочатку знаходяться у вихідних моноциклічних сполуках.

2) Одностадійний процес, без виділення проміжної сполуки. При даній схемі синтезу зв'язувальні атоми «Х» та «Y», можуть бути як в одній початковій сполуці, так і в різних. Так при синтезі ізопропілового естеру 9-метилдіоксин-1-карбонової кислоти (**1.59**) (схема 1.5) [63] такі гетероатоми знаходилися в одному моноциклі, тоді як під час синтезу феназин-1-карбонової кислоти (**1.1**) (схема 1.6) [64] мостикові гетероатоми знаходилися в різних моноциклічних попередниках.



(i) NaH, ТГФ, ГМФА, 100 °С, 4 год.

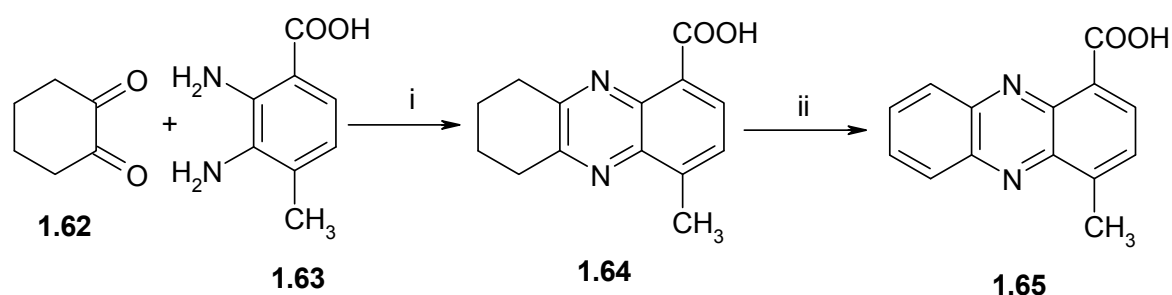
Схема 1.5. Синтез ізопропілового естеру 9-метилдіоксин-1-карбонової кислоти (**1.59**).



(i) ксилол, КОН, кип. 15 год.

Схема 1.6. Синтез феназин-1-карбонової кислоти (**1.1**).

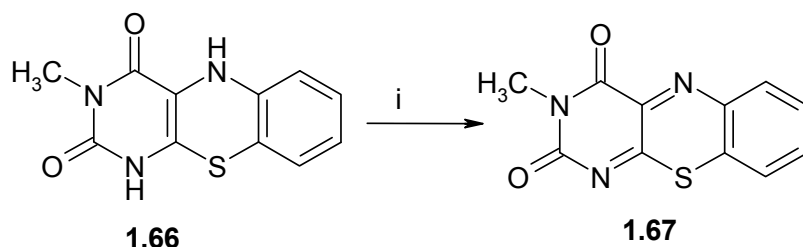
Часто при синтезі трициклічних систем використовуються методи, які полягають у модифікації одного циклу іншим. Так одним з основних шляхів модифікації є ароматизація. Саме такий підхід був використаний для синтезу 4-метилфеназин-1-карбонової кислоти (**1.65**) (схема 1.7), де був ароматизований боковий гетероцикл [42].



(i) MeOH, кип. 15 хв; (ii) 1,2-дихлорбензен, Pd/C, кип. 2 дні.

Схема 1.7. Синтез 4-метилфеназин-1-карбонової кислоти (**1.65**).

Ароматизації можуть піддаватися не лише бокові цикли, а і центральний. Саме такий підхід був використаний для синтезу N-метилпіримідинобензотіазину (**1.67**), схема 1.8 [65].

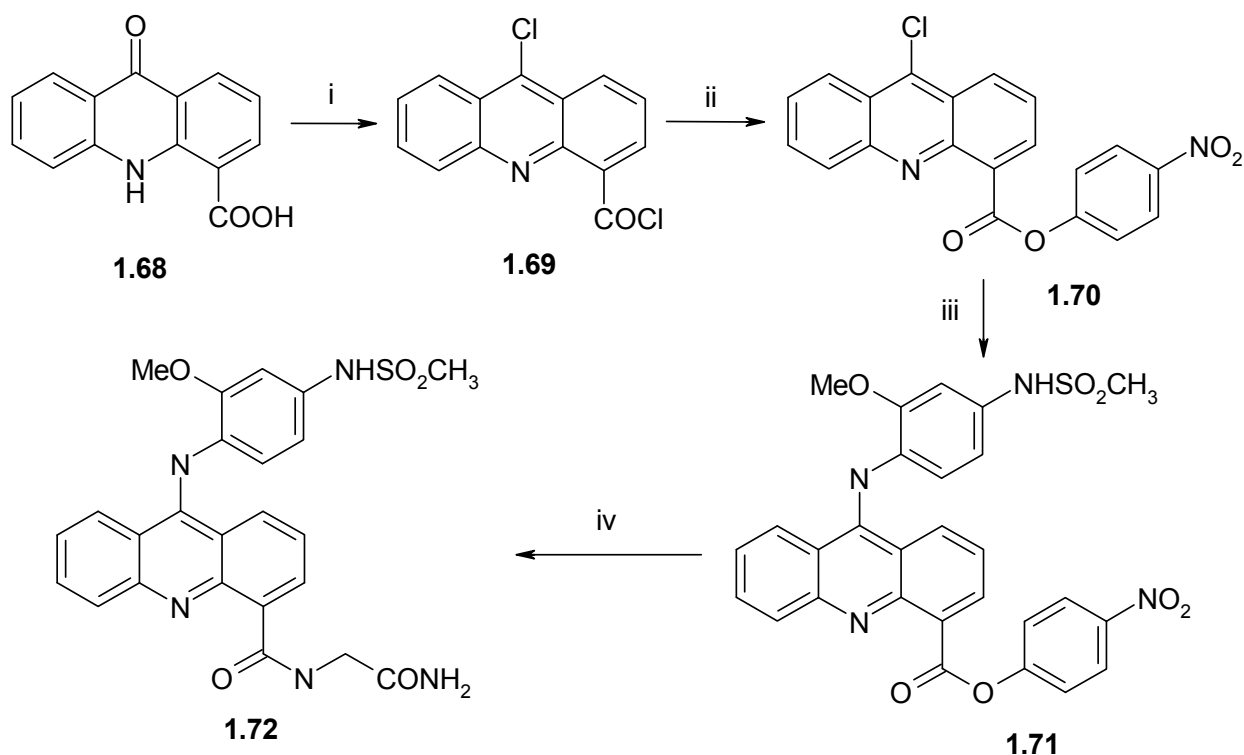


(i) Ацетонітрил, диетилазодикарбоксилат, 40-60 °С, 3 год.

Схема 1.8. Синтез N-метилпіримідинобензотіазину (**1.67**).

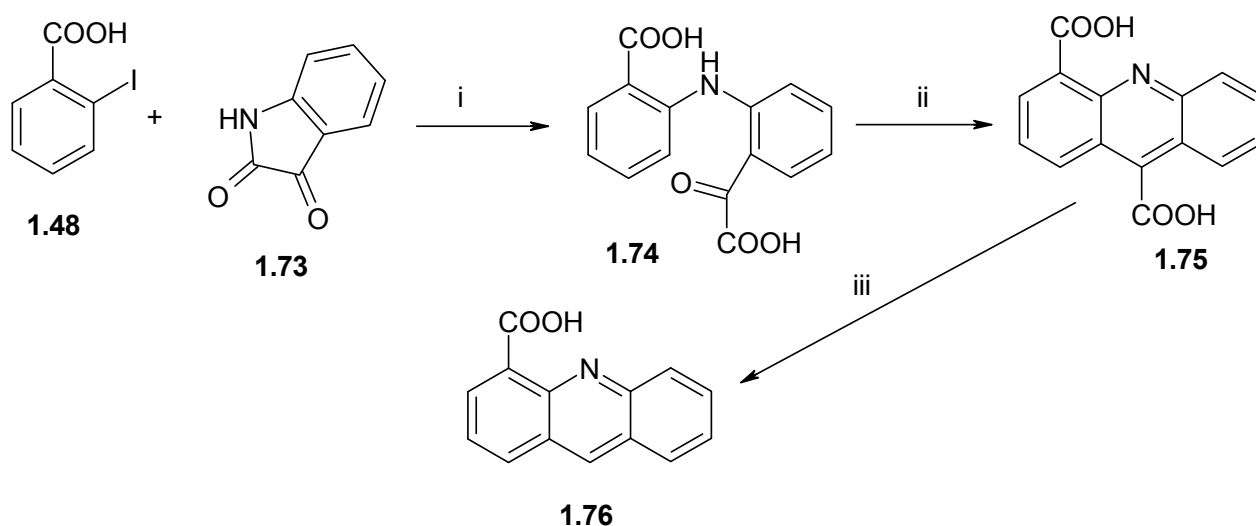
Також ароматизацію центрально гетероциклу застосовували для синтезу заміщеного N-заміщеного аміду 9-аміноакрідин-1-карбонової кислоти (**1.72**), схема 1.9 [66].

Іншою модифікацією є декарбоксилювання. В основному цей підхід використовується для отримання акрідинового гетероциклу, або його аза-аналогів, як у разі синтезу акрідин-1-карбонової кислоти (**1.76**), схема 1.10 [61].



(i)  $\text{SOCl}_2$ , ДМФА,  $100^\circ\text{C}$ , 2 год.; (ii) п-нітрофенол, ДМФА,  $30^\circ\text{C}$ , 30 хв.; (iii) п-NH $\text{SO}_2\text{CH}_3$  о-анізидин, ДМФА,  $100^\circ\text{C}$ , 2 год.; (iv)  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ , ДМФА,  $100^\circ\text{C}$ , 2 год.

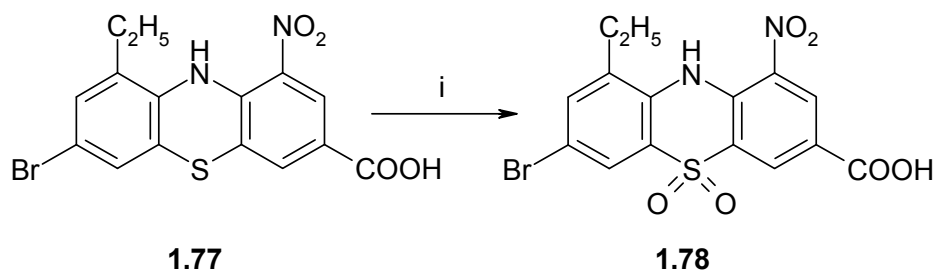
Схема 1.9. Синтез N-заміщеного аміду 9-аміноакрідин-1-карбонової кислоти (1.72).



(i)  $\text{Cu}$ ,  $\text{CuI}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , ДМСО,  $110^\circ\text{C}$ , 1 год.; (ii) 2N HCl, кип. 4 h; (iii) диетиленгліколь, кип. 12 год.

Схема 1.10. Синтез акрідин-1-карбонової кислоти (1.76).

Ще однією модифікацією є окиснення атому сульфуру до SO чи  $\text{SO}_2$  груп. Так було проведено для синтезу заміщеної 5,5-диоксидфенотіазін-3-карбонової кислоти (1.78), схема 1.11 [67].

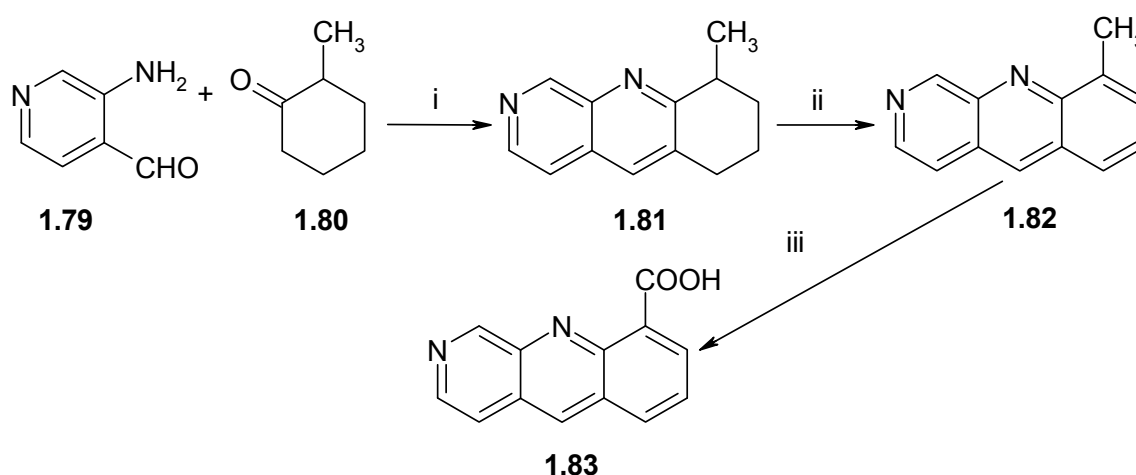


(i)  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 %,  $\text{AcOH}$ , кип. 1 год.

Схема 1.11 Синтез 5,5-диоксидфенотіазін-3-карбонової кислоти (**1.78**).

Зазвичай дослідники намагаються синтезувати трицикли з вже введеною карбоксильною групою. Коли ж такий підхід неможливий або недоцільний, карбоксильну групу вводять у вже синтезований трицикл різними шляхами.

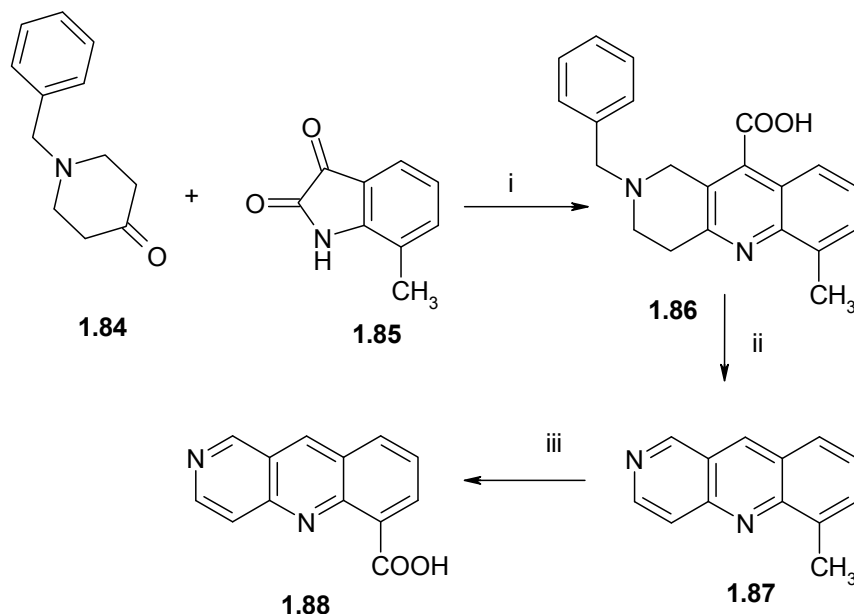
Найбільш поширеним методом введення карбоксильною групи, є окиснення метильної групи. Такий підхід було використано для синтезу 1,7-нафтиридин-9-карбонової кислоти (**1.83**), схема 1.12. Також у даному випадку проводилася модифікація одного трициклу (**1.81**) іншим (**1.82**), шляхом ароматизації, а сама трициклічна система була отримана в один етап з двох моноциклічних фрагментів (**1.79**, **1.80**), при чому обидва зв'язувальні атоми «X» та «Y» містилися в одному моноциклі (**1.79**) [48].



(i)  $t\text{-BuOK}$ ,  $t\text{-BuOH}$ , кип. 1.5 год.; (ii)  $\text{Pd/C}$ ,  $(\text{Ph})_2\text{O}$ , кип. 4-5 год.; (iii)  $\text{SeO}_2$ , хлорбензен, кип. 10 год.

Схема 1.12 Синтез 1,7-нафтиридин-9-карбонової кислоти (**1.83**).

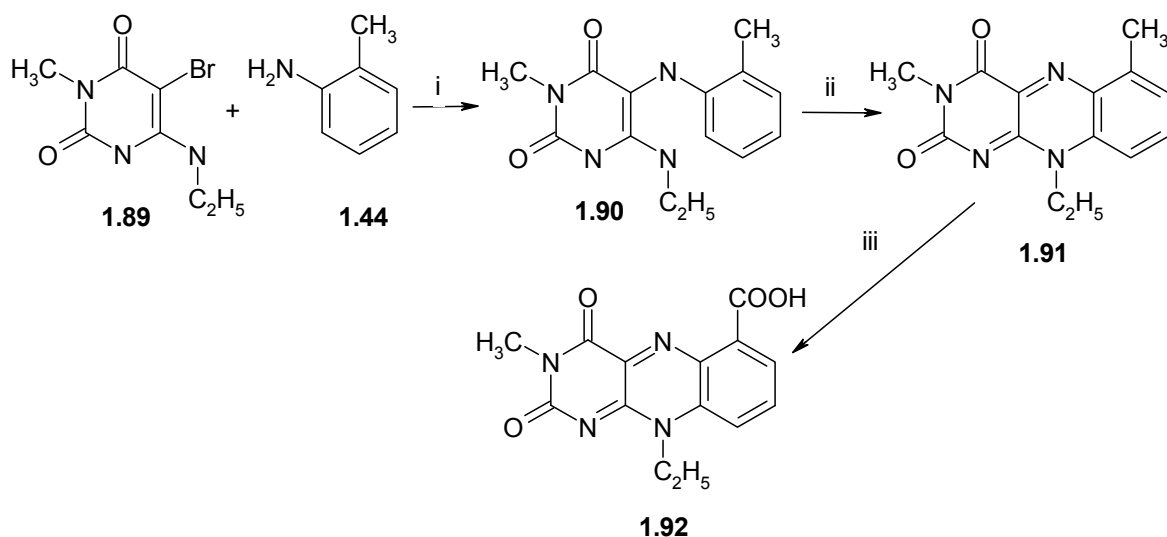
Аналогічним шляхом була отримана також і 1,6-нафтиридин-9-карбонова кислота (**1.88**), схема 1.13, з єдиною відмінністю, коли на стадії отримання **1.87** при ароматизації **1.86** одночасно відбувалася і її декарбоксилізація [48].



(i) KOH, кип. 20 год.; (ii) Pd/C, (Ph)<sub>2</sub>O, кип. 4-5 год.; (iii) SeO<sub>2</sub>, хлорбензен, кип. 10 год.

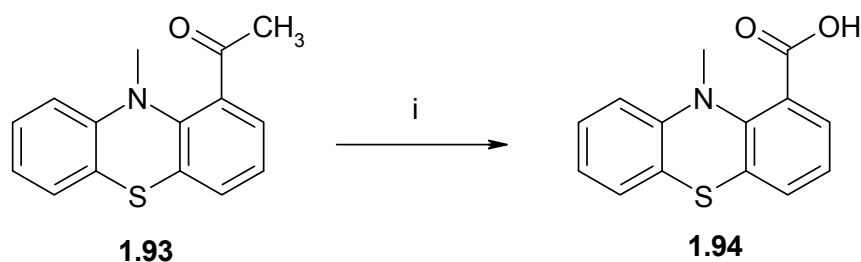
Схема 1.13 Синтез 1,6-нафтиридин-9-карбонової кислоти (**1.88**).

Шляхом окиснення метильної групи була синтезована і N-метил, N-етил піримідинофеназин-1-карбонова кислота (**1.92**), схема 1.14, [68]. Сама трициклічна система була синтезована у два етапи з двох моноциклічних сполук (**1.44** та **1.89**), в яких атоми «X» та «Y» містилися в різних циклах з виділенням проміжної сполуки **1.90** перед формуванням трициклічної сполуки **1.91**.



(i) ДМСО, Et<sub>3</sub>N, 100 °С, 2 год.; (ii) O<sub>2</sub>, ДМФА, 80 °С, 20 год.; (iii) бензен, 20 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KMnO<sub>4</sub>.  
 Схема 1.14. Синтез N-метил, N-етил піримідинофеназин-1-карбонової кислоти (**1.92**).

Окисненням ацетильної групи була синтезована N-метилфенотиазин-1-карбонова кислота (**1.9**), схема 1.15 [69].

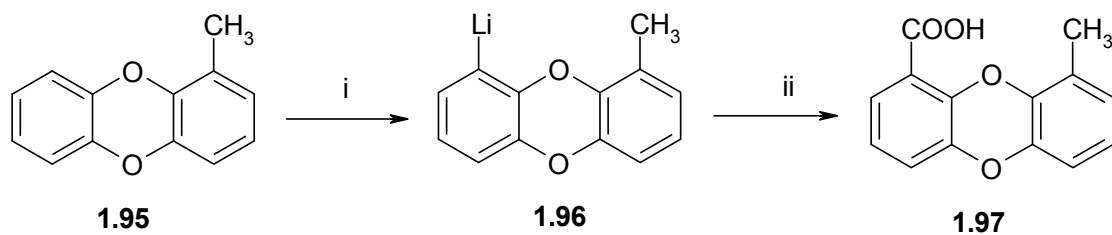


i) Py, I<sub>2</sub>, водний EtOH, NaOH, 40 °С, 1 год.

Схема 1.15. Синтез N-метилфенотиазин-1-карбонової кислоти (**1.94**).

Іншим підходом до введення карбоксильної групи є використання реакцій металювання ароматичних циклів з подальшою заміною атому металу на карбоксильну групу. Так було проведено синтез 9-метилдіоксин-1-карбонової кислоти (**1.97**), схема 1.16 [69], на першій стадії у сполуку **1.95** був введений атом літію і отримана речовина **1.96**. На другій стадії атом літію був замінений на карбоксильну групу.





(i) ТГФ, n-BuLi, -78 °C, 1 год.; (ii) ТГФ, CO<sub>2</sub>, 25 °C, 3 год.

Схема 1.16. Синтез 9-метилдіоксин-1-карбонової кислоти (**1.97**).

Таким чином, існує достатня кількість підходів та методів синтезу ТГКК, які дозволяють створення широкого спектру нових кислот та їхніх функціоналізованих похідних перспективних біологічно активних сполук.

### 1.3. Характеристика біологічних моделей, що застосовувалися в роботі

#### 1.3.1. ДНК-залежна РНК-полімераза фагу T7

На відміну від бактеріальних полімераз, РНК-полімераза фагу T7 – однострудинний білок, здатний здійснювати повний транскрипційний цикл за відсутності додаткових білкових факторів.

Дані рентгеноструктурного аналізу (РСА) свідчать про наявність значної подібності тривимірної структури РНК-полімерази T7 із структурою ряду різноманітних  $\beta'$ -субодиниць навіть еволюційно далеких РНК- і ДНК-полімераз [70-72]. Більшість цих ферментів побудована за модульним принципом, причому різні типи функціональної активності цих ферментів зосереджені в специфічних білкових доменах. Просторові структури полімеризуючих доменів всіх РНК- і ДНК-полімераз подібні; за формою вони нагадують долонь правої руки, рис. 1.29. У зв'язку з цим, відповідні субдомени отримали назву palm, thumb, fingers (“долоня”, “великий палець” та “пальці”, відповідно). Ці субдомени утворюють глибоку порожнину зв'язування з полінуклеотидами, на стінках і на дні якої розташована велика кількість заряджених амінокислотних залишків. В молекулі T7 РНК-полімерази (рис. 1.28) довжина цієї порожнини становить 60Å, ширина 15-25Å і глибина 25-40Å. Такий об'єм дозволяє розмістити в ній майже два повних оберти двоспіральної молекули ДНК.

Явних гомологій в первинній структурі різних субодиничних ДНК- і РНК-полімераз не спостерігається, але виявлено присутність трьох консервативних мотивів (A, B, C) [73]. При цьому, мотиви A і C знаходяться в усіх без винятку ДНК- і РНК-полімеразах і містять інваріантні залишки аспарагінової кислоти. Мотив B характерний лише для частини ДНК-полімераз і всіх РНК-полімераз і містить інваріантні залишки лізину, тирозину і гліцину. Ці консервативні структурні мотиви розташовуються в просторових структурах полімераз аналогічним чином – мотиви A і C у субдомени «долоня», а мотив B у субдомени «пальці». Саме ці мотиви і формують, головним чином, активний центр полімераз. Окрім цього всі полімерази мають універсальний механізм синтезу

фосфодиефірного зв'язку. Для цього використовується гідроксильна група 5'-фосфату нуклеотиду та 3'-гідроксильна група цукрового фрагменту останнього нуклеотиду наростаючого ланцюга РНК.

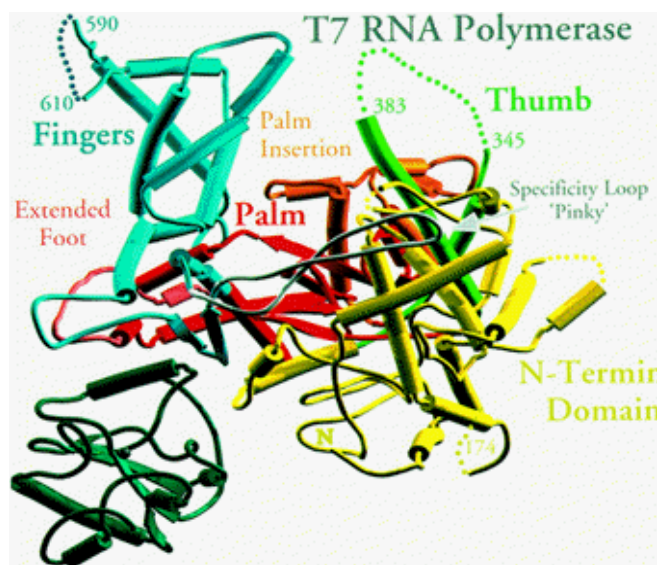


Рис. 1.29. Просторова структура РНК-полімерази фагу Т7 [74].

Основними характеристиками РНКП Т7є:

- молекулярна маса – 98092 Да;
- кількість амінокислотних залишків – 883;
- рН-оптимум ферментативної активності – 8,0-9,0;
- оптимальна концентрація іонів Na<sup>+</sup> чи K<sup>+</sup> (іонна сила) – <100Мм;
- константа дисоціації фермент-промотор – (2,0-2,7)\*10<sup>6</sup>;
- швидкість синтезу РНК – 100-200 нукл/с.

При використанні матриці з виступаючим «липким» кінцем Т7 РНК-полімерази дикого типу, поряд з основним транскриптом заданої довжини синтезуються також додаткові аберативні транскрипти, які мають більшу довжину. Schenborn і Mierendorf пояснили це явище як здатність ферменту при досягненні кінця матриці «повертати назад» і зчитувати комплементарний ланцюг [75].

Важливим є і той факт, що при використанні РНК-полімерази бактеріофага Т7 у системі транскрипції *in vitro* абортівність процесу (синтез транскриптів, довжина яких не перевищує 8-10 основ) зведена до мінімуму. Імовірно, що N-

кінцевий домен РНКП Т7, бере участь в зв'язуванні 5'-кінця РНК-продукту, що синтезується, по досягненні ним певної довжини, забезпечуючи перехід від не процесивного (абортивного) до процесивного механізму полімеризації [76-78].

Крім того, як уже зазначалось, ця полімераза характеризується високою швидкістю синтезу РНК і специфічністю по відношенню до своїх промоторів.

Всі перераховані вище властивості роблять однострункову полімеразу бактеріофагу Т7 досить зручною моделлю для дослідження фізико-хімічних механізмів транскрипції. Цей фермент також зручний для вивчення деяких аспектів механізму дії синтетичних біорегуляторів, що впливають на синтез РНК, та біологічного скринінгу таких препаратів. Крім того, властивості РНКП Т7 визначають можливість її практичного використання в молекулярній біології в якості інструменту для синтезу специфічних транскриптів *in vitro*.

### 1.3.2. Вірус бичачої вірусної діареї

Вірус бичачої вірусної діареї (ВБВД) є однією з провідних ветеринарних інфекцій, яка спричиняє серйозні проблеми із здоров'ям у тварин і приводить до значних економічних втрат. Це РНК-вірус, що належить до пестивірусів родини *Flaviviridae*. Характерні ознаки хвороби: лихоманка, ерозійно-виразкові запалення слизових оболонок травного тракту, діарея (пронос), риніт, кон'юнктивіт. У тільних корів можливі аборти. Основне джерело збудника інфекції - хворі і перехворілі тварини, які виділяють вірус з сечею, калом, слиною, запальним ексудатом. Хвороба протікає у формі епізоотії, захворюваність від 10 до 100 % тварин в стаді, летальність 10-90 %. Нині не існує офіційних препаратів для лікування ВБВД. Для профілактики цього захворювання використовують вакцину, але її дія не дає 100% захисту [79-84].

### 1.3.3. Бактерійні штами

*Erysipelothrix rhusiopathiae* VR2 var. IVM – грам-позитивна бактерія, що викликає різноманітні хвороби у людей і тварин, основною з яких є бешіха свиней. Ця бактерія може бути виділена з ґрунту, а також фекалій інфікованих

тварин. Ця бактерія росте як в анаеробному так і аеробному середовищі, а також не виділяє ендотоксинів. Бактерія чутлива до дії пеніциліну та не чутлива до дії ванкоміцину [85-87].

*Klebsiella Spp* – умовно-патогенна грам-негативна бактерія. Ця анаеробна бактерія, що зустрічається в фекаліях людини, на шкірі та слизових оболонках дихальних шляхів, чутлива до дії ампіциліну та канаміцину [88-90].

*Escherichia coli* – умовно-патогенна грам-негативна бактерія, один з головних видів бактерій, що живуть в нижньому кишківнику ссавців. ATCC25922 - лабораторний штам. *E.coli* є чутливою до багатьох антибіотиків. у тому числі, пеніцилін та канаміцин [91-94].

*Staphylococcus aureus* (золотистий стафілокок) – куляста грам-позитивна бактерія роду стафілокок. Ця бактерія може викликати широкий діапазон захворювань, починаючи з легких шкірних інфекцій: вугри, імпетиго, фурункул, флегмона, карбункул, стафілококовий опікоподібний шкірний синдром - до смертельно небезпечних захворювань: пневмонія, менінгіт, остеомієліт, ендокардит, інфекційно-токсичний шок і сепсис. *S. aureus* до цих пір є однією з чотирьох найбільш частих причин внутрішньолікарняних інфекцій, часто викликаючи післяопераційні ранові інфекції. Золотистий стафілокок небезпечний тим, що може мутувати у резистентні до антибіотиків штами [95-98].

*Salmonella holerasuis* – грам-негативна бактерія, з роду *Salmonella*. Ця бактерія – збудник черевного тифу, також може приводити до гострого гастроентериту людини, що називається сальмонельозом [99-102].

*Pasteurella Multocida* - грам-негативна бактерія, що належить до сімейства *Pasteurellaceae* є чутливою до пеніциліну. Ця бактерія викликає різноманітні хвороби як у домашніх, так і диких тварин, в тому числі пташину холеру [103-105].

*Pseudomonas aeruginosa* – грам-негативна аеробна паличковидна бактерія, що пересувається за допомогою одного джгутика. *P. aeruginosa* є опортуністичним патогеном людини, деяких тварин та рослин, викликаючи

нозокоміальні інфекції у людини, лікування яких ускладнюється через резистентність до великого числа антибіотиків [106-108].

*Enterococcus Faecalis* (фекальні ентерококи) – грам-негативна бактерія з роду *Streptococcus*. Це бактерія найчастіше з ентерококів зустрічається в організмі людини, а також домашніх тварин, у тому числі птиці. Фекальні ентерококи також колонізують кишківник великої рогатої худоби, свиней, собак, коней, овець і кіз. Фекальний ентерокок може бути збудником різних інфекцій: сечовивідних шляхів, інтраабдомінальних, органів малого тазу, ранових, ендокардиту. Ця бактерія чутлива до дії левофлоксацину та рифаксиміну [111-112].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Прилади та реагенти

У роботі використано реагенти та розчинники фірм „УкрОргСинтез” (Україна), Fluka (Швейцарія) та Sigma-Aldrich (США).

Перебіг реакцій та чистоту отриманих сполук контролювали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на платівках Silicagel 60F<sub>254</sub> (Merck, Німеччина) з використанням різноманітних елюентів. Продукти реакції очищували методом препаративної хроматографії на силікагелі G-60 (Merck, Німеччина).

Спектри <sup>1</sup>H ЯМР реєстрували на спектрометрі «Varian Unity Plus 400» (США) у розчині ДМСО-d<sub>6</sub>, як внутрішній стандарт застосовувався тетраметилсилан. Хімічні зсуви наведено у мільйонних частках (м.д.), опис піків ПМР: с – синглет, д – дублет, т – триплет, м – мультиплет, уш – уширений пік. Хроматомас спектри записували на спектрометрі Agilent 1100 (Німеччина) (РХ, ХІ, МС) в позитивному режимі. Температуру плавлення визначали на апараті Boetius РНМК (Німеччина).

Для біологічних досліджень усі сполуки розчиняли у 99.99% ДМСО (Sigma-Aldrich). Електрофореграми результатів транскрипції фотографували цифровою фотокамерою Olympus<sup>™</sup> (Японія), фотографії оброблялися у програмі Image J<sup>™</sup>. Для визначення цитопатогенної та дегенеративної дії на клітини використовували мікроскоп Leica DMIL (Німеччина). Візуалізація результатів докінгу здійснювалася у програмі Chimera<sup>™</sup>. При визначенні розчинності сполук для запису УФ-спектрів застосовували планшетний рідер SpectraMax Plus 96. При визначенні ліпофільності сполук для високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) використовували колонку Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1\*50mm, 3.5 мкМ), маспектри записували на спектрометрі API 3000 (з

модулем TurboIonSpray Electrospray, США). Спектри флуоресценції були записані на спектрометрі LS55 (Perkin Elmer, США).

## 2.2. Процедура докінгу ліганду в рецептор

Усі розрахунки, у тому числі і оптимізацію геометрії лігандів, здійснювали за допомогою пакету програм QXP/Flo+, розробленого McMartin та ін. [113]. Докінг проводили з використанням гнучкого ліганду та фіксованої моделі рецептора, застосовуючи алгоритм систематичного докінгу (SDOCK+), який демонструє задовільну здатність відтворення конформації лігандів із мінімальним показником середньо-квадратичного відхилення відносно кристалографічних даних [114]. Максимальне число кроків розрахунку комплексу ліганд-рецептор – 300. Виходячи із внутрішніх скоринг-функцій: вільної енергії зв'язування (FreE), енергії Н-зв'язків (Hbnd) та гідрофобних взаємодій (Cntc), для подальшого аналізу, фільтрування та вивчення зберігали 20 найкращих комплексів. Модель рецептора сформовано, спираючись на рентгеноструктурні дані транскрипційного комплексу РНКП Т7-ДНК, що відображає фазу впізнавання вхідного нуклеотиду (PDB X-Ray code: 1SOV) [115]. При створенні моделі активного сайту враховували амінокислотні залишки в радіусі 0,1 нм навколо природного субстрату. До моделі активного сайту включали амінокислотні залишки, які беруть участь, як у впізнаванні та зв'язуванні субстрату, так і ті, що забезпечують функціонування полімерази у цілому.

## 2.3. Реакція транскрипції *in vitro*

Перевірку впливу досліджуваних речовин на синтез РНК *in vitro* здійснювали у системі транскрипції РНКП Т7 [116] застосовуючи комерційні реагенти фірми Fermentas™ (Литва). Транскрипцію проводили в 20 мкл реакційної суміші, яка містила 0,5 мкг модифікованої, лінеаризованої плазмідної ДНК рTZ19R, 2 мМ кожного з рибонуклеозидтрифосфатів, 20 од. акт. інгібітора РНК-аз RiboLock™, у присутності 40 мМ трис-НСl, рН 7,9, 6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ спермідину, 10 мМ NaCl, 10 мМ ДТТ та 12 од. акт. РНКП Т7. Реакційну суміш



витримували впродовж 45 хв. за 37 °С та зупиняли охолодженням до -20 °С. Детекцію продуктів реакції проводили за допомогою гель-електрофорезу в 1,2%-й агарозі з додаванням 0,3 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізацію РНК-транскриптів здійснювали на трансільюмінаторі в ультрафіолетовому світлі. Інтенсивність смуг РНК вимірювали денситометрично за допомогою програми ImageJ<sup>TM</sup>. Значення IC<sub>50</sub> – концентрацію інгібітора, необхідну для пригнічення ензиматичної активності на 50 % знаходили методом двохкратних розведень. Значення IC<sub>50</sub>, вираховувалися за допомогою графічного методу. Як негативний контроль використовували реакцію транскрипції в присутності чистого ДМСО (2,5%), як позитивний контроль реакцію транскрипції за присутності актиноміцину D (IC<sub>50</sub> = 0,85 мкМ).

## 2.4. Мікробіологічні дослідження

У роботі використано штами мікроорганізмів з колекції Інституту ветеринарної медицини УААН (м. Київ)

*Erysipelothrix rhusiopathiae* VR-2 var. IVM, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp, *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella holerasuis* i *Pasteurella Multocida* та *Enterococcus Faecalis*.

Тест-культури бактерій отримували шляхом висіву на тверде поживне середовище та подальшого інкубування протягом 24 годин. Колонії мікроорганізмів після мікроскопічного контролю суспендували у фізіологічному розчині до рівня каламутності, що відповідає 0.5 за стандартом McFarland.

Мінімальну інгібувальну активність (МІК) вивчали методом послідовних серійних розведень у рідкому поживному середовищі Мюллер-Хінтона (BioMeriex<sup>TM</sup>, France), які готували відповідно до рекомендацій виробника на 96-лункових планшетах [117-119].

У підготовлені стерильні планшети (Sarstedt<sup>TM</sup>, ФРН) асептично вносили 140 мкл середовища, додавали 50 мкл суспензії тест-мікроорганізму у кінцевій концентрації  $1 \times 10^7$  КУО у 1 см<sup>3</sup> і 1 мкл тестових речовин у відповідних концентраціях та інкубували 18-24 години за температури 37 °С. Як негативний

контроль використовували лунки з відповідним рідким середовищем і культурою мікроорганізму, але без тест-агенту. Як агент порівняння використовували флуорохінолоновий антибіотик Офлоксацин. В окремі лунки замість розчину тест-речовин додавали ДМСО для визначення його токсичності. Для кожної концентрації окремого зразка та контролю використовували по дві лунки.

З огляду на те, що ДМСО має виразні антимікробні властивості [120], його концентрація в пробах для тестування не перевищувала 2,5% і не викликала видимого впливу на ріст досліджуваних бактерій і вірусу у порівнянні із контролем.

Мінімальну інгібувальну концентрацію (МІК) визначали як найменшу концентрацію антимікробного агенту, що повністю гальмувала видимий ріст тест-культури мікроорганізму.

## **2.5. Дослідження антивірусної активності сполук**

Для визначення ефективної інгібуючої концентрації  $EC_{50}$  (найменша концентрація препарату, яка у 50% інфікованих клітин знижує інфекційний титр вірусу на  $1,75 - 2,0 \lg ID_{50}$ ) вірус в дозі  $100 \text{ TCID}_{50} / 0,1 \text{ мл}$  вносили в ПККНТ та інкубували протягом 1 години за температури  $37^\circ\text{C}$ . Після адсорбції вірусу на клітинах через 1 годину його відмивали поживним середовищем, після чого у підтримуюче середовище RPMI-1640 + 2 % фетальної сироватки (Sigma-Aldrich, США) вносили препарати у різних концентраціях. Репродукцію вірусу визначали за цитопатогенною дією та інфекційним титром для кожної концентрації препарату.

## **2.6. Тест на цитотоксичність**

Цитотоксичність ( $CC_{50}$ ) досліджували на моношаровій лінії перещеплюваної культури клітин нирки теляти (ПККНТ). Культуру клітин вирощували на поживному середовищі RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США) з 10% інактивованої ембріональної сироватки ("Fetal Bovin Serum, Heat Inactivated", Sigma-Aldrich, США) з антибіотиками пеніциліном та стрептоміцином (по 100 МО/мл), або

каноміцином (50 МО/мл) на 96-лункових планшетах (Nunc, Данія) в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub>. Сформований через 24 години моношар клітин у лунках промивали та вносили в них підтримуюче середовище без сироватки, яке містило відповідну концентрацію досліджуваної сполуки. Як негативний контроль використовували чистий ДМСО. Як позитивний контроль використовували Доксорубіцин у концентрації 10 мкМ. Облік результатів виконували протягом 120 год за допомогою мікроскопу (Leica DMIL, Німеччина), спостерігаючи за появою або відсутністю дегенерації моношару ПККНТ, чи зміною їхньої морфології. Цитотоксичною концентрацією CC<sub>50</sub> вважалася така концентрація сполуки, яка зменшувала кількість здорових клітин на 50 %.

## 2.7. Запис спектрів флуоресценції

Для запису спектрів флуоресценції, сполуку **4.20** розчиняли в розчинах ДМСО, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOH, діоксану та Тріс-ЕДТА (ТЕ) буфері в концентрації  $1 \cdot 10^{-5}$  Моль/л.

Для визначення зв'язування з ДНК, сполука в концентрації  $1 \cdot 10^{-5}$  Моль/л в ТЕ буфері (рН=7.9) була проінкубована з різною кількістю ДНК великої рогатої худоби (концентрація ДНК в парах нуклеотидів по відношенню до концентрації сполуки: 0:1, 0,1:1, 1:1, 2:1, 5:1, 7,5:1, 10:1, 15:1, 25:1, 50:1, 100:1) протягом 30 хв за температури 37 °С. Після інкубації для кожного розчину були записані спектри флуоресценції. Всі спектри флуоресценції були записані при довжині хвилі збудження 340 нм, розмір щілин входу та виходу сигналу 3 нм.

## 2.8. Визначення logD сполук

Досліджувані сполуки розчиняли в ДМСО в концентрації 10 мМ. Аліквоту стокового розчину в ДМСО об'ємом 5 мкл розчиняли в суміші, що містила 500 мкл PBS буфера і 500 мкл октанолу. Отриману суміш перемішували на ротаторі зі швидкістю 30 обертів на хвилину протягом 1 години. Розділення фаз забезпечували шляхом центрифугування протягом 1 хв при 6000 обертах на хвилину. Фазу октанолу відбирали та розбавляли у 100 разів розчином октанолу з

40 % ацетонітрилу. Водну фазу розбавляли у 10 разів розчином води з 5 % ацетонітрилу. Для обох фаз записувалися маспектри у поєднанні з ВЕРХ. При розрахунках враховувалося, що органічна фаза була розведена у 10 разів більше за водну фазу.

Значення  $D$  розраховувалися за формулою:

$$D = \frac{100 \cdot S_o}{10 \cdot S_p}$$

$S_o$  - площа піку аналіту в октанолі

$S_p$  - площа піку аналіту в буфері BBS.

## 2.9. Визначення розчинності сполук

Досліджувані сполуки розчиняли в ДМСО в концентрації 10 мМ. Калібровочну криву будували в розчині ДМСО. Для побудови кривої брали концентрації сполуки: 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 і 1 мкМ. Для отриманих розчинів записували УФ-спектри в діапазоні 200-550 нм з кроком 5 нм і визначали довжину хвилі при якій спостерігалось максимальне значення оптичної густини. Для цієї довжини хвилі будували калібровочну криву, по якій визначали розчинність сполук.

Для визначення розчинності речовини, аліквоту її стокового розчину в ДМСО (10 мМ) об'ємом 5 мкл додавали до 495 мкл PBS буферу. Отриманий розчин перемішували в шейкері-інкубаторі протягом 2 годин на швидкості 150 обертів на хвилину при 25 °С. Після інкубації розчин центрифугували на швидкості 6000 обертів на хвилину протягом 5 хв. З розчину обережно відбирали аліквоту – 200 мкл і додавали до неї 200 мкл метанолу. Для отриманих розчинів записувалися УФ-спектри в діапазоні 200-550 нм з кроком 5 нм, і на визначеній при калібруванні довжині хвилі визначали оптичну густину. В якості контролю використовувався 50 % розчин метанолу в PBS буфері. Розчинність сполук визначали за калібрувальним графіком.

## 2.10. Розрахунок фізико-хімічних параметрів

Значення  $\log P$ , кількості донорів Н-зв'язку (H-bond donors) та кількості акцепторів Н-зв'язку (H-bond acceptors) були розраховані за допомогою пакету LigPrep (Schrödinger). У випадку карбонових кислот для розрахунку використовувалися депротоновані форми.

## 2.11. Методики синтезу сполук та їхня характеристика

### *Синтез 2-бром-3-нітробензойної кислоти (3.4).*

У 2 літровий реактор вносять 21,2 г 3-нітрофталевої кислоти (3.1) та 8 г гідроксиду натрію, обережно додають 300 мл дистильованої води та нагрівають до повного розчинення інгредієнтів. Отриманий розчин нагрівають до 80-90 °C та додають гарячий розчин 33,2 г нітрату меркурію і 5 мл льодяної оцтової кислоти (також можливе використання ацетату меркурію, який можна приготувати з окису меркурію та розчину оцтової кислоти) та енергійно перемішують реакційну суміш до її охолодження. Осад, що утворився (3.2), кип'ятять протягом 100 годин та фільтрують. Потім до кристалічного залишку додають 200 мл насиченого розчину броміду натрію, нагрівають до 60°C, і краплинами, при енергійному розмішуванні, додають 6 мл броду та продовжують перемішування ще 15 хвилин, надлишок броду нейтралізують сульфідом натрію. Отриманий розчин вливають в 300 мл концентрованої соляної кислоти. Осад 2-бром 3-нітробензойної кислоти (3.4) відфільтровують та на фільтрі промивають тричі водою по 100 мл, потім осад розчиняють в 5 % КОН, відфільтровують осад оксиду меркурію (якого зазвичай немає, або сліди), переосаджують 10 % соляною кислотою, та промивають тричі водою по 100 мл, сушать на повітрі. Вихід продукту 14,8 г (60 % від теоретичного в перерахунку на 3-нітрофталеву кислоту). Кристали кремового кольору з  $T_{пл} = 160\text{ }^{\circ}\text{C}$  (з розкладом).

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ : 7,49 т (1H), 7,98 д (1H), 8,07 д (1H).

**Загальна методика отримання *N*-арил-3-нітроантранілових кислот (3.7, 3.8).**

До розчину 2,47 г (10 ммоль) 2-бром-3-нітробензойної кислоти (3.4) у 10 мл ДМФА додають по чергову 2,76 г свіжепрокаленого поташу, а після виділення  $\text{CO}_2$  – 64 мг дрібнодисперсної міді та 12,5 ммоль відповідного аміну (3.5, 3.6). Реакційну суміш нагріють при перемішуванні протягом декількох годин (від 1 до 3-х), оцінюючи перебіг процесу за інтенсивністю газоутворення. По завершенні виділення  $\text{CO}_2$  розчин виливають у воду (150 мл) та фільтрують. Фільтрат підкислюють 10 %  $\text{HCl}$  до рН 2, осад, що утворюється, фільтрують та промивають водою (тричі по 50 мл). Отримані сполуки кристалізують з етанолу та сушать на повітрі.

**2-(2-Метоксифеніламіно)-3-нітробензойна кислота (3.7).** Вихід 2,73 г (95 %),  $T_{\text{пл}} = 228-229^\circ\text{C}$ , (літ.  $227-228^\circ\text{C}$  [56]), ЯМР  $^1\text{H}$ : 3.85 с (3H), 6.39 т (1H), 6.56 д (1H), 6,80 м (2H), 6,92 т (1H), 7,91 д (1H), 8,20 д (1H), 9,60 с (1H, NH), 13.06 с (1H,  $\text{COOH}$ ).

**2-(2-Метилфеніламіно)-3-нітробензойна кислота (3.8).** Вихід 2,07 г (76 %),  $T_{\text{пл}} = 197-200^\circ\text{C}$ , (літ.  $196-199^\circ\text{C}$  [56]), ЯМР  $^1\text{H}$ : 2,35 с (3H), 6,72 т (1 H), 6,98 м (3H), 7,22 м (1H), 7,96 д (1H), 8,24 д (1H), 9,98 с (1H, NH), 13.20 с (1H,  $\text{COOH}$ ).

**Загальна методика синтезу 9-заміщених феназин-1-карбонових кислот (3.9, 3.10):**

0,01 Моль *N*-арил-3-нітроантранілової кислоти (3.7, 3.8) суспендують у розчині етилату натрію (5 г  $\text{Na}$ /50 мл абсолютного етанолу), додають 1,52 г боргідриду натрію і кип'ятять при енергійному перемішуванні (зі зворотним холодильником та хлоркальцієвою трубкою) протягом 8 годин. Реакційну суміш охолоджують, виливають у 250 мл води та обережно підкислюють 10 % соляною кислотою до рН 2. Осад, що утворився, фільтрують, на фільтрі тричі промивають водою (50 мл), сушать на повітрі та кристалізують з ДМФА.

**9-Метоксифеназин-1-карбонова кислота (3.9).** Вихід 1,32 г (52%),  $T_{\text{пл}} = 265-267^\circ\text{C}$  (літ.  $262-265^\circ\text{C}$  [56]), ЯМР  $^1\text{H}$ : 4.18 с (3H), 7,41 д (1H), 7,84 д (1H), 7,96 т (1 H), 8,14 т (1H), 8,49 д (1H), 8,77 д (1H), 15.0 с (1H,  $\text{COOH}$ ).  $\text{MS (XI)} = 255 (\text{MH}^+)$ .

**9-Метилфеназин-1-карбонова кислота (3.10).** Вихід 1,07 г (45%),  $T_{пл} = 239-241\text{ }^{\circ}\text{C}$  (літ.  $237-238\text{ }^{\circ}\text{C}$  [56]), ЯМР  $^1\text{H}$ : 2,93 с (3H), 7,96 м (2H), 8,15 м (2H), 8,51 д (1H), 8,74 д (1H), 15.19 с (1H, COOH). МС (ХІ) = 239 (МН<sup>+</sup>).

*Загальна методика отримання ариламідів 9-метил(метокси)-феназин-1-карбонової кислоти (3.11-3.32):*

Суспендують 1,0 ммоль 9-заміщеної ФКК-1 (3.9, 3.10) у 30 мл толуену, додають 1,5 ммоль (0,11 мл) хлористого тіонілу та 1,5 ммоль піридину і нагрівають при температурі  $40^{\circ}\text{C}$  протягом 1 години. Після цього розчин охолоджують до кімнатної температури, додають 1,1 ммоль відповідного аміну і нагрівають суміш за температури  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 3 годин. Толуен відганяють при зниженому тиску, залишок заливають 50 мл води, осад, що утворився, відфільтровують та кристалізують з суміші н-бутанол – ДМСО (19:1).

**9-Метоксифеназин-1-карбонової кислоти феніламід (3.11).** Вихід 53 %,  $T_{пл} = 222-223\text{ }^{\circ}\text{C}$ . ЯМР  $^1\text{H}$ : 4,26 с (3H), 7,13 т (1H), 7,43 м (3H), 7,80 д (1H), 7,93 м (3H), 8,09 д (1H), 8,40 д (1H), 8,91 д (1H), 13,76 с (1H, NH). МС (ХІ) = 330 (МН<sup>+</sup>).

**9-Метоксифеназин-1-карбонової кислоти о-толіламід (3.12).** Вихід 63 %,  $T_{пл} = 178-179\text{ }^{\circ}\text{C}$ . ЯМР  $^1\text{H}$ : 2,47 с (3H), 4,09 с (3H), 7,15 м (1H), 7,31 м (3H), 7,86 м (3H), 8,11 т (1H), 8,43 д (1H), 8,94 д (1H), 12,67 с (1H, NH). МС (ХІ) = 344 (МН<sup>+</sup>).

**9-Метоксифеназин-1-карбонової кислоти м-толіламід (3.13).** Вихід 87 %,  $T_{пл} = 201-202\text{ }^{\circ}\text{C}$ . ЯМР  $^1\text{H}$ : 2,43 с (3H), 4,21 с (3H), 6,92 д (1H), 7,32 м (2H), 7,81 м (4H), 8,05 т (1H), 8,35 д (1H), 8,85 д (1H), 13,62 с (1H, NH). МС (ХІ) = 344 (МН<sup>+</sup>).

**9-Метоксифеназин-1-карбонової кислоти п-толіламід (3.14).** Вихід 69 %,  $T_{пл} = 213-215\text{ }^{\circ}\text{C}$ . ЯМР  $^1\text{H}$ : 2,41 с (3H), 4,26с (3H), 7,22 м (2H), 7,38 д (1H), 7,87 м (4H), 8,09 т (1H), 8,42 д (1H), 8,93 д (1H), 13,57 с (1H, NH). МС (ХІ) = 344 (МН<sup>+</sup>).

**9-Метоксифеназин-1-карбонової кислоти (2-трифлуорометилфеніл)амід (3.15).** Вихід 60 %,  $T_{пл} = 239-241\text{ }^{\circ}\text{C}$  ЯМР  $^1\text{H}$ : 4.19 с (3H), 7,29 д (1H), 7,40 д (1H), 7,59 т (1H), 7,73 д (1H), 7,84 т (1H), 7,99 м (1H), 8,10 д (1H), 8,21 д (1H), 8,30 д (1H), 8,79 д (1H), 12,67 с (1H, NH). МС (ХІ) = 398 (МН<sup>+</sup>).

**9-Метоксифеназин-1-карбонової кислоти (3-трифлуорометилфеніл)амід (3.16).** Вихід 68 %,  $T_{пл} = 232-234$  °C. ЯМР  $^1H$ : 4.01 с (3H), 7,30 д (1H), 7,49 м (2H), 7,83 м (4H), 8,12 т (1H), 8,46 д (1H), 8,94 д (1H), 12,94 с (1H, NH). МС (ХІ) = 398 ( $MH^+$ ).

**9-Метоксифеназин-1-карбонової кислоти (4-трифлуорометилфеніл)амід (3.17).** Вихід 61 %,  $T_{пл} = 258-261$  °C. ЯМР  $^1H$ : 4.24 с (3H), 7,34 д (1H), 7,75 м (3H), 7,90 т (1H), 8,08 м (3H), 8,36 д (1H), 8,86 д (1H), 14,02 с (1H, NH). МС (ХІ) = 398 ( $MH^+$ ).

**9-Метоксифеназин-1-карбонової кислоти (4-бутилфеніл)амід (3.18).** Вихід 74 %,  $T_{пл} = 185-187$  °C. ЯМР  $^1H$ : 0,97 т (3H), 1,42 м (2H), 1,61 м (2H), 2.62 т (3H), 4.24 с (3H), 7,22 д (2H), 7,37 д (1H), 7,80 д (1H), 7,86 д (2H), 7,91 т (1H), 8,08 д (1H), 8,37 д (1H), 8,88 д (1H), 13,68 с (1H, NH). МС (ХІ) = 386 ( $MH^+$ ).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти феніламід (3.19).** Вихід 50 %,  $T_{пл} = 203-205$  °C. ЯМР  $^1H$ : 3,01 с (3H), 7,15 т (1H), 7,41 т (1H), 7,88 м (4H), 8,09 м (2H), 8,42 д (1H), 8,87 д (1H), 12,50 с (1H, NH). МС (ХІ) = 314 ( $MH^+$ ).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти о-толіламід (3.20).** Вихід 55 %,  $T_{пл} = 223-225$  °C. ЯМР  $^1H$ : 2,36 с (3H), 2,86 с (3H), 7,25 м (3H), 7,51 д (1H), 7,87 м (2H), 8,11 м (2H), 8,44 д (1H), 8,85 д (1H), 12,16 с (1H, NH). МС (ХІ) = 328 ( $MH^+$ ).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти м-толіламід (3.21).** Вихід 65 %,  $T_{пл} = 169-171$  °C. ЯМР  $^1H$ : 2,42 с (3H), 3,03 с (3H), 6,97 д (1H), 7,27 т (1H), 7,63 д (1H), 7,74 с (1H), 7,89 м (2H), 8,11 м (2H), 8,42 д (1H), 8,87 д (1H), 12,46 с (1H, NH). МС (ХІ) = 328 ( $MH^+$ ).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти п-толіламід (3.22).** Вихід 58 %,  $T_{пл} = 216-219$  °C. ЯМР  $^1H$ : 2,37 с (3H), 3,02 с (3H), 7,19 д (2H), 7,74 д (2H), 7,88 м (2H), 8,10 м (2H), 8,42 д (1H), 8,89 д (1H), 12,51 с (1H, NH). МС (ХІ) = 328 ( $MH^+$ ).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти (2-трифлуорометилфеніл)амід (3.23).** Вихід 20 %,  $T_{пл} = 174-176$  °C. ЯМР  $^1H$ : 2,76 с (3H), 7,55 м (1H), 7,86 м (4H), 7,12 м (2H), 8,50 д (1H), 8,90 д (1H), 12,16 с (1H, NH). МС (ХІ) = 382 ( $MH^+$ ).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти (3-трифлуорометилфеніл)амід (3.24).** Вихід 34 %,  $T_{пл} = 195-198$  °C. ЯМР  $^1H$ : 2,98 с (3H), 7,44 д (1H), 7,62 т (1H), 7,89 м



(2H), 8,07 м (3H), 8,34 с (1H), 8,41 д (1H), 8,80 д (1H), 12,59 с (1H, NH). МС (ХІ) = 382 (МН<sup>+</sup>).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти (4-трифлуорометилфеніл)амід (3.25).**

Вихід 57 %, Т<sub>пл</sub> = 230-231 °С. ЯМР <sup>1</sup>Н: 3,03 с (3H), 7,72 м (2H), 7,92 м (2H), 8,12 м (4H), 8,49 д (1H), 8,86 д (1H), 12,63 с (1H, NH). МС (ХІ) = 382 (МН<sup>+</sup>).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти (4-бутилфеніл)амід (3.26).**

Вихід 68 %, Т<sub>пл</sub> = 140-141 °С. ЯМР <sup>1</sup>Н: 0,92 т (3H), 1,42 м (2H), 1,61 м (2H), 2,61 м (2H), 2,91 с (3H), 7,28 д (2H), 7,82 д (2H), 7,98 м (2H), 8,48 м (2H), 8,50 д (1H), 8,79 д (1H), 12,20 с (1H, NH). МС (ХІ) = 370 (МН<sup>+</sup>).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти піридин-2-иламід (3.27).**

Вихід 15 %, Т<sub>пл</sub> = 186-188 °С. ЯМР <sup>1</sup>Н: 3,15 с (3H), 7,14 т (1H), 7,87 м (3H), 8,11 м (2H), 8,38 д (1H), 8,45 д (2H), 8,96 д (1H), 13,51 с (1H, NH). МС (ХІ) = 315 (МН<sup>+</sup>).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти піридин-4-иламід (3.28).**

Вихід 18 %, Т<sub>пл</sub> = 228-231 °С. ЯМР <sup>1</sup>Н: 2,90 с (3H), 7,97 м (2H), 8,19 м (4H), 8,55 д (1H), 8,65 д (1H), 8,79 м (2H), 12,44 с (1H, NH). МС (ХІ) = 315 (МН<sup>+</sup>).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти (4-метилпіридин-2-ил)амід (3.29).**

Вихід 29 %, Т<sub>пл</sub> = 189-191 °С. ЯМР <sup>1</sup>Н: 2,39 с (3H), 3,13 с (3H), 6,93 д (1H), 7,86 м (2H), 8,07 м (2H), 8,20 д (1H), 8,26 с (1H), 8,42 д (1H), 8,92 д (1H), 13,39 с (1H, NH). МС (ХІ) = 329 (МН<sup>+</sup>).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти (2-хлорпіридин-3-ил)амід (3.30).**

Вихід 48 %, Т<sub>пл</sub> = 264-266 °С. ЯМР <sup>1</sup>Н: 2,93 с (3H), 7,63 т (1H), 7,99 м (2H), 8,21 м (2H), 8,37 д (1H), 8,49 д (1H), 8,58 д (1H), 8,86 д (1H), 12,32 с (1H, NH). МС (ХІ) = 349 (МН<sup>+</sup>).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти (піридин-3-ил-метил)амід (3.31).**

Вихід 14 %, Т<sub>пл</sub> = 211-214 °С. ЯМР <sup>1</sup>Н: 3,71 с (3H), 4,85 д (2H), 7,34 т (1H), 7,85 м (3H), 8,06 м (2H), 8,38 д (1H), 8,48 д (1H), 8,68 с (1H), 8,82 д (1H), 11,08 с (1H, NH). МС (ХІ) = 329 (МН<sup>+</sup>).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти-(3-метилкарбоксифеніл)амід. (3.32).**

Вихід 19%, Т<sub>пл</sub> = 167-169 °С. ЯМР <sup>1</sup>Н: 3,02 с (3H), 3,93 с (3H), 7,52 т (1H), 7,75 д

(1H), 7,89 м (2H), 8,11 м (3H), 8,43 д (1H), 8,50 с (1H), 8,87 д (1H), 12,69 с (1H, NH). МС (ХІ) = 372 (МН<sup>+</sup>).

***Загальна методика синтезу 2-амінобензотіазолів (4.3, 4.4):***

До розчину (0,1 моля) амінобензойної кислоти (4.1, 4.2) у 200 мл оцтової кислоти при енергійному перемішуванні на льодяній бані додають 7,98 г (0,105 моля) роданистого амонію, потім по краплинам додають (протягом 1 години) 5,3 мл (0,105 моля) бром у 50 мл оцтової кислоти. Суміш продовжують перемішувати доки маса загусне. Осад, що утворився, фільтрують, промивають на фільтрі оцтовою кислотою (двічі по 30 мл) та водою (тричі по 100 мл), сушать на повітрі та кристалізують з етилового спирту.

**2-аміно-1,3-бензотіазол-6-карбонова кислота (4.3).** Вихід 18,3 г (95 %),  $T_{пл} = 276-278\text{ }^{\circ}\text{C}$ . <sup>1</sup>Н ЯМР: 6,36 (уш с, 2H, NH<sub>2</sub>), 7,02 (д, 1H, H-5, J = 8,8 Hz), 7,64 (с, 1H, H-2), 7,78 (д, 1H, H-6, J = 8,8 Hz), 12,40 (уш с, 1H, COOH). МС (ХІ) = 195 (МН<sup>+</sup>).

**2-аміно-6-метил-1,3-бензотіазол-4-карбонова кислота (4.4).** Вихід 18,3 г (88 %),  $T_{пл} = 220-222\text{ }^{\circ}\text{C}$ . <sup>1</sup>Н ЯМР: 2,23 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 6,95 (уш с, 2H, NH<sub>2</sub>), 7,50 (с, 1H, H-7), 7,80 (с, 1H, H-5), 12,68 (уш с, 1H, COOH). МС (ХІ) = 209 (МН<sup>+</sup>).

***Загальна методика синтезу о-амінотіофенол карбонових кислот (4.5, 4.6):***

Розчин 0,1 моля 2-амінобензотіазолу (4.3, 4.4) та 80 г гідроксиду калію у 250 мл води кип'ятять зі зворотним холодильником в атмосфері азоту протягом 30 годин, охолоджують, додають 750 г льоду та підкислюють до рН = 5 льодяною оцтовою кислотою. Розчин залишають на ніч. Утворений осад фільтрують та промивають водою (тричі по 100 мл). Осад та фільтрат екстрагують тричі порціями по 150 мл диетиловим етером. Екстракти об'єднують та розчинник випаровують при зниженому тиску. Залишок кристалізують з мінімального об'єму етилового спирту.

**2-аміно-3-гіа-5-метилбензойна кислота (4.5).** Вихід 6,0 г (32%);  $T_{пл} = 126-128\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  ЯМР: 2,16 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6,68 (уш с, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7,08 (с, 1H, H-4), 7,50 (с, 1H, H-6), 11,82 (уш с, 1H,  $\text{COOH}$ ). МС (ХІ) = 184 ( $\text{MH}^+$ ).

**4-аміно-3-гіабензойна кислота (4.6).** Вихід 6,6 г (38%);  $T_{пл} = 110-111\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  ЯМР: 6,08 (уш с, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6,74 (д, 1H, H-5,  $J=8,8\text{ Hz}$ ), 7,58 (с, 1H, H-2), 7,64 (д, 1H, H-6,  $J=8,8\text{ Hz}$ ), 11,98 (уш с, 1H,  $\text{COOH}$ ). МС (ХІ) = 170 ( $\text{MH}^+$ ).

#### ***Загальна методика синтезу ТБТКК (4.8, 4.9):***

До розчину 0,01 моля *о*-амінотіофенолкарбонової кислоти (4.5, 4.6) у 30 мл ДМФА додають 2,1 г (0,011 моля) 5-бром-6-азаурацилу (4.7) та нагрівають за температури  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом декількох годин (проходження реакції контролюють за допомогою ТШХ). Розчин охолоджують та фільтрують, осад промивають двічі порціями по 10 мл ДМФА і тричі по 30 мл водою. Сушать у сушильній шафі за температури  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**8-метил-3-оксо-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]триазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-6-карбонова кислота (4.8).** Вихід: 2,04 г (74 %),  $T_{пл} > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  ЯМР: 2,36 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ) 6,84 (с, 1H, H-9), 7,57 (с, 1H, H-7), 11,84 (уш с, 2H,  $\text{NH}-2$  і  $\text{NH}-4$ ). 15,26 (уш с, 1H,  $\text{COOH}$ ). МС (ХІ) = 277 ( $\text{MH}^+$ ).

**3-оксо-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]триазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-8-карбонова кислота (4.9).** Вихід: 1,76 г (67 %),  $T_{пл} > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  ЯМР: 7,06 (д, 1H, H-6,  $J = 8,4\text{ Hz}$ ), 7,62 (м, 2H, H-7 і H-9), 12,11 (уш с, 2H,  $\text{NH}-2$  і  $\text{NH}-4$ ), 12,57 (уш с, 1H,  $\text{COOH}$ ). МС (ХІ) = 263 ( $\text{MH}^+$ ).

#### ***Загальна методика синтезу амідів ТБТКК (4.10-4.23):***

Розчин 0,001 моля ТБТКК (4.8, 4.9) у 5 мл хлористого тіонілу за присутності каталітичних кількостей ДМФА кип'ять протягом 4 годин, додають 10 мл абсолютного толуену і розчинники випаровують за зниженого тиску. Процедуру випарювання з додаванням 10 мл толуену повторюють ще раз. До залишку додають 0,0011 моля відповідного аміну в 3 мл сухого піридину і розчин нагрівають за температури  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 6 годин. Розчин підкислюють розведеною соляною кислотою до  $\text{pH} = 3$ . Осад фільтрують, тричі на фільтрі

промивають розведеною соляною кислотою (по 10 мл) та водою (тричі по 10 мл). Осад розчиняють в 10 мл ДМФА при нагріванні і додають 40 мл 5% розчину амоніаку та залишають на ніч. Осад що утворився, фільтрують та промивають водою (тричі по 10 мл), сушать та кристалізують з мінімального об'єму ДМФА.

**8-метил-3-оксо-N-феніл-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]триазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-6-карбоксамід (4.10).** Вихід: 165 мг (42 %),  $T_{пл} > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  ЯМР: 2,32 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,03 (с, 1H, H-9), 7,09 (т, 1H, H-4',  $J = 7,2\text{ Hz}$ ), 7,31 (м, 2H, H-3' і H-5'), 7,74 (м, 3H, H-7, H-2' і H-6'), 11,41 (с, 1H, CONH), 11,71 (уш с, 1H, NH-4), 11,88 (уш с, 1H, NH-2). МС (ХІ) = 352 ( $\text{MH}^+$ ).

**8-метил-3-оксо-N-[2-(трифлуорометил)феніл]-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]триазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-6-карбоксамід (4.11).** Вихід: 117 мг (28 %),  $T_{пл} > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  ЯМР: 2,32 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,06 (с, 1H, H-9), 7,45 (м, 1H, H-4'), 7,60 (м, 1H, H-5'), 7,73 (м, 3H, H-7, H-3' і H-6'), 11,70 (с, 1H, CONH), 11,90 (уш с, 2H NH-2 і NH-4). МС (ХІ) = 420 ( $\text{MH}^+$ ).

**8-метил-3-оксо-N-[3-(трифлуорометил)феніл]-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]триазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-6-карбоксамід (4.12).** Вихід: 167 мг (40 %),  $T_{пл} > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  ЯМР: 2,28 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,03 (с, 1H, H-9), 7,34 (м, 1H, H-5'), 7,51 (д, 1H, H-4',  $J = 8,0\text{ Hz}$ ), 7,70 (с, 1H, H-7), 7,86 (д, 1H, H-6',  $J = 7,6\text{ Hz}$ ), 8,31 (с, 1H, H-2'), 11,31 (с, 1H, CONH), 11,86 (уш с, 2H, NH-2 і NH-4). МС (ХІ) = 420 ( $\text{MH}^+$ ).

**8-метил-3-оксо-N-[4-(трифлуорометил)феніл]-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]триазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-6-карбоксамід (4.13).** Вихід: 331 мг (78 %),  $T_{пл} > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  ЯМР: 2,32 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,06 (с, 1H, H-9), 7,60 (д, 2H, H-3' і H-5'  $J = 8,4\text{ Hz}$ ), 7,74 (с, 1H, H-7), 8,01 (д, 2H, H-2' і H-6'  $J = 8,4\text{ Hz}$ ), 11,70 (с, 1H, CONH), 11,79 (уш с, 1H, NH-4), 11,88 (уш с, 1H, NH-2). МС (ХІ) = 420 ( $\text{MH}^+$ ).

**8-метил-3-оксо-N-[4-бутилфеніл]-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]триазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-6-карбоксамід (4.14).** Вихід: 328 мг (83 %),  $T_{пл} > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  ЯМР: 0,94 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ -бутил,  $J = 7,2\text{ Hz}$ ), 1,34 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ -3,  $J = 7,2\text{ Hz}$  і  $J = 7,6\text{ Hz}$ ), 1,57 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ -2,  $J = 7,6\text{ Hz}$  і  $J = 7,2\text{ Hz}$ ), 2,32 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,56 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ -1,  $J = 7,2\text{ Hz}$ ), 7,03 (с, 1H, H-9), 7,15 (д, 2H, H-3' і H-5',  $J = 7,6\text{ Hz}$ ), 7,58 (д, 2H,

H-2' і H-6',  $J = 7,6$  Hz), 7,72 (с, 1H, H-7), 11,27 (с, 1H, CONH), 11,93 (уш с, 2H, NH-2 і NH-4). МС (XI) = 406 (МН<sup>+</sup>).

**8-метил-3-оксо-N-піридин-2-ил-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]тріазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-6-карбоксамід (4.15).** Вихід: 67 мг (19 %),  $T_{пл} > 300$  °С. <sup>1</sup>H ЯМР: 2,26 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 6,96 (с, 1H, H-9), 7,11 (м, 2H, H-4' і H-5'), 7,67 (с, 1H, H-7), 8,25 (д, 1H, H-6'  $J = 7,2$  Hz), 8,38 (д, 1H, H-2'  $J = 8,0$  Hz), 11,14 (с, 1H, CONH), 11,72 (уш с, 1H, NH-4), 11,86 (уш с, 1H, NH-2). МС (CI) = 353 (МН<sup>+</sup>).

**8-метил-3-оксо-N-піридин-4-ил-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]тріазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-6-карбоксамід (4.16).** Вихід: 67 мг (19 %),  $T_{пл} > 300$  °С. <sup>1</sup>H ЯМР: 2,28 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,03 (с, 1H, H-9), 7,57 (д, 2H, H-2' і H-6',  $J = 8,0$  Hz), 7,71 (с, 1H, H-7), 8,03 (д, 2H, H-3' і H-5',  $J = 8,0$  Hz), 11,60 (с, 1H, CONH), 11,73 (уш с, 1H, NH-4), 11,85 (уш с, 1H, NH-2). МС (XI) = 353 (МН<sup>+</sup>).

**3-оксо-N-феніл-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]тріазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-8-карбоксамід (4.17).** Вихід: 169 мг (50 %),  $T_{пл} > 300$ °С, <sup>1</sup>H ЯМР: 7,03 (м, 2H, H-6 і H-4'), 7,27 (т, 2H, H-3' і H-5',  $J = 7,2$  Hz), 7,66 (м, 2H, H-7 і H-9), 7,72 (д, 2H, H-2' і H-6',  $J = 7,2$  Hz), 9,94 (с, 1H, CONH), 11,64 (уш с, 2H, NH-2 і NH-4). МС (XI) = 338 (МН<sup>+</sup>).

**3-оксо-N-[2-(трифлуорометил)феніл]-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]тріазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-8-карбоксамід (4.18).** Вихід: 118 мг (29 %),  $T_{пл} > 300$  °С. <sup>1</sup>H ЯМР: 7,01 (д, 1H, H-6,  $J = 7,6$  Hz), 7,35 (м, 2H, H-4' і H-5'), 7,60 (м, 2H, H-7 і H-9), 7,87 (м, 2H, H-2' і H-6'), 10,31 (с, 1H, CONH), 11,65 (уш с, 2H, NH-2 і NH-4). МС (XI) = 406 (МН<sup>+</sup>).

**3-оксо-N-[3-(трифлуорометил)феніл]-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]тріазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-8-карбоксамід (4.19).** Вихід: 134 мг (33 %),  $T_{пл} > 300$  °С. <sup>1</sup>H ЯМР: 7,07 (д, 1H, H-6,  $J = 7,6$  Hz), 7,32 (т, 1H, H-5',  $J = 8,0$  Hz), 7,49 (д, 1H, H-4',  $J = 8,0$  Hz), 7,67 (м, 2H, H-7 і H-9), 8,02 (д, 1H, H-6',  $J = 8,0$  Hz), 8,16 (с, 1H, H-2'), 10,25 (с, 1H, CONH), 11,65 (уш с, 2H, NH-2 і NH-4). МС (XI) = 406 (МН<sup>+</sup>).

**3-оксо-N-[4-(трифлуорометил)феніл]-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]тріазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-8-карбоксамід (4.20).** Вихід: 324 мг (80 %),  $T_{пл} > 300$  °С. <sup>1</sup>H ЯМР: 7,11 (д, 1H, H-6,  $J = 7,6$  Hz), 7,59 (д, 2H, H-3' і H-5',  $J = 8,8$  Hz), 7,71 (д,

1H, H-7, J = 7,6 Hz), 7,75 (с, 1H, H-9), 7,96 (д, 2H, H-2' і H-6', J = 8,8 Hz), 10,30 (с, 1H, CONH), 11,90 (уш с, 2H, NH-2 і NH-4). МС (ХІ) = 406 (МН<sup>+</sup>).

**3-оксо-N-[4-бутилфеніл]-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]триазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-8-карбоксамід (4.21).** Вихід: 322 мг (82 %), T<sub>пл</sub> > 300 °С. <sup>1</sup>H ЯМР: 0,94 (т, 3H, CH<sub>3</sub>, J = 7,2 Hz) 1,34 (м, 2H, CH<sub>2</sub>-3, J = 7,2 Hz і J = 7,6 Hz), 1,57 (м, 2H, CH<sub>2</sub>-2, J = 7,6 Hz і J = 7,2 Hz), 2,56 (т, 2H, CH<sub>2</sub>-1, J = 7,2 Hz), 7,15 (м, 3H, H-6, H-3' і H-5'), 7,63 (д, 2H, H-2' і H-6' J = 7,6 Hz), 7,72 (д, 1H, H-7, J = 8,0 Hz), 7,77 (с, 1H, H-9), 10,07 (с, 1H, CONH), 11,83 (уш с, 2H, NH-2 і NH-4). МС (ХІ) = 394 (МН<sup>+</sup>).

**3-оксо-N-піридин-2-ил-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]триазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-8-карбоксамід (4.22).** Вихід: 57 мг (17 %), T<sub>пл</sub> > 300 °С. <sup>1</sup>H ЯМР: 7,03 (д, 1H, H-6, J = 7,6 Hz), 7,62 (м, 2H, H-4' і H-5'), 7,73 (м, 2H, H-7 і H-9), 8,37 (м, 2H, H-3' і H-6'), 10,25 (с, 1H, CONH), 11,50 (уш с, 2H, NH-2 і NH-4). МС (ХІ) = 339 (МН<sup>+</sup>).

**3-оксо-N-піридин-4-ил-2,4-дигідро-2H-[1,2,4]триазино[5,6-b][1,4]бензотіазин-8-карбоксамід (4.23).** Вихід: 57 мг (17 %), T<sub>пл</sub> > 300 °С. <sup>1</sup>H ЯМР: 7,04 (д, 1H, H-6, J = 8,0 Hz), 7,60 (д, 2H, H-2' і H-6', J = 8,8 Hz), 7,71 (д, 1H, H-7, J = 8,0 Hz), 7,73 (с, 1H, H-9), 7,88 (д, 2H, H-3' і H-5', J = 8,8 Hz), 10,39 (с, 1H, CONH), 11,41 (уш с, 2H, NH-2 і NH-4). МС (ХІ) = 339 (МН<sup>+</sup>).

## РОЗДІЛ 3

### СИНТЕЗ НОВИХ ТГКК ТА ЇХНІХ АРИЛАМІДІВ

#### 3.1 Синтез 9-заміщених феназин-1-карбонових кислот та їхніх ариламідів

##### 3.1.1. Вибір замісників та їхнього положення для модифікації ФКК-1

Вибір класу ТГКК та їхніх похідних для пошуку нових біологічно активних сполук обумовлений властивостями відомих представників цього класу. Значна низка похідних ТГКК, включаючи природні вторинні бактерійні метаболіти, є біологічно активними сполуками. Структура таких сполук дозволяє отримання розгалужених комбінаторних бібліотек як по центральному гетероциклу, так і безпосередньо по карбоксильній групі. У свою чергу, карбоксамідний фрагмент може у багатьох випадках імітувати пептидний зв'язок з амінокислотним залишком та мати афінність до ензимів-мішеней. Планарна трициклічна ароматична будова центрального гетероциклу обумовлює можливість його взаємодії з нуклеїновими кислотами.

Одним з найвідоміших представників ТГКК є антибіотик бактерійного походження, вторинний метаболіт виділений з бактерій роду *Pseudomonas* та *Streptomyces* – феназин-1-карбонова кислота (ФКК-1), рис. 3.1. ФКК-1 є відомим інгібітором *Mycobacterium tuberculosis* [47], а її похідним притаманний широкий спектр біологічної активності [46]. Створення нових похідних ФКК-1 є шляхом як до підвищення активності відомих антибіотиків, так і до отримання сполук з якісно новими біологічними властивостями.

Як відомо, заміщення пері-положення різних ТГКК значно впливає як на рівень, так і на вид біологічної активності таких сполук, рис. 3.1 (детально описано в огляді літератури)

В роботі функціоналізація ФКК-1, а саме її 9-го положення – пері-положення, проводилася шляхом введення метильної та метоксильної груп. Такий вибір обґрунтований їхніми об'ємними та електроно-донорними

характеристиками. В літературному огляді показано що введення таких замісників в пері-положення значно підвищує рівень протипухлинної активності як алкіламідів ФКК-1 [42] так і алкіламідів інших ТГКК [48, 50, 60].

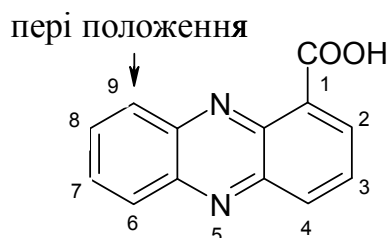
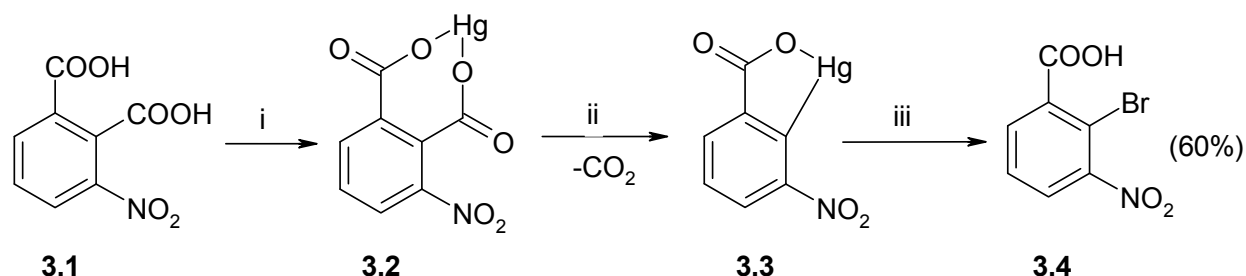


Рис. 3.1. Вибір положення для введення замісників

### 3.1.2. Синтез 9-заміщених ФФК-1

Для синтезу 9-заміщених ФКК-1 був обраний класичний підхід, який полягає у застосуванні реакції Жордана-Ульмана (схема 3.2) для синтезу проміжного продукту, з подальшою його циклізацією у феназиновий цикл.

Вихідна 2-бром-3-нітро бензойна кислота (**3.4**) синтезована у 3 стадії виходячи з 3-нітрофталевої кислоти (**3.1**), схема 3.1.



i) NaOH, Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; ii) кип. 100 год.; iii) 1) NaBr, Br<sub>2</sub> 60°C, 2) HCl<sub>k</sub>.

Схема 3.1. Синтез 2-бром-3-нітробензойної кислоти.

На першій стадії 3-нітрофталева кислота (**3.1**) була переведена в її нерозчинну меркурову сіль (**3.2**). Під час кип'ятіння у воді сполуки **3.2** відбувається відщеплення молекули CO<sub>2</sub> і утворення внутрішньо-молекулярної солі (**3.3**), яка при бромуванні (бром в насиченому водному розчині броміду натрію) перетворюється на кінцевий продукт – 2-бром-3-нітробензойною кислотою (**3.4**) з виходом 60 % (в перерахунку на 3-нітрофталеву кислоту (**3.1**)). Слід зазначити,

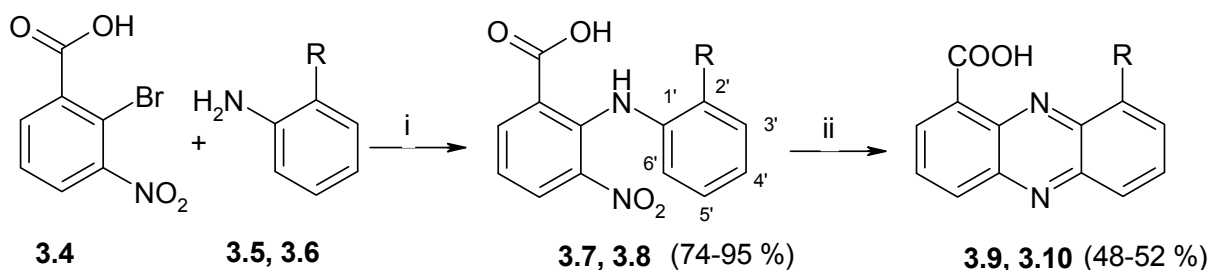


що процес утворення внутрішньо-молекулярної солі з виділенням вуглекислого газу супроводжується активним піноутворенням, тому реакцію проводили при постійному і енергійному перемішуванні. Для виділення цільового продукту **3.4** до реакційної суміші додавали великий надлишок концентрованої соляної кислоти. За цих умов утворюються водорозчинні комплексні солі ртуті, а цільова 2-бром-3-нітробензойна кислота (**3.4**) випадає в осад чистою і, загалом, не потребує перекристалізації для подальшого використання. Після обробки фільтрату розчином гідроксиду натрію в осад випадає оксид ртуті, який може бути використаний повторно.

Надалі, в умовах реакції Жордана-Ульмана, при арилюванні 2-бром-3-нітробензойної кислоти (**3.4**) відповідними *орто*-заміщеними анілінами (**3.5**, **3.6**) отримано N-(2-метилфеніл)- та N-(2-метоксифеніл)-3-нітроантранілові кислоти (**3.7**, **3.8**) – з виходами – 95 % та 74 % відповідно, схема 3.2.

Реакцію проводили у розчині ДМФА з використанням свіжепрокаленого карбонату калію, як основи, а також каталітичної кількості свіжеотриманого хлориду одновалентної міді. Хід реакції контролювали за допомогою тонкошарової хроматографії (елюент – суміш хлороформ-метанол, 9:1). Після завершення реакції розчин підкислюють розведеною соляною кислотою. Цільові антранілові кислоти випадали в осад який фільтрували, промивали розведеною соляною кислотою і водою, сушили та кристалізували з етилового спирту.

На наступному етапі проводили внутрішньо-молекулярну конденсацію арилпохідних нітроантранілових кислот (**3.7**, **3.8**) у розчині етилового спирту в присутності етилату натрію та  $\text{NaBH}_4$  (схема 3.2). За цих умов вихід цільової 9-метокси-ФКК-1 становив 52 % і був дещо вищим, ніж такий у разі 9-метил-ФКК-1 (45 %). Вірогідно на задовільний перебіг циклізації окрім ефективного відновлення нітрогрупи та активування атому гідрогену в положенні 6', впливає природа замісника у 2' положенні.



R= OMe: 3.5, 3.7, 3.9

R= Me: 3.6, 3.8, 3.10

i) 1)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CuCl}$ , ДМФА; 2)  $\text{HCl}_\text{к}$ . ii) 1)  $\text{EtONa}$ ,  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{EtOH}$ , кип; 4 год; 2)  $\text{HCl}_\text{к}$ .

### Схема 3.2. Синтез 9-заміщених ФКК-1

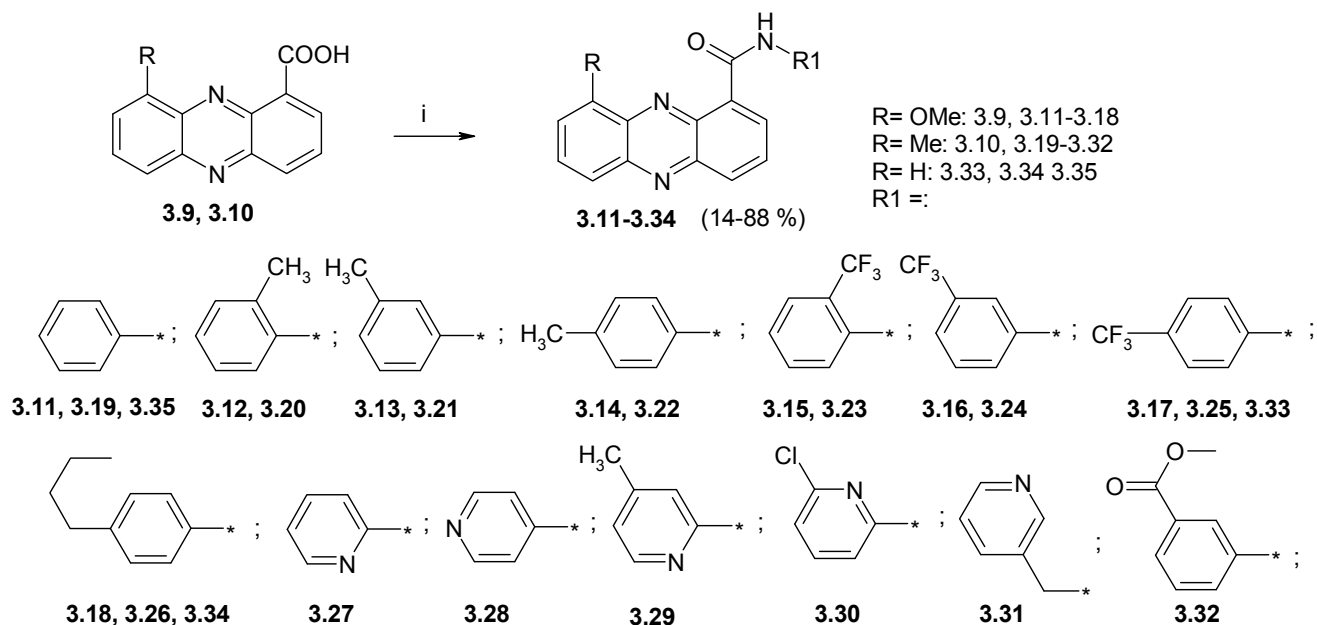
Слід зазначити, що циклізацію N-(2-метоксифеніл)-3-нітроантранілової кислоти (**3.7**) новозеландські вчені проводили у розчині метилового спирту для запобігання переестерифікації метоксигрупи в етоксигрупу, що знижувало температуру реакції з 78 °C до 54 °C, однак за таких умов вихід продукту реакції складав 33 % [42]. Натомість, за використання етилового спирту в присутності етилату натрію та  $\text{NaBH}_4$  під час реакції не виявлено жодних продуктів переестерифікації (ТШХ, ПМР) та вдалося збільшити вихід цільового продукту майже у 2 рази.

#### 3.1.3. Синтез ариламідів 9-заміщених феназин-1-карбонових кислот

Традиційно для одержання функціональних похідних карбонових кислот (гідразидів, амідів, алкіл амідів) використовують їхні естери. Проте ацилююча здатність естерів значно знижується при переході від алкільних до менш основних ароматичних та гетероциклічних амінів. У зв'язку з цим застосовувався метод, що полягає у отриманні *in situ* активованого синтону ФКК-1, а саме хлорангідриду (хлористий тіоніл у середовищі апротонного розчинника за присутності акцептора хлористого водню – піридину), який безпосередньо конденсували з надлишком відповідного аміну (схема 3.3).

Реакційну суміш, що містила хлорангідрид та ариламід в розчині піридину, залишали за 60 °C на 12 годин, після чого розбавляли водою, промивали розчином соляної кислоти (щоб позбутися залишків амінів та піридину), а потім розведеним

розчином гідроксиду натрію (щоб позбутися надлишків кислоти). Цільові сполуки кристалізували з суміші *n*-бутанол-ДМСО 19:1.



i) 1)  $\text{PhCH}_3$ ,  $\text{SOCl}_2$ , Py, 40 °C, 1 год; 2)  $\text{R}_1\text{NH}_2$ , 60 °C, 3 год.

Схема 3.3. Синтез ариламідів 9-заміщених ФКК-1.

Одержані сполуки – дрібнокристалічні, забарвлені речовини з високими температурами плавлення, обмежено розчинні у воді та етиловому спирті, натомість добре розчинні у ДМСО та ДМФА. Загалом було синтезовано 24 сполуки в ряду 9-заміщених ФКК-1 та їхніх ариламідів. Арильні фрагменти обох серій сполук представлені ароматичними системами з різними екзоциклічними групами ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ , Cl та ін.) у різних положеннях кільця. Всі синтезовані ариламідів є не описаними сполуками і були вперше синтезовані автором роботи.

#### 3.1.4. Характеристика спектрів $^1\text{H}$ ЯМР ариламідів 9-заміщених ФКК-1

При розгляді спектрів  $^1\text{H}$  ЯМР отриманих ариламідів було встановлено, що положення амідного протону (NH) сильно зміщене у слабке поле. Так, для похідних 9-метил-ФКК-1 сигнал знаходиться у межах 11,08-13,51 м.ч., а для похідних 9-метокси-ФКК-1 у межах 12,67-14,02 м.ч. Даний факт може бути поясненим утворенням внутрішньомолекулярного Н-зв'язку зв'язку (рис. 3.2) між

амідним атомом водню та атомом азоту феназинового гетероциклу у розчині ДМСО-d<sub>6</sub>, в якому були записані спектри <sup>1</sup>H ЯМР.

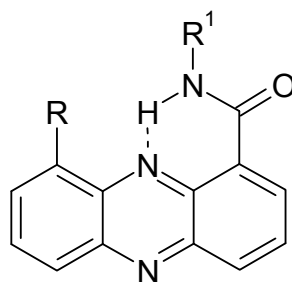


Рис. 3.2. Утворення внутрішньомолекулярного Н-зв'язку зв'язку у ариламідах ФКК-1.

Слід зауважити, що зсув сигналу амідного протону в слабке поле є результатом сукупного впливу замісників як феназинового гетероциклу, так і карбоксамідного фрагмента. Тому загалом сигнал амідного протону у 9-метокси похідних знаходиться у більш слабкому полі у порівнянні з аналогічними 9-метил арилкарбоксамідами.

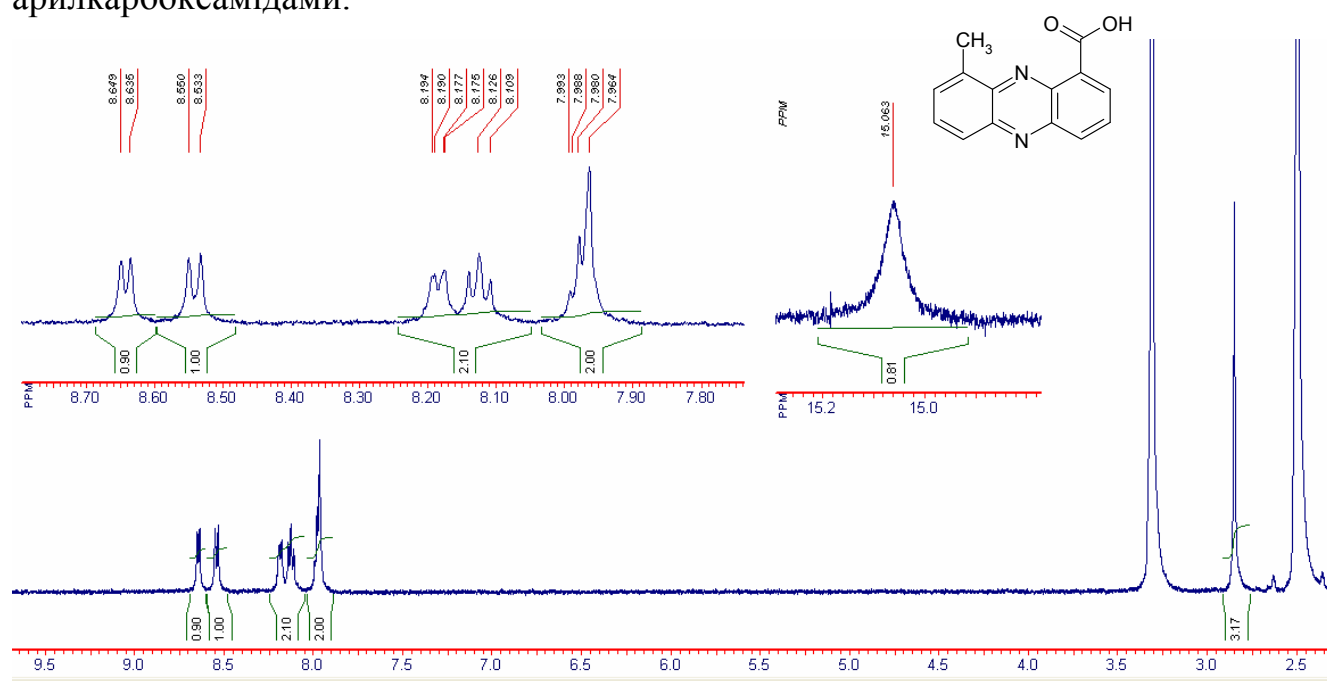


Рис 3.3. <sup>1</sup>H ЯМР спектр 9-метил-ФКК-1 (3.10).

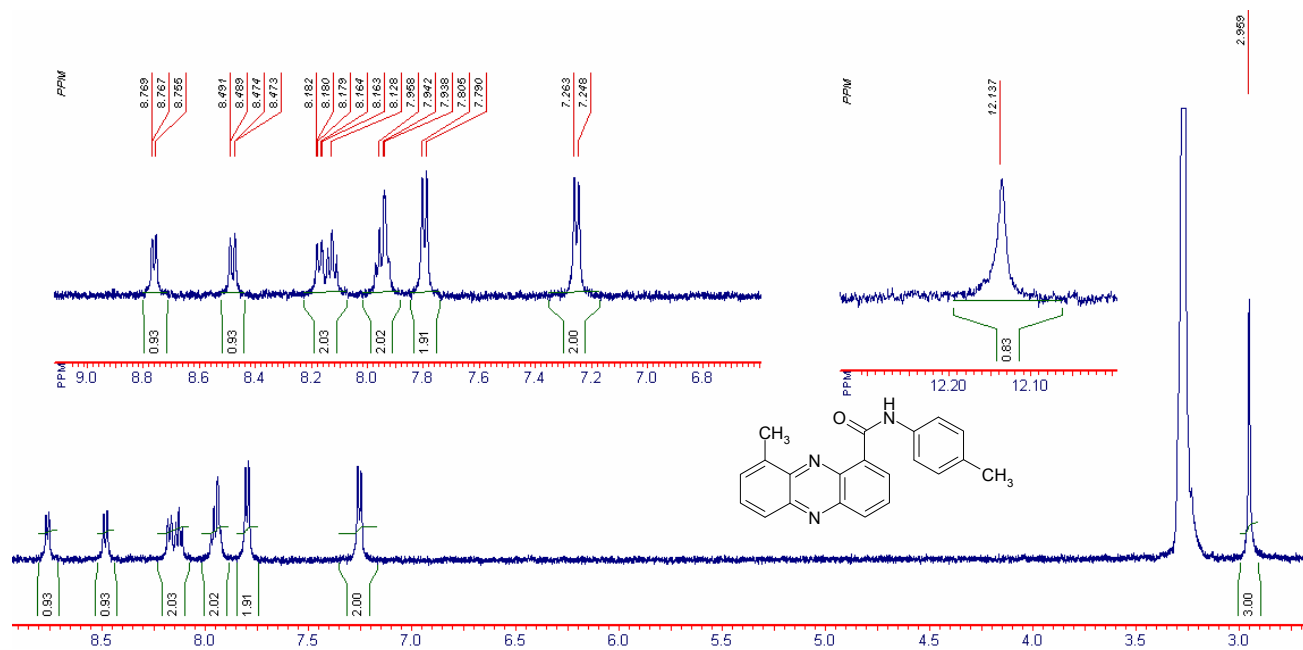


Рис 3.4. <sup>1</sup>H ЯМР спектр *пара*-метилфеніламіду 9-метил-ФКК-1 (3.22).

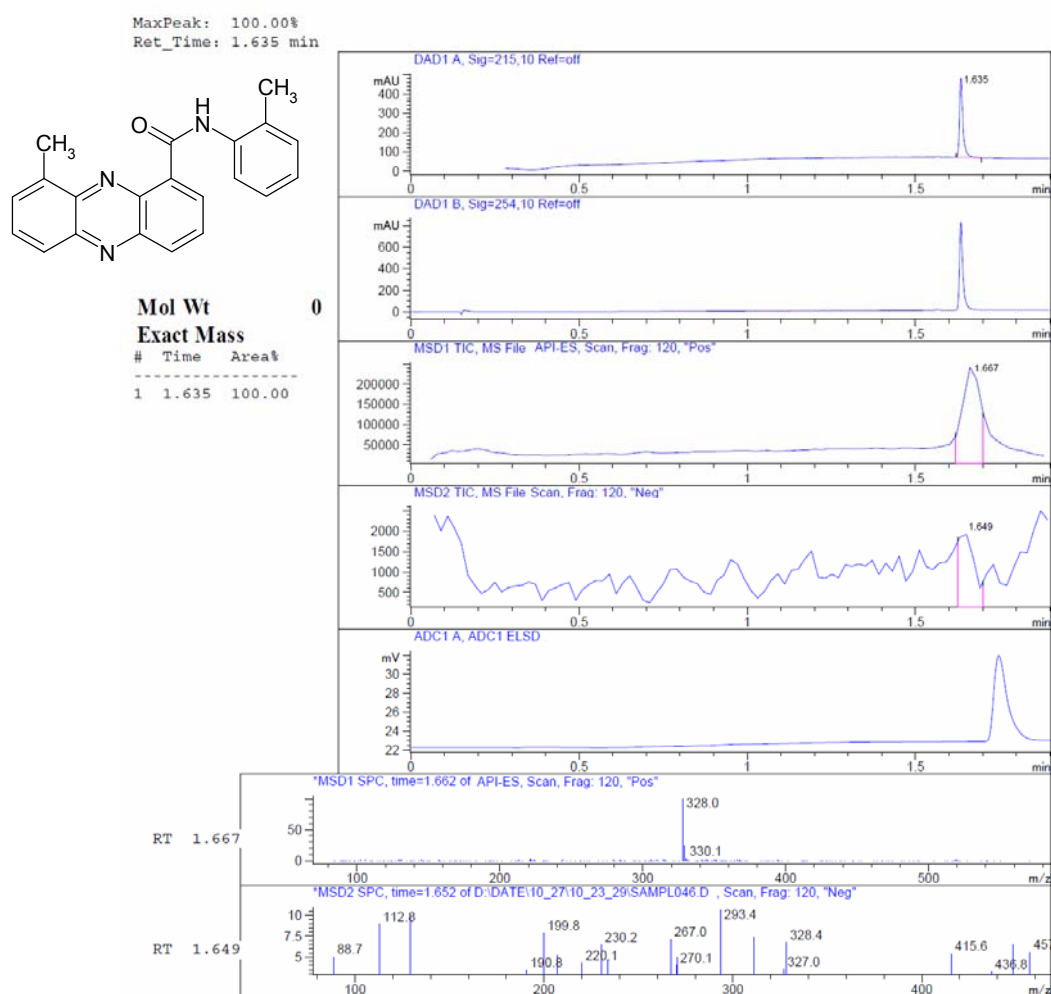


Рис 3.5. Хроматомас спектр *орто*-метилфеніламіду 9-метил ФКК-1 (3.20).

### 3.2. Синтез 8-метил-ТБТ-6-та ТБТ-8-карбонових кислот та їхніх ариламідів

#### 3.2.1. Вибір положення для введення карбоксильної групи

Триазинобензотіазиновий гетероцикл (ТБТ) – відносно нова синтетична основа, яка не є природним метаболітом (рис 3.6.Б). Цю структуру можна віднести до біоізостерів ізоалоксазинового циклу (рис. 3.6.А), який входить до складу відомих коферментів, у тому числі рибофлавіну - вітаміну В2.

Список сполук на основі ТБТ містить нечислену низку алкіл-, галоїд- та глікозидних похідних серед яких виявлено сполуки з антивірусною дією щодо вірусів Епштейн Бара та простого герпесу. Слід зазначити що вибрані похідні ТБТ є інгібіторами синтезу РНК [121].

З іншого боку, ТБТ гетероцикл, до деякої міри, є структурно подібним до феназину (рис 3.6.В) та акридину – наявність незаміщеного бензольного циклу та присутність атому азоту у центральному кільці. Ці характеристики дозволяють створити ТБТ-карбонові кислоти аналогічні таким для феназину, акридину та іншим гетероароматичним трициклам.

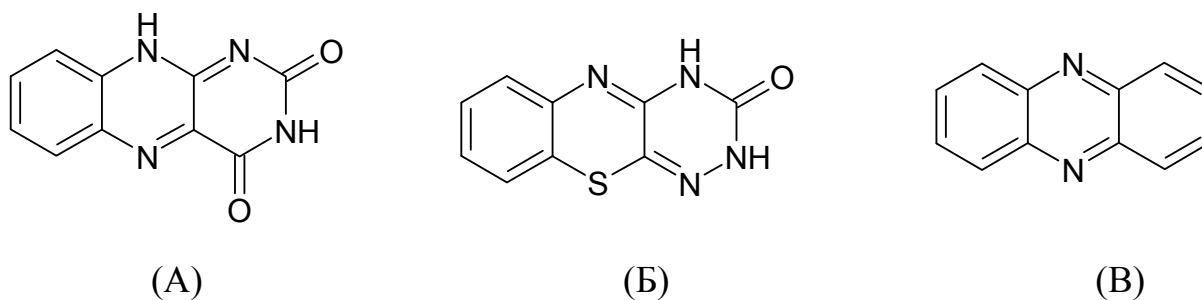


Рис. 3.6. Ізоалоксазин (А), тритазинобензотіазин (Б) та феназин (В).

Карбоксильну групу вводили у два положення, рис 3.7. Шосте – класичне «пері-положення», аналогічне до такого в ФКК-1, та інших біологічно активних похідних ТГКК. І в восьме, так як заміщенні в це положення похідні ТБТ демонструють найвищу активність [121]. За обраною методикою синтезу при введенні карбоксильної групи у 6-е положення у 8-му положенні має бути замісник, в якості якого було обрано метильну групу (рис. 3.7.А).

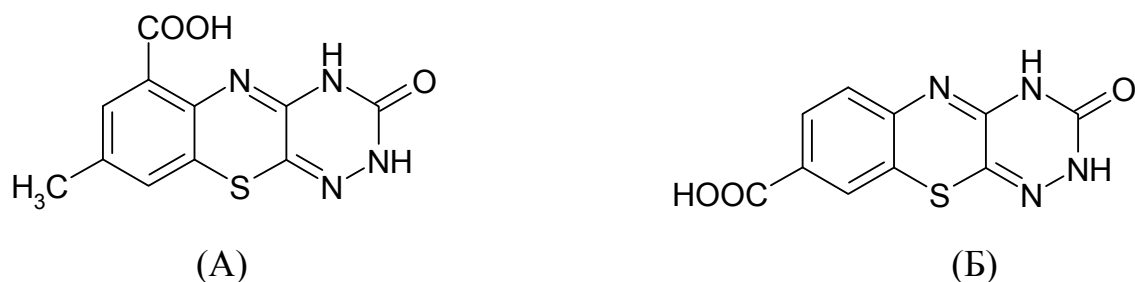
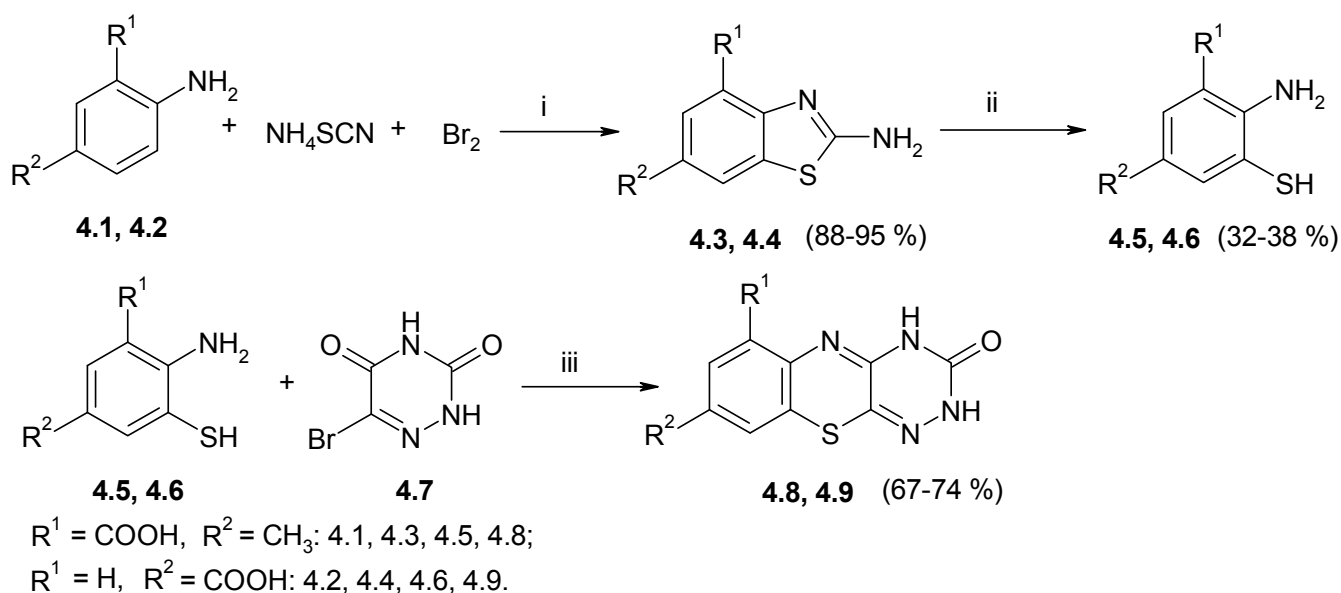


Рис. 3.7. ТБТКК вибрані для синтезу. А – 8-метил-ТБТ-6-КК; Б – ТБТ-8-КК.

### 3.2.2. Синтез 8-метил-ТБТ-6 та ТБТ-8 карбонових кислот

Синтез триазинобензотіазинкарбонових кислот (ТБТКК) (**4.8**, **4.9**) здійснювали за схемою, запропонованою у роботі українських вчених, а саме – аелюванням *o*-амінотіофенолів 5-бром-6-азаурацилом (**4.7**), схема 3.4 [121].

Для синтезу таким шляхом необхідно було синтезувати раніше не описані *o*-амінотіофенолбензойні кислоти (**4.5**, **4.6**). Вони були синтезовані за модифікованим методом запропонованим для отримання різноманітних *o*-амінотіофенолів, шляхом лужного гідролізу 2-амінобензотіазолів, схема 3.4 [122].



i)  $\text{AcOH}$ , 5-10 °C 2 год; ii) 1)  $\text{KOH}$  кип. 30 год; 2)  $\text{AcOH}$ ; iii) ДМФА 120 °C, 1 год.

Схема 3.4. Синтез *o*-амінотіофенолбензойних та ТБТ карбонових кислот.

На першій стадії амінобензойні кислоти **4.1** та **4.2** перетворювали з високими виходами (понад 85 %) у 2-амінобензотіазолкарбонові кислоти **4.3** та **4.4**. Останні під час тривалого гідролізу у концентрованому розчині гідроксиду

калію і подальшому підкисленні льодяною оцтовою кислотою перетворюються на цільові *орто*-амінотіофенолкарбонові кислоти **4.5** та **4.6**. Повільний гідроліз вихідних сполук **4.3** і **4.4** та окислення продуктів **4.5** і **4.6** перешкоджає кількісному отриманню бажаних продуктів. Проведення гідролізу в інертній атмосфері дозволяє збільшити виходи цільових *орто*-амінотіофенолкарбонових кислот **4.5** та **4.6** у 2 рази до 32 % та 38 %, відповідно. Сполуки **4.5** та **4.6** – жовті кристалічні речовини з температурою плавлення 126-128 °С та 110-111 °С, відповідно.

На наступній стадії *о*-амінотіофенол-карбонові кислоти циклізували з 5-бром-6-азаурацилом (**4.7**) при нагріванні в розчині ДМФА за 120 °С. Протікання реакції контролювали за допомогою ТШХ. Суміш нагрівали до припинення фіксації проміжного продукту (незациклізованої форми) на хроматографічних пластинах. Після охолодження реакційної суміші до кімнатної температури ТБТКК випадають в осад, який фільтрували і промивали на фільтрі холодним ДМФА і водою. Шукані ТБТКК були чистими і не потребували подальшої очистки. Виходи цільових продуктів становили 74 % для **4.8** та 67 % для **4.9**, відповідно. ТБТКК нерозчинні у воді та етиловому спирті, слабкорозчинні в ДМФА та добре розчинні у ДМСО тугоплавкі сполуки, забарвлені у яскравий жовтий колір.

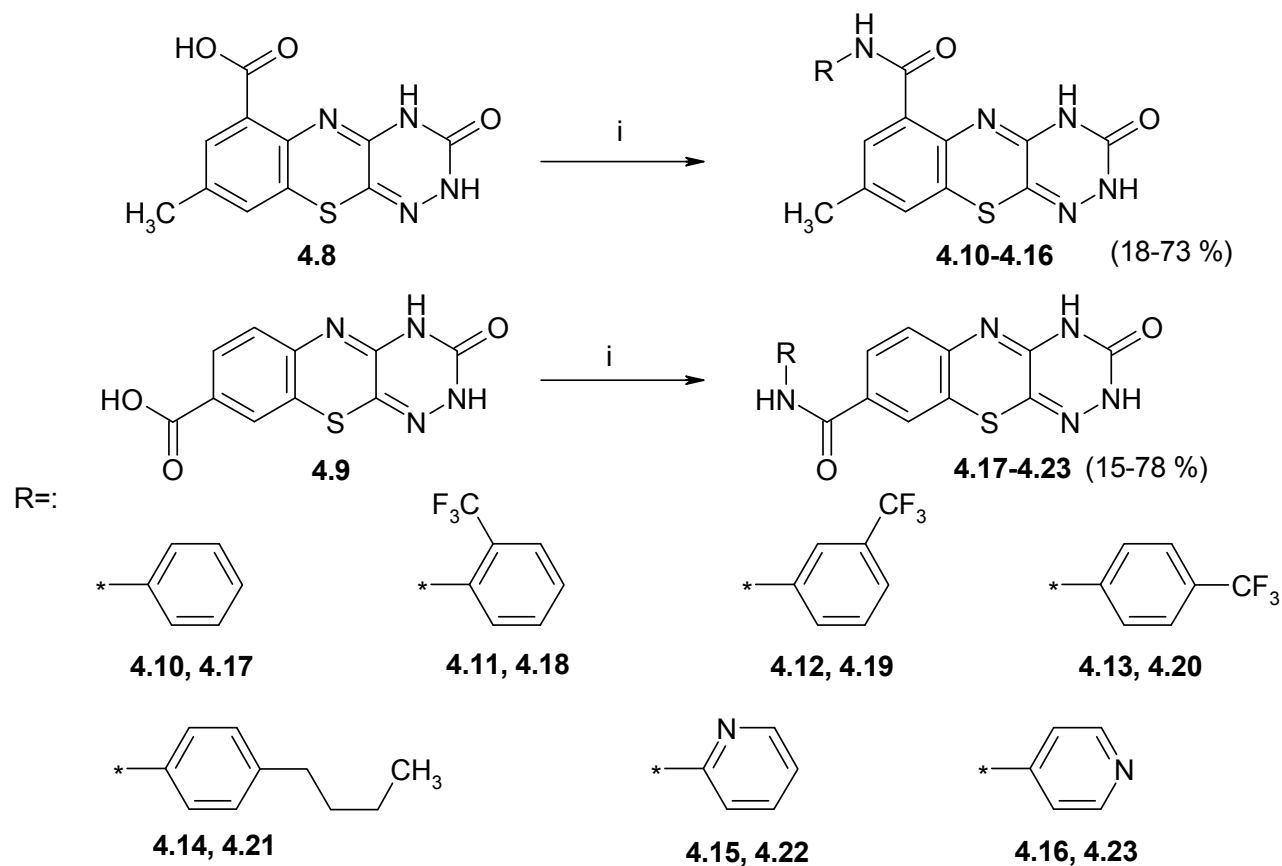
### 3.2.3 Синтез ариламідів 8-метил-ТБТ-6- та ТБТ-8-карбонових кислот

N-Арилами́ди триазинобензотіазинкарбонових кислот (**4.10-4.23**) синтезували через стадію утворення відповідних хлорангідридів, Схема 3.5.

Одержані сполуки – дрібнокристалічні, забарвлені речовини з високими температурами плавлення, обмежено розчинні у воді та етиловому спирті, добре розчинні у ДМСО та ДМФА. Слід відмітити, що ТБТКК виявилися дуже інертними, і не перетворюються на аміді із застосуванням звичайних конденсуючих агентів, наприклад КДІ, а утворення хлорангідридів відбувалося при тривалому кип'ятінні в розчині хлористого тіонілу. Слід зазначити, що атом оксисену в положенні 3 гетероциклу не заміщується на атом хлору при кип'ятінні



в хлористому тіонілі, що доведено методами маспектрометрії, утворенням вихідних кислот при гідролізі хлорангідридів та негативною пробою за Бельштейном отриманих ариламідів, що не містили атомів галогену в амідному фрагменті.



i) 1) SOCl<sub>2</sub> кип. 4 год.; 2) NH<sub>2</sub>R, Py, 60 °C, 1 год.; 3) HCl; 4) NH<sub>4</sub>OH.

Схема 3.5. Синтез арилкарбоксамідів 8-метил-ТБТ-6- і ТБТ-8-карбонових кислот.

### 3.2.4 Таутомерні форми ТБТ та особливості спектрів <sup>1</sup>H ЯМР

Наявність чотирьох атомів азоту, два з яких зв'язані з гідрогенами провокує існування декількох таутомерних форм для молекули ТБТ, рис. 3.8.

Так за даними <sup>1</sup>H ЯМР спектрів сигнали карбоксильних протонів спостерігаються для 8-метил-ТБТ-6-КК при 15,26 м.ч., а для ТБТ-8-КК при 12,57 м.ч. Значний слабопільний зсув для 8-метил-ТБТ-6-КК вказує на виразну схильність до утворення внутрішньомолекулярного Н-зв'язку між карбоксильним протоном та циклічним атомом нітрогену N5 триазинобензотіазинового циклу, рис 3.9.

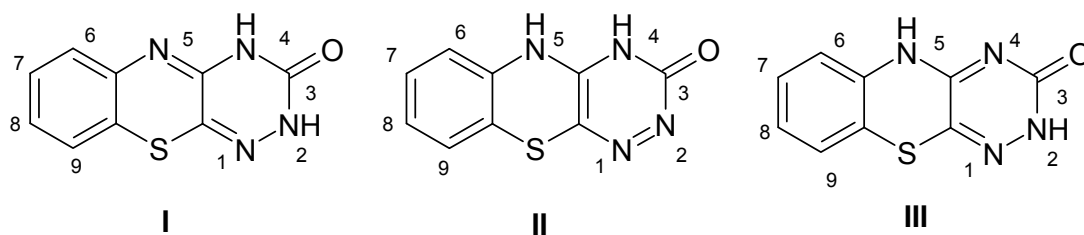


Рис. 3.8. Таутомерні форми ТБТ.

Сигнал амідного протону для амідів ТБТ-6-КК також знаходиться у більш слабому полі (11,27-11,86 м.ч.), а ніж у амідів ТБТ-8-КК (9,94-10,36 м.ч.). Така різниця у положенні сигналу амідного протону вказує на утворення внутрішньомолекулярного зв'язку між амідним протоном та N5 атомом азоту триазинобензотіазинового ядра для амідів ТБТ-6-КК, рис 3.9.

Сигнали протонів при N2 і N4 атомах азоту у разі 8-метил-ТБТ-6-КК реєструються як синглет в області 11,84 м.ч., а для ТБТ-8-КК аналогічний сигнал більш зсунутий у слабке поле – 12,11 м.ч.. Це може бути пояснене присутністю метильної групи, що зменшує негативний індуктивний ефект карбоксильної групи для 8-метил-ТБТ-6-КК. Вплив метильної групи є менш помітним у випадку арилкарбоксамідів ТБТ. Так для 8-метил-ТБТ-6-карбоксамідів сигнали лежать в області 11,71-11,93 м.ч., тоді як для ТБТ-8-карбоксамідів в межах 11,41-11,93 м.ч.

Таким чином, для 8-метил-ТБТ-6- та ТБТ-8-КК і їхніх ариламідів реалізується структура, що відповідає таутомерній формі **I**, рис 3.8. Для 8-метил-ТБТ-6-КК та її ариламідів притаманні структури **IV** та **V**, де реалізуються внутрішньомолекулярний Н-зв'язок, а для ТБТ-8-КК та її ариламідів структури – **VI** та **VII**, будова яких унеможлиблює утворення такого Н- зв'язку, рис. 3.9.

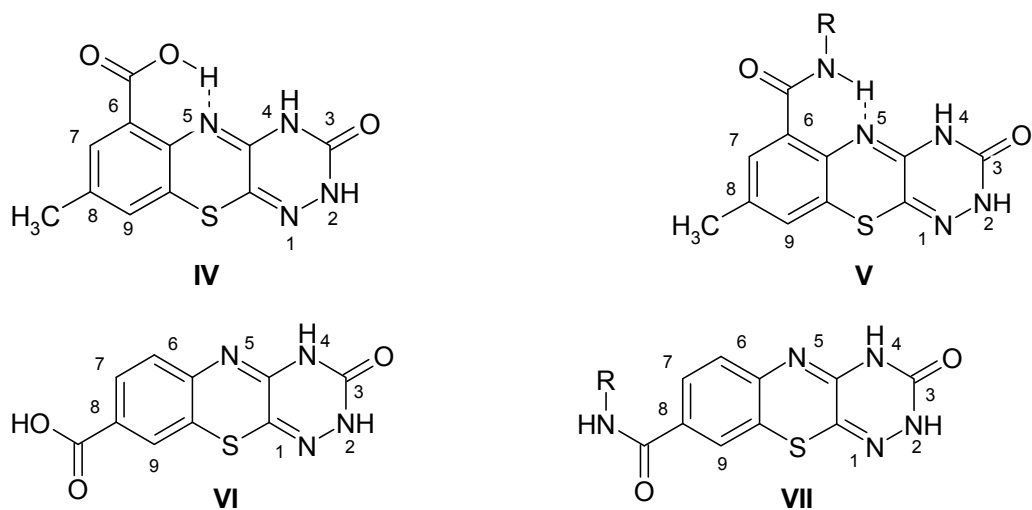


Рис. 3.9. Таутомерні форми 8-метил-ТБТ-6- і ТБТ-8-КК (IV, VI) та їхніх N-ариламідів (V і VII). Пунктиром позначено внутрішньомолекулярні Н-зв'язки.

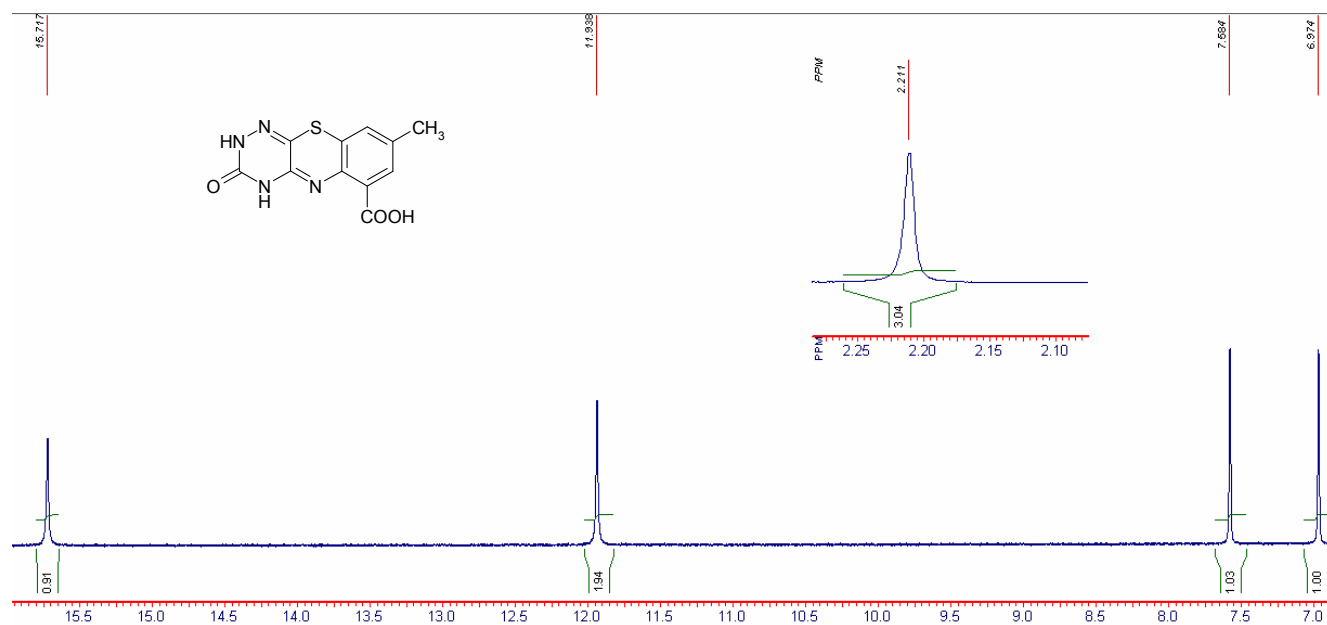


Рис 3.10. Рис 3.4. <sup>1</sup>Н ЯМР спектр 8-метил-ТБТ-6-КК (4.8).

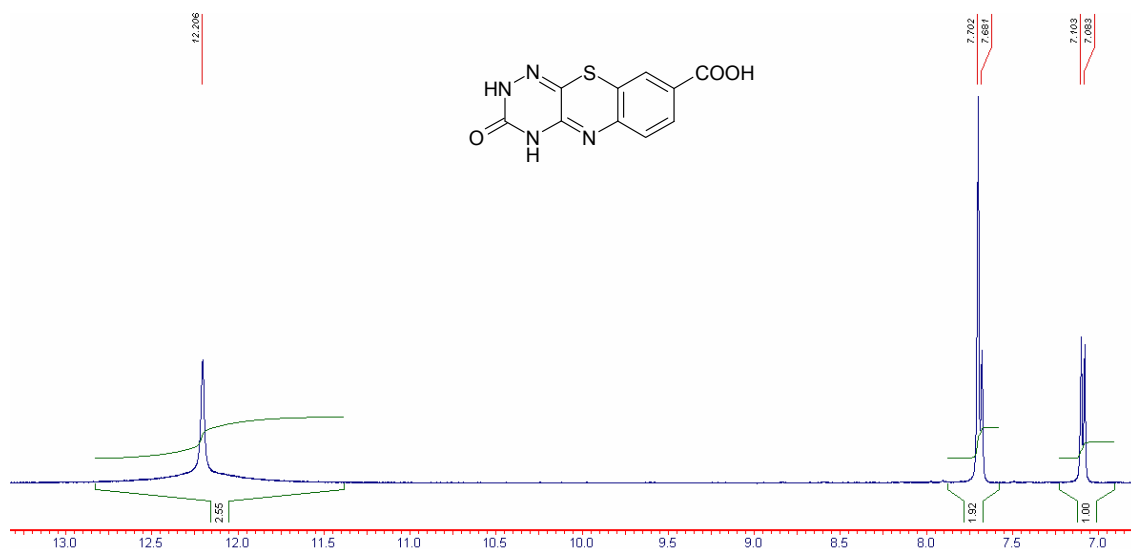
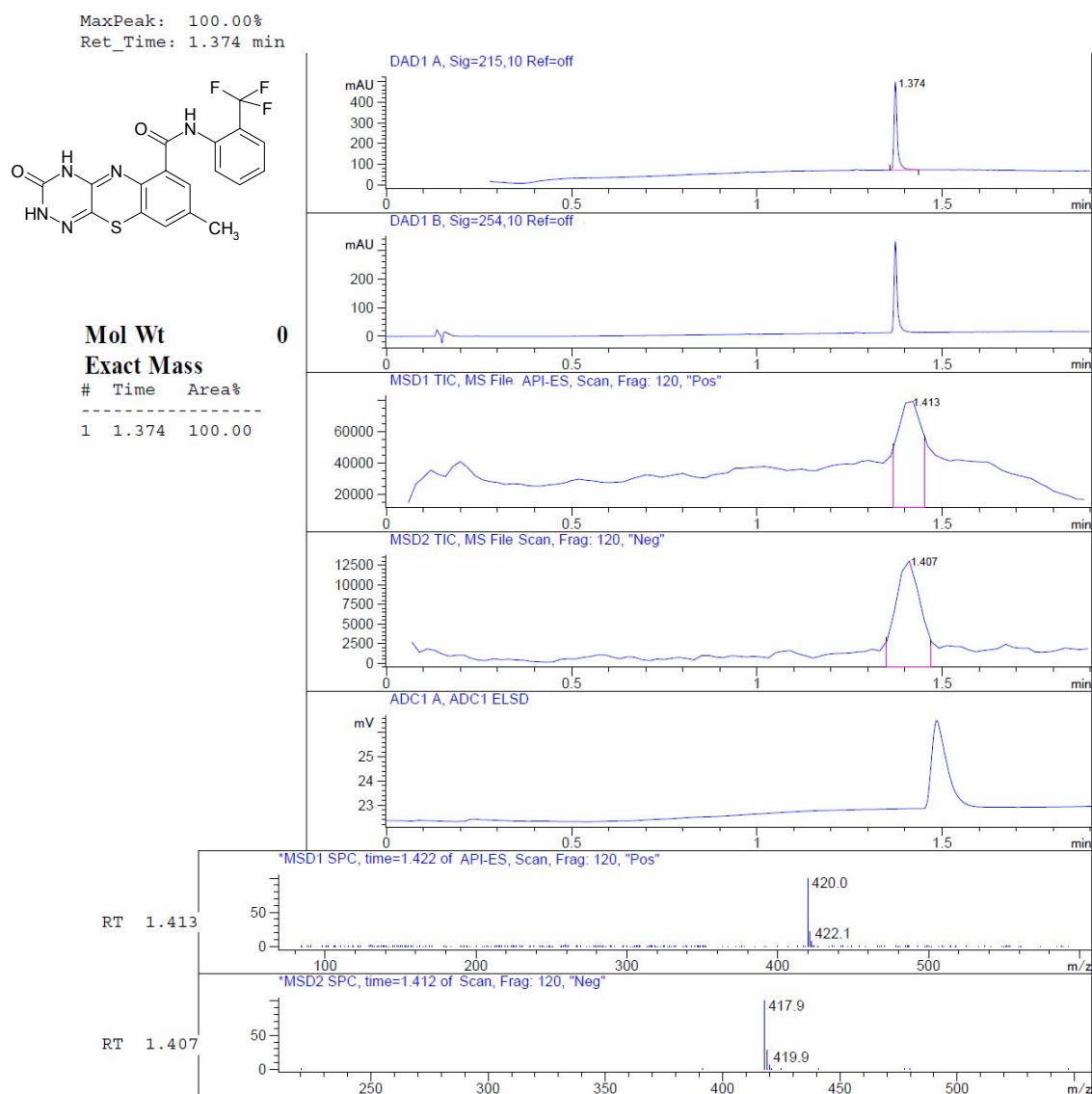
Рис 3.11. Рис 3.4. <sup>1</sup>H ЯМР спектр ТБТ-8-КК (4.9).

Рис 3.12. Хроматомас спектр сполуки 4.11.

### Висновки:

1. Вдосконаленим зручним методом синтезу одержано дві серії ариламідів 9-метил- та 9-метоксифеназин-1-карбонових кислот.
2. Розроблено препаративний метод отримання *орто*-амінотіофенолкарбонових кислот – вихідних «білдінг-блоків» для синтезу трициклічних карбонових кислот.
3. Синтезовано дві серії ариламідів 8-метилтриазинобензотіазин-6- та триазинобензотіазин-8 карбонових кислот.
4. Фізикохімічними методами аналізу підтверджено будову і чистоту синтезованих сполук.

*Основні наукові результати розділу опубліковані в працях:*

Конструювання інгібіторів транскрипції на основі N-ариламідів 9-метил-та 9-метоксифеназин-1-карбонових кислот / Пальчиковська Л. Г., Васильченко О. В., Платонов М. О., Костіна В. Г., Лисенко Н. А., Алексєєва І. В., Говорун Д. М., Швед А. Д. // Укр. біохім. журн. – 2011, – т. 83. № 2. – С. 65-73.

Нові інгібітори транскрипції на основі N-ариламідів 8-метил-триазинобензотіазин-6- і триазинобензотіазин-8-карбонових кислот: синтез і докінг / Васильченко О.В., Платонов М.О., Говорун Д. М., Пальчиковська Л.Г. // *Ukrainica Bioorganica Acta.* – 2012. – Vol. 2.. – P. 30-38.

## РОЗДІЛ 4

### ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ТГКК ТА ЇХНІХ АРИЛАМІДІВ

Дослідження біологічної активності сполук здійснювали у різний спосіб і на моделях різної складності, а саме у ферментативній тест-системі та на клітинних моделях бактерійних та вірусних інфекцій.

#### 4.1 Визначення впливу синтезованих сполук на синтез РНК *in vitro*

Для селекції інгібіторів синтезу РНК було обрано просту у застосуванні та продуктивну модельну систему транскрипції на основі ДНК-залежної РНК-полімерази фагу Т7 (РНКП Т7). Використання РНКП Т7 як синтезуючого ферменту, обумовлено тим, що ця односубодинична «міні-РНК-полімераза», відтворює повний транскрипційний цикл, не потребуючи додаткових білкових факторів на відміну не тільки від еукаріотичних, але й багатьох прокаріотичних багатосубодиничних полімераз. Крім того, кількість РНК-продукту цієї реакції настільки значна, що візуалізація синтезованих транскриптів не потребує використання радіоактивного мічення [47]. Вибір цієї системи вважається доцільним ще й з огляду на те, що клітинна система транскрипції є однією з головних мішеней антимікробної та противірусної терапії.

Ця модельна система з успіхом неодноразово використовувалася для виявлення ефективних інгібіторів транскрипції – антимікробних та/або антивірусних агентів [123, 124].

Відомо, що прямої кореляції між структурою різноманітних полімераз не має. Проте для всіх полімераз є схожі структурні фрагменти [125] також вони мають однаковий механізм зчитування інформації, а також ідентичний механізм утворення фосфодіестерного зв'язку. Такі подібності в структурі та механізмі роботи дозволяють припускати, що речовини, які активно впливають на роботу

однієї полімерази, можуть впливати і на роботу інших представників цього класу ферментів.

Первинне тестування синтезованих сполук проводили за концентрації 25 мкг/мл (70-90 мкМ залежно від структури). Для активних сполук визначали значення  $IC_{50}$  методом подвійних розведень. В якості агенту порівняння використовували відомий інгібітор транскрипції – актиноміцин D ( $IC_{50} = 0,85$  мкМ).

#### *4.1.1. Дослідження впливу 9-заміщених ФКК-1 та їхніх ариламідів на синтез РНК in vitro*

Для феназинових антибіотиків характерним є множинний механізм біологічної дії. Вони легко проникають у клітину бактерії, де долучаються до окисно-відновлювальних процесів [126, 127], перетворюючись на відносно стабільні аніони. Останні генерують утворення активних форм кисню ( $O_2^-$ ,  $OH^-$  і  $H_2O_2$ ), які пригнічують функціонування супероксиддисмутази та індукують окислювальний стрес і в подальшому загибель мікроорганізму.

Окрім того, планарні ароматичні похідні феназину – антибіотики іодінін, муксін, піоціанін здатні взаємодіяти з ДНК/РНК [128]. Показано також, що феназинові антибіотики інгібують ДНК-залежний синтез РНК не тільки внаслідок блокування ДНК-матриці через інтеркаляцію, але й завдяки взаємодії з РНК-полімеразою та/або з рибонуклеозид-3'-фосфатами [129-131]. Тому новосинтезовані сполуки досліджувалися на здатність пригнічувати ДНК-залежний синтез РНК.

За результатами скринінгу з 24 синтезованих сполук 15 достовірно інгібують синтез РНК у модельній транскрипційній системі РНКП Т7 у межах значень  $IC_{50}$  від 38,3 до 0,48 мкМ, таблиця 4.1. Найефективнішим є *n*-бутилфеніламід-9-метил-ФКК-1 (**3.26**) зі значенням  $IC_{50} = 0,48$  мкМ. Високу активність продемонстрували також піридин-4-ил-амід- (**3.28**) та *m*-карбометоксифеніламід- (**3.32**) 9-метил-ФКК-1 зі значенням  $IC_{50}$  рівним 9,6 та 16,2 мкМ, відповідно.

Таблиця 4.1.

Значення  $IC_{50}$  (мкМ) 9-заміщених ФКК-1 та їхніх ариламідів як інгібіторів синтезу РНК *in vitro*

№ Сполуки	$IC_{50}$ РНКП Т7	№ Сполуки	$IC_{50}$ РНКП Т7	№ Сполуки	$IC_{50}$ РНКП Т7
<b>3.9</b>	— <sup>*</sup>	<b>3.17</b>	—	<b>3.25</b>	$32,8 \pm 5$
<b>3.10</b>	$37,8 \pm 5$	<b>3.18</b>	$31,2 \pm 4$	<b>3.26</b>	$0,48 \pm 0,1$
<b>3.11</b>	$30,4 \pm 5$	<b>3.19</b>	$38,3 \pm 5$	<b>3.27</b>	$28,7 \pm 4$
<b>3.12</b>	$30,4 \pm 5$	<b>3.20</b>	$32,1 \pm 5$	<b>3.28</b>	$9,6 \pm 2$
<b>3.13</b>	—	<b>3.21</b>	$26,0 \pm 4$	<b>3.29</b>	$\sim 61$
<b>3.14</b>	—	<b>3.22</b>	—	<b>3.30</b>	$\sim 57$
<b>3.15</b>	$\sim 63$	<b>3.23</b>	$36,7 \pm 5$	<b>3.31</b>	—
<b>3.16</b>	$25,2 \pm 4$	<b>3.24</b>	$28,9 \pm 4$	<b>3.32</b>	$16,2 \pm 3$

\* — сполука не активна за початкової концентрації

На рис. 4.1 наведені фотографії гель електрофорезів результатів реакції транскрипції за присутності ариламідів 9-заміщених ФКК-1.

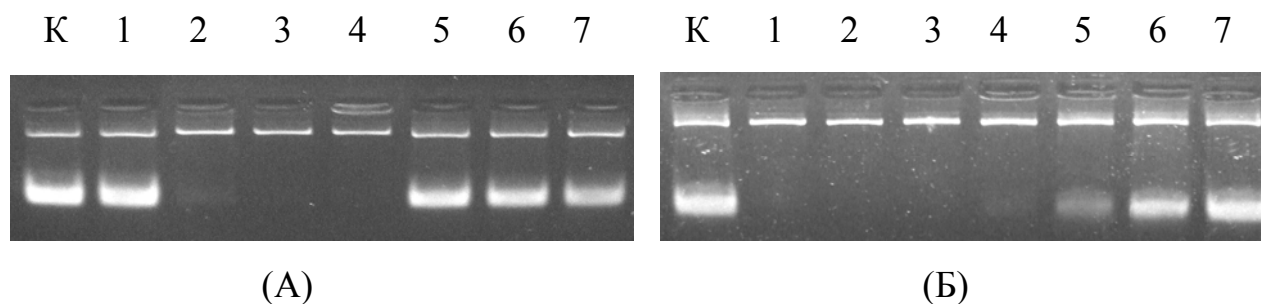


Рис. 4.1. Фотографії гель-електрофорезів результатів транскрипції *in vitro* (РНКП Т7). Верхня смужка ДНК-матриця, нижня — РНК-продукт. Відсутність РНК-продукту свідчить про інгібування реакції транскрипції.

(А): К — позитивний контроль за присутності ДМСО; доріжки 1–7 реакція в присутності 25 мкг/мл сполук № **3.9**, **3.10**, **3.11**, **3.12**, **3.13**, **3.14** і **3.15**.

(Б) К — позитивний контроль 1-7 — реакція транскрипції за присутності різних концентрацій сполуки № **3.26**: 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19 і 0,1 мкг/мл відповідно.



Загалом, похідні 9-метилзаміщеної ФКК-1 виявилися більш активними інгібіторами синтезу РНК *in vitro* у порівнянні з 9-метокси аналогами. Вплив замісника у положенні 9 феназинового гетероциклу на здатність інгібувати синтез РНК можна прослідкувати порівнюючи активність сполук з однаковими ариламідними фрагментами. Так, сполука **3.26** – *n*-бутилфеніламід-9-метил-ФКК-1 має значення  $IC_{50} = 0,48$  мкМ, тоді як її 9-метокси аналог **3.18** має значення  $IC_{50} = 31,2$  мкМ. Аналогічно *n*-трифлуорометилфеніламід-9-метил-ФКК-1 **3.25** має значення  $IC_{50} = 32,8$  мкМ, тоді як його 9-ОМе аналог **3.17** практично не впливає на процес транскрипції *in vitro*. Найвищу активність проявляють сполуки: **3.16**, **3.18**, **3.24**, **3.25**, **3.26** і **3.32**, що мають об'ємні замісники ( $CF_3$ ,  $COOMe$ , парабутил) в мета та пара положеннях арильного фрагменту амід, виключенням є *пара*-трифлуорометилфеніламід-9-метокси-ФКК-1 (**3.17**), що не впливає на процес транскрипції *in vitro*.

#### 4.1.2. Дослідження впливу похідних ТБТ на синтез РНК *in vitro*

ТБТ, а також низка його аналогів, демонструють як здатність інгібувати синтез РНК *in vitro*, так і реплікацію вірусів Епштейн Барр та простого герпесу [121]. З огляду на це ТБТКК та їхні ариламідні аналоги також були досліджені на здатність інгібувати синтез РНК в модельній системі транскрипції РНКП Т7.

Шість з шістнадцяти досліджених похідних ТБТ (**4.12**, **4.13**, **4.19-4.21** і **4.23**) ефективно пригнічують синтез РНК в межах концентрацій  $IC_{50} = 15,9-4,9$  мкМ (таблиця 4.2). Найефективнішим є *n*- $CF_3$ -феніламід-ТБТ-8-карбонової кислоти (**4.20**) зі значенням  $IC_{50} = 4,9$  мкМ.

Присутність трифлуорометильних замісників у *мета*- і *пара*-положеннях ариламідного фрагменту обох ТБТКК (сполуки **4.12**, **4.13**, **4.19** та **4.20**) підвищує ефективність пригнічення синтезу РНК у порівнянні з ТБТКК та їхніми феніламидами. Серед піридил-амідів тільки сполука **4.23** (піридил-4-ил-амід-ТБТ-8-КК) демонструє достатньо високу інгібуючу активність зі значенням  $IC_{50} = 15,9$  мкМ. Загалом ариламідні ТБТ-8-КК є більш активними інгібіторами транскрипції, аніж ариламідні 8-метил-ТБТ-6-КК.

Таблиця 4.2.

Значення  $IC_{50}$  (мкМ) ТБТКК та їхніх ариламідів як інгібіторів  
синтезу РНК *in vitro*

№ Сполуки	РНКП Т7 $IC_{50}$	№ Сполуки	РНКП Т7 $IC_{50}$
<b>4.8</b>	— <sup>*</sup>	<b>4.9</b>	—
<b>4.10</b>	—	<b>4.17</b>	~ 74
<b>4.11</b>	~ 60	<b>4.18</b>	~ 65
<b>4.12</b>	$8,4 \pm 2$	<b>4.19</b>	$9,9 \pm 2$
<b>4.13</b>	$6,0 \pm 1$	<b>4.20</b>	$4,9 \pm 1$
<b>4.14</b>	~ 61	<b>4.21</b>	$15,3 \pm 2$
<b>4.15</b>	—	<b>4.22</b>	~ 74
<b>4.16</b>	~ 71	<b>4.23</b>	$15,9 \pm 3$

\* — сполука не активна за початкової концентрації

На рис. 4.5 представлені типові електрофореграми результатів транскрипції за присутності похідних ТБТ (система РНКП Т7).

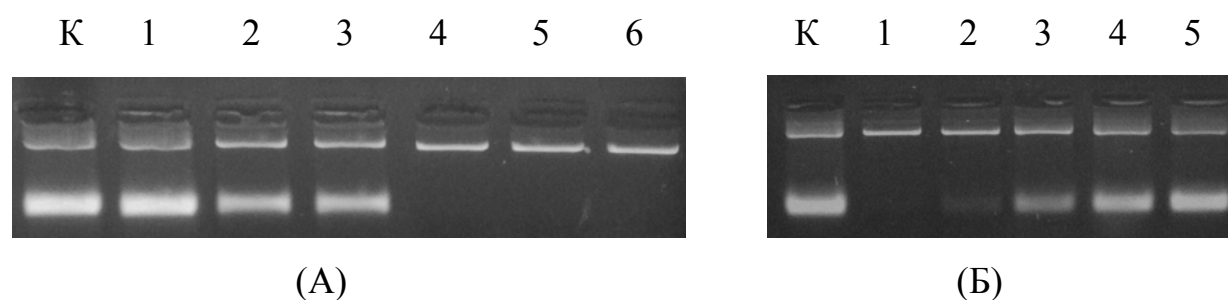


Рис. 4.2. Фотографії гель-електрофорезів результатів реакції транскрипції *in vitro*. Верхня смужка ДНК-матриця, нижня – РНК-продукт. Відсутність РНК-продукту свідчить про інгібування реакції транскрипції.

(А): К – позитивний контроль за присутності ДМСО; доріжки 1-6 – РНК-транскрипти за присутності 25 мкг/мл сполук **4.9**, **4.17-4.21**, відповідно.

(Б): К – позитивний контроль 1-7 – РНК-транскрипти за присутності різних концентрацій сполуки **4.20**: 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 мкг/мл, відповідно.

Загалом з 40 синтезованих ТГКК та їхніх ариламідів виявлено 21 ефективний інгібітор синтезу РНК зі значенням  $IC_{50} < 40$  мкМ. Для 6 сполук значення  $IC_{50} < 10$  мкМ. Отримані результати свідчать, що ариламід трициклічних гетероароматичних карбонових кислот є перспективним класом для створення нових інгібіторів синтезу РНК.

## 4.2 Дослідження антибактерійної активності ТГКК та їхніх ариламідів

Первинний скринінг антибактерійної активності проводили за концентрації 100 мкМ. Для виявлених активних сполук визначали значення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) методом послідовних розведень. Активними вважали речовини, які в концентрації менше 40 мкМ повністю пригнічують ріст бактерій. В якості агента порівняння використовували флуорохінолоновий антибіотик офлоксацин. Робота виконувалася в Інституті Ветеринарної медицини академії аграрних наук України під керівництвом Дерябіна О.М.

### 4.2.1. Дослідження антибактерійної активності 9-заміщених ФКК-1 та їхніх ариламідів

Зважаючи на те, що ариламіди незаміщеної ФКК-1 виявляють ефективні антибактерійні властивості [46], синтезовані похідні 9-заміщених ФКК-1 досліджували щодо здатності пригнічувати ріст грампозитивних та грамнегативних бактерій. Для визначення антибактерійної активності були використані культури клітин: *Erysipelothrix rhusiopathiae* VR-2 var. IVM, *Klebsiella spp* та *E.coli* ATCC25922, результати досліджень наведені в таблиці 4.3.

Грампозитивна бактерія *Erysipelothrix rhusiopathiae* VR-2 var. IVM (викликає бешиху свиней) чутлива до 8 досліджуваних сполук з МІК в межах від 4,2 до 0,3 мкМ. Найвищу здатність інгібувати ріст бактерій даного штаму демонструють 9-метокси-ФКК-1 (**3.9**) та її *o*-толіламід **3.12**. За концентрації 0,39 та 0,3 мкМ, відповідно, спостерігається практично повне гальмування ними росту мікроорганізму. Шість сполук: **3.10**, **3.11**, **3.14**, **3.15**, **3.20** і **3.21** проявляють активність з МІК менше 5 мкМ.

Значна кількість досліджуваних тест-агентів є ефективними інгібіторами грамнегативних бактерій. Десять сполук ефективно гальмують ріст бактерії *Klebsiella spp*, а ріст *Escherichia coli* пригнічують щість сполук зі значенням МІК менше 30 мкМ, табл. 4.3. Феніламід- (**3.11**), *o*-толіламід- (**3.12**) та *n*-н-бутилфеніламід- (**3.13**) 9-метокси-ФКК-1 гальмують ріст обох грамнегативних

бактерій. Згідно з отриманими результатами, найбільш перспективними серед досліджуваних сполук є феніламід- (3.11) та орто-толilамід- (3.12) 9-метокси-ФКК-1, які ефективно блокують ріст усіх використаних тест-культур.

Таблиця 4.3.

Значення  $IC_{50}$  (мкМ) та МІК (мкМ) 9-заміщених ФКК-1 та їхніх ариламідів як інгібіторів синтезу РНК та росту бактерій

№ Сполуки	МІК <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> VR2 var. IVM	МІК <i>Klebsiella</i> spp.*	МІК <i>E.coli</i> ATCC25922	$IC_{50}$ РНКП T7
3.9	$0,39 \pm 0,2$	—	—	—
3.10	$4,2 \pm 1$	$4,2 \pm 1$	$\sim 100$	$37,8 \pm 5$
3.11	$3,0 \pm 1$	$30,0 \pm 5$	$30,0 \pm 5$	$30,4 \pm 5$
3.12	$0,30 \pm 0,1$	$3 \pm 1$	$30, \pm 5$	$30,4 \pm 5$
3.13	$\sim 100$	—	—	—
3.14	$3 \pm 1$	$3 \pm 1$	—	—
3.15	$2,5 \pm 1$	—	$0,25 \pm 0,1$	$\sim 63$
3.16	—	$2,5 \pm 1$	—	$25,2 \pm 4$
3.17	—	—	$\sim 100$	—
3.18	—	$26,0 \pm 4$	$26,0 \pm 4$	$31,2 \pm 4$
3.19	$\sim 100$	$3,2 \pm 1$	—	$38,3 \pm 5$
3.20	$3,1 \pm 1$	$3,1 \pm 1$	—	$32,1 \pm 5$
3.21	$3,1 \pm 1$	$\sim 100$	—	$26,0 \pm 4$
3.22	—	—	—	—
3.23	—	—	—	$36,7 \pm 5$
3.24	—	—	—	$28,9 \pm 4$
3.25	—	—	—	$32,8 \pm 5$
3.26	—	—	—	$0,48 \pm 0,1$
3.27	—	—	—	$28,7 \pm 4$
3.28	—	—	$\sim 100$	$9,6 \pm 2$
3.29	$\sim 100$	$30,0 \pm 5$	$3,0 \pm 1$	$\sim 61$
3.30	—	$3,0 \pm 1$	$30,0 \pm 5$	$\sim 57$
3.31	—	—	$\sim 100$	—
3.32	—	$\sim 100$	—	$16,2 \pm 3$
Офлоксацин	—	$0,8 \pm 2$	$0,1 \pm 0,05$	—

\* — сполука не активна за початкової концентрації.

Факт інгібування росту різних мікробних агентів однією і тією ж речовиною можна пояснити ураженням їхніх функціонально ідентичних клітинних мішеней. Однією з таких мішеней можуть бути ДНК- та РНК-синтезувальні комплекси. Це

припущення базується на тому, що 3D-структури різних ДНК- та РНК-полімераз мають високий ступінь подібності, містять одні й ті самі структурні домени і консервативні мотиви, необхідні для елонгації ланцюга нуклеїнової кислоти [73]. Тож можна передбачити, що речовина, яка зв'язується з консервативними елементами відповідного ензиматичного комплексу, блокуючи його функціональну активність, здатна, вірогідно, гальмувати роботу інших представників цієї родини ферментів, вочевидь, різною мірою.

Хоча, не існує спостережень прямої кореляції між активністю сполук у модельній ензиматичній та бактерійних системах (через індивідуальні особливості кожного бактерійного транскрипційного комплексу поряд з іншими факторами), встановлене нами достовірне пригнічення синтезу РНК у модельній системі РНКП Т7 сполуками, що активно гальмують ріст бактерій, дає підстави вважати бактерійні РНК-синтезувальні комплекси їхньою ймовірною клітинною мішенню.

#### 4.3.2. Дослідження антибактерійної активності 8-метил-ТБТ-6- та ТБТ-8-карбонових кислот та їхніх ариламідів

Антибактерійний скринінг ТБТКК проводили на шести бактерійних штаммах: патогенних грампозитивних *Erysipelothrix rhusiopathiae* (викликає бешиху свиней) та *St.aureus* (збудник різноманітних інфекцій, і до сих пір є четвертою за частотою причиною внутрішньо-клінічних захворювань); патогенних грамнегативних *Pasteurella Multocida* (викликає різноманітні хвороби, в тому числі пташину холеру) і *Salmonella holerasuis* (збудник черевного тифу та ентеритів людей і тварин) та двох умовно-патогенних грамнегативних бактеріях *Klebsiella spp.* і *E.coli*. Результати досліджень наведені в таблиці 4.4.

Під час вивчення антибактерійної активності похідних ТБТ встановлено, що найчутливішою до дії похідних ТБТ є грампозитивна бактерія *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Вісім досліджуваних тест-агентів: **4.8-4.10, 4.12, 4.13, 4.17, 4.19 і 4.21** повністю пригнічують її ріст у межах МІК 9,7-1,0 мкМ. Натомість друга

грампозитивна бактерія *St. aureus* чутлива лише до *n*-н-бутилфеніламіду-ТБТ-8-КК (4.21) МІК якого 1 мкМ.

Таблиця 4.4.  
Результати антимікробного (МІК, мкМ) та ензиматичного (IC<sub>50</sub> мкМ) скринінгу  
ТБТКК та їхніх ариламідів

№	МІК <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	МІК <i>E.coli</i>	МІК <i>Salmonella holerasuis</i>	МІК <i>Klebsiella spp.</i>	МІК <i>Pasteurella Multocida</i>	МІК <i>St. aureus</i>	IC <sub>50</sub> РНКП Т7
<b>4.8</b>	1,5 ± 0,4	14,8 ± 3	14,8 ± 3	14,8 ± 3	1,5 ± 0,4	—*	—
<b>4.10</b>	1,0 ± 0,3	—	—	1,2 ± 0,4	—	—	—
<b>4.11</b>	—	—	—	—	—	—	~ 60
<b>4.12</b>	1,0 ± 0,3	—	—	~ 100	—	—	8,4 ± 2
<b>4.13</b>	9,7 ± 2	—	—	9,7 ± 3	—	—	6,0 ± 1
<b>4.14</b>	—	—	—	—	—	—	~ 61
<b>4.15</b>	—	—	—	—	—	—	—
<b>4.16</b>	—	14,0 ± 3	—	—	—	—	~ 71
<b>4.9</b>	1,5 ± 0,5	—	—	15,6 ± 4	—	—	—
<b>4.17</b>	1,2 ± 0,5	—	—	—	1,2 ± 0,3	—	~ 74
<b>4.18</b>	—	—	—	—	—	—	~ 65
<b>4.19</b>	1,0 ± 0,3	—	—	—	1,0 ± 0,3	—	9,9 ± 2
<b>4.20</b>	~ 100	10,0 ± 3	—	~ 100	—	—	4,9 ± 1
<b>4.21</b>	1,0 ± 0,4	—	—	—	—	1,0 ± 0,4	15,3 ± 2
<b>4.22</b>	—	—	—	—	—	—	~ 74
<b>4.23</b>	—	—	—	—	—	—	15,9 ± 3
<b>Офлок сацин</b>	—	0,1 ± 0,05	—	0,8 ± 0,2	0,1 ± 0,05	0,4 ± 0,1	—

\* — сполука не активна за початкової концентрації.

Щодо грамнегативних бактерій досліджувані ариламіді демонструють вибіркову активність. Три сполуки **4.8**, **4.16**, **4.20** повністю блокують ріст бактерії *E.coli* за МІК у межах 14,8-10 мкМ, а сполуки **4.8**, **4.9**, і **4.13** повністю інгібують ріст бактерії *Klebsiella spp.* з МІК в межах 15,6-1,2 мкМ. Ріст *Pasteurella multocida* ефективно пригнічують сполуки **4.8**, **4.17**, і **4.19** зі значенням МІК близько 1 мкМ, тоді як ріст *Salmonella holerasuis* інгібує лише 8-метил-ТБТ-6-КК (**4.8**) з МІК = 14,8 мкМ.

Порівняння значень МІК та IC<sub>50</sub>, які знаходяться у близьких межах для сполук: **4.12**, **4.13**, **4.19**, **4.20** і **4.21** дозволяє припустити, що механізм їхньої антибактерійної дії полягає у пригніченні бактерійних РНК-синтезувальних комплексів.

Слід зазначити, що ТБТКК проявляють множинну антибактерійну активність – ТБТ-8-КК (**4.9**) ефективно пригнічує грампозитивну бактерію *Erysipelothrix rhusiopathiae* та грамнегативну – *Klebsiella spp.* (МІК = 1,5 мкМ), а 8-метил-ТБТ-6-КК (**4.8**) – всі чотири грамнегативні бактерії – *E.coli*, *Salmonella cholerasuis* і *Klebsiella spp.* за МІК 14,8 мкМ та *Pasteurella Multocida* за МІК 1,48 мкМ. Сполука **4.8**, напевно, впливає на клітинний процес спільний для грампозитивних та грамнегативних бактерії, тоді як сполука **4.9** має виразну специфічність до грамнегативних бактерій.

Загалом серед 40 досліджених ТГКК та їхніх ариламідів виявлено 18 речовин з високою антибактерійною дією з МІК = 4-0,25мкМ, 10 з яких інгібують синтез РНК в системі транскрипції РНКП Т7. Отримані результати свідчать, що ариламіді трициклічних гетероароматичних карбонових кислот є перспективним класом для пошуку нових антибактерійних агентів. Можливий механізм дії цих сполук – інгібування бактерійних РНК-синтезувальних комплексів.



### 4.3. Дослідження антивірусної активності ариламідів ТГКК

Для тестування антивірусної активності сполук був обраний вірус бичачої вірусної діареї (ВБВД). ВБВД є однією з провідних ветеринарних інфекцій, яка спричиняє серйозні проблеми із здоров'ям у тварин і приводить до значних економічних втрат. ВБВД викликає низку важких клінічних проблем, включаючи ранню ембріональну загибель, дисфункцію імунної системи, що приводить до значного рівня смертності у скотарстві всього світу. Попри це, нині не існує офіційних препаратів для контролю ВБВД у лабораторіях і на фермах, хоча в усьому світі інтенсивно розробляють інгібітори цього вірусу [84, 132-135]. ВБВД – РНК-вмісний вірус є представником роду *Pestivirus* з родини *Flaviviridae* і його клітинну модель застосовують як сурогатну модель вірусу гепатиту С (ВГС) для селекції сполук, що пригнічують репродукцію ВГС [83, 136]. ВГС належить до роду *Hepaciviridae* тієї ж родини *Flaviviridae*, що і ВБВД та вважається однією з найнебезпечніших хвороб людства [84, 137-140]. Складність розробки лікарських препаратів полягає у відсутності адекватних клітинних та тваринних моделей для селекції інгібіторів ВГС [141]. Через подібність геномної організації, реплікативної стратегії та хімізму функціонування РНК-залежної РНК-полімерази пестивіруси є близькими «родичами» ВГС, тому ВБВД був адаптований як сурогатна модель ВГС для оцінки антивірусних агентів [83]. Цілком вірогідно, що виявлені інгібітори ВБВД можуть бути і антигепатитними агентами. Також відомо, що різноманітні похідні трициклічних гетероароматичних систем проявляють активність щодо реплікації цих вірусів [142-143].

#### 4.3.1. Дослідження антивірусної активності ариламідів ФКК-1

Прогнозувати антивірусну дію ариламідів ФКК-1 можна, принаймні, з огляду на їхню здатність пригнічувати вірусний ензим – РНК-полімеразу фагу Т7, оскільки бактеріофаги є вірусами бактерій [144], а фаг Т7 вважається сурогатною моделлю ДНК-вірусів, які не мають суперкапсиду [145].

Для оцінки антивірусних властивостей та з'ясування взаємозв'язку між активністю і структурою феніламідів до тестування залучено три *n*-н-бутилфеніламіди – сполуки **3.18**, **3.26** та **3.34**.

Оцінку рівня токсичного впливу сполук щодо еукаріотичних клітин визначали на перещеплюваній культурі клітин нирки теляти (ПККНТ). Результати досліджень антивірусної дії, цитотоксичності та здатності інгібувати синтез РНК зазначених сполук представлені у таблиці 4.5.

З'ясувалося, що природа замісника у положенні 9 феназинового циклу значно впливає як на токсичність, так і на протівірусні властивості ариламідів ФКК-1. Так, *пара*-н-бутилфеніламід **3.34** демонструє високу активність зі значенням  $EC_{50} = 0,88$  мкМ. Введення у положення 9 феназинового гетероциклу гідрофобної метильної групи приводить до підвищення активності *пара*-н-бутилфеніламіду **3.26**, який демонструє найвищу активність зі значенням  $EC_{50} = 0,42$  мкМ. Натомість, заміна метильної групи на метоксигрупу у положенні 9, приводить до практично повної втрати антивірусної активності *пара*-н-бутилфеніламідом **3.18**. 9-заміщені аміді ФКК-1 **3.18** і **3.26** проявляють низьку цитотоксичність на ПККНТ зі значенням  $EC_{50}$  близько 65 мкМ, тоді як незаміщений амід **3.34** демонструє доволі високу токсичну дію зі значенням  $EC_{50} = 8,8$  мкМ.

Таблиця 4.5.

Значення  $IC_{50}$  (мкМ),  $CC_{50}$  (мкМ),  $EC_{50}$  (мкМ) та ХТІ ариламідів ФКК-1 як інгібіторів синтезу РНК та реплікації ВБВД

№ Сполуки	$CC_{50}$ ПККНТ	$EC_{50}$ ВБВД	ХТІ	$IC_{50}$ РНКП Т7
<b>3.18</b>	$64,9 \pm 10$	н/а*	—**	$31,2 \pm 4$
<b>3.26</b>	$67,2 \pm 10$	$0,42 \pm 0,1$	160	$0,48 \pm 0,1$
<b>3.34</b>	$8,8 \pm 3$	$0,88 \pm 0,3$	10	$33,8 \pm 5$

\* н/а – сполука не активна за початкової концентрації; \*\* – неможливо визначити.

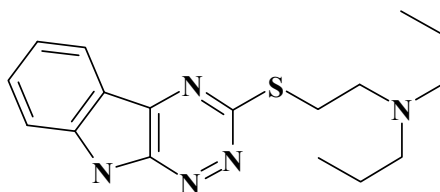
Слід зауважити, що сполука **3.26** демонструє найефективнішу інгібуючу дію як щодо синтезу РНК у модельній системі транскрипції РНКП Т7, так і щодо реплікації ВБВД. Більш того, значення  $EC_{50}$  та  $IC_{50}$  дуже близькі, що дозволяє прогнозувати можливий механізм дії – пригнічення РНК-синтезуального комплексу вірусу ВБВД.

Для оцінки цитотоксичності і противірусної активності сполук використовують поняття хіміотерапевтичного індекса (ХТІ) або індекса селективності (SI), який розраховується як відношення  $CC_{50}$  до  $EC_{50}$ . Чим вищий ХТІ тим безпечнішим і ефективнішим є досліджуваний тест-агент. Сполуки, ХТІ яких дорівнює або більше 4 вважають перспективними.

Таким чином, з вищезазначених міркувань, феніламід **3.26** та **3.34**, ХТІ яких становлять 160 та 10 відповідно, видаються вельми перспективними інгібіторами реплікації вірусу ВБВД.

#### 4.3.2. Дослідження антивірусної дії ариламідів ТБТКК

Серед селективних анти-ВБВД агентів сполука VP32947 (3-[(2-дипропіламіно)етил]тіо]-5H-1,2,4-триазино[5,6-b]індол) – інгібітор РНК-залежної РНК-полімерази ВБВД [84], Рис. 4.3, має структуру, дещо подібну до похідних ТБТ, які теж пригнічують синтез РНК у модельній системі транскрипції РНКП Т7 [123].



(VP32947)

Рис. 4.3. Відомий інгібітор РНК-залежної РНК-полімерази ВБВД.

Для оцінки антивірусних властивостей та з'ясування взаємозв'язку між функціональною активністю і структурою феніламідів до тестування залучено

*орто*-, *мета*-, *пара*-CF<sub>3</sub>-феніламіди та *пара*-н-бутилфеніламіди обох кислот, результати досліджень представлено у таблиці 4.6.

Таблиця 4.6.

Значення IC<sub>50</sub> (мкМ), CC<sub>50</sub> (мкМ), EC<sub>50</sub> (мкМ) та ХТІ ариламідів ТБТКК як інгібіторів синтезу РНК та реплікації ВБВД

№	IC <sub>50</sub> РНКП Т7	CC <sub>50</sub> ПККНТ	EC <sub>50</sub> ВБВД	ХТІ
<b>4.11</b>	~ 60	> 119	н/а*	—**
<b>4.12</b>	8,4 ± 1	> 119	29,8 ± 3	> 4
<b>4.13</b>	6,0 ± 1	> 119	29,8 ± 3	> 4
<b>4.14</b>	~ 61	12,3 ± 2	н/а	—
<b>4.18</b>	~ 65	> 123,5	н/а	—
<b>4.19</b>	9,9 ± 1	123,5 ± 15	12,3 ± 2	10
<b>4.20</b>	4,9 ± 0,5	> 123,5	1,5 ± 0,3	> 80
<b>4.21</b>	15,3 ± 2	> 127,0	12,7 ± 2	> 10

\* н/а – сполука не активна за початкової концентрації; \*\* – неможливо визначити.

Зіставлення результатів впливу вибраних N-ариламідів на синтез РНК у модельній системі транскрипції та антивірусного скринінгу демонструє істотну кореляцію між цими даними. Обидва *орто*-CF<sub>3</sub>-феніламіди **4.11** і **4.18** мають слабку здатність інгібувати синтез РНК і практично не впливають на репродукцію ВБВД, вірогідно через просторові ускладнення, які створює трифлуорометильна група в *орто*-положенні. *Пара*-н-бутилфеніламід-ТБТ-6-КК (**4.14**) не впливає як на синтез РНК *in vitro*, так і на репродукцію ВБВД, а його ТБТ-8 аналог **4.21** ефективно інгібує і синтез РНК *in vitro* і репродукцію ВБВД. Інші досліджені сполуки, ефективно інгібують як синтез РНК *in vitro*, так і репродукцію ВБВД. Найефективнішим інгібітором як синтезу РНК, так і репродукції ВБВД є N-ариламід-ТБТ-8-КК з трифлуорометильною групою в *пара*-положенні (сполука **4.20**, IC<sub>50</sub> = 4,9 мкМ, EC<sub>50</sub> = 1,5 мкМ). N-ариламіди 8-метил-ТБТ-6-карбонової кислоти з трифлуорометильною групою в *мета*- та *пара*-положеннях (**4.12** та

**4.13)** продемонстрували більш ніж у двічі меншу протівірусну активність у порівнянні з аналогічними похідними ТБТ-8-карбонової кислоти (**4.19**, **4.20**).

Сполука **4.20**, що проявила високу активність при відсутності токсичності є дуже перспективною щодо подальшого дослідження її антивірусної дії *in vivo*. Також доцільним є дослідження цієї сполуки щодо здатності інгібувати репродукцію вірусу гепатиту С.

Загалом з 11 досліджених сполук виявлено 7 речовин, що пригнічують реплікацію вірусу бичачої вірусної діареї зі значенням  $EC_{50} < 30$  мкМ. Всі сполуки, що блокують репродукцію вірусу, є інгібіторами синтезу РНК. Висока кореляція здатності ариламідів ТБТ інгібувати синтез РНК та реплікацію вірусу бичачої вірусної діареї дозволяє прогнозувати ймовірний механізм дії цих сполук – пригнічення РНК-синтезувального комплексу ВБВД.

#### 4.4. Моделювання способу взаємодії ариламідів ТГКК з каталітичним сайтом РНКП Т7

Для з'ясування можливого способу взаємодії синтезованих сполук з РНКП Т7 та виявлення ключових взаємодій ензим-ліганд проведено їхній докінг у каталітичну кишеню транскрипційного комплексу РНКП Т7, що відповідає фазі впізнавання вхідного нуклеотиду в послідовних актах синтезу РНК (PDB code: 1SOV) [115].

Вибрана ділянка каталітичної кишені радіусом 0,1 нм містить 12 амінокислотних залишків: Arg-423, Arg-425, Tyr-426, Asp-537 Cys-540, Ser-541, Met-635, Tyr-639, His-784, Ile-810, His-811 і Asp-812, які можуть бути відповідальними за зв'язування ліганду з рецептором. Більшість з них належать до функціонально важливих консервативних мотивів РНКП Т7 – А, В, С, розташованих у субдоменах «долоня» та «пальці» [146]. У виділеному об'ємі каталітичної кишені знаходиться вхід до вузького «тунелю», утвореного  $\alpha$ -спіраллю рухливого субдомену «пальці». На межі двох доменів  $\alpha$ -спіраль містить консервативний мотив DXXGR, який зберігається в багатьох ДНК-залежних РНК полімеразах. Його функція полягає у стабілізації РНК-ДНК гібриду на ранніх стадіях ініціації транскрипції [63].

Таким чином, взаємодія ліганду з амінокислотними залишками перелічених консервативних мотивів може суттєво впливати на функціонування ензиму та визначати рівень інгібіторних властивостей ліганду.

##### 4.4.1. Моделювання способу взаємодії ариламідів 9-заміщених ФКК-1 з каталітичним сайтом РНКП Т7

Всі ариламіди ФКК-1 були здоковані у каталітичну кишеню РНКП Т7. Для аналізу представлені результати докінгу семи сполук: **3.17**, **3.18**, **3.25**, **3.26**, **3.30**, **3.33** та **3.34**.

Одним із цікавих своєю структурою представників синтезованих сполук виявився ліганд **3.30** із серії 9-метилфеназин-1-карбоксамідів. Як видно з рис.

4.4.А, циклічний атом нітрогену амідного фрагмента **3.30** утворює інваріантний зв'язок з йоном металу, який за каталізу координований карбоксильними групами двох аспарагінових кислот. Також достатньо ймовірним є утворення донорно-акцепторного зв'язку (0,033 нм) хлор–замісника піридинового кільця з атомом магнію, що зміцнює тим самим утримання ліганду **3.30** у мішені. Це припущення підтверджується наявністю другої енергетично вигідної конформації того самого ліганду (рис. 4.4.Б), за якої зберігається конфігурація утримання амідного фрагмента, а феназинове ядро має іншу позицію відносно партнерів амінокислотного оточення.

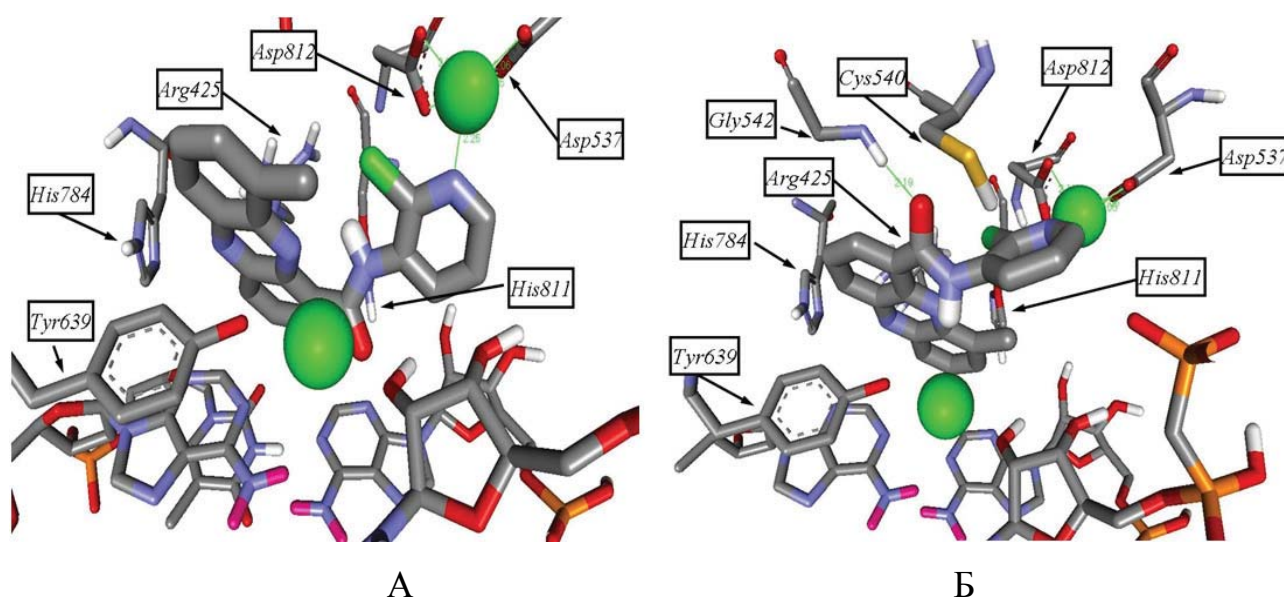


Рис. 4.4 Модель зв'язування сполуки **3.30** з каталітичним сайтом РНКП Т7 для конформацій А і Б.

Лише в одному із 10 енергетично найвигідніших комплексів реалізується Н-зв'язок між іміногрупою Gly-542 та атомом кисню амідного ланцюжка ліганду O...HN, при цьому амідний фрагмент додатково фіксується Cys-540 поблизу описаного вище «тунелю». Зважаючи на конформаційну мінливість ФКК-ариламідів, існує можливість утворення так званих «складених структур», у яких для найвірогідніших комплексів 9-метилзамісник наближений до атома хлору піридинового ядра, компактизуючи молекулу. В обох представлених конформаціях ліганду **3.30** реалізуються водневі зв'язки ендоеиклічного атому

нітрогену феназину N5...HN гуанідинової групи Arg-425 та/або N5... HN1 His-784. При цьому Н-зв'язок з Arg-425 утворюється незалежно від положення феназинового гетероциклу в кишені. Феназинове ядро утримується також  $\pi$ -стекінг взаємодією із другим іоном  $Mg^{2+}$ , який контролюється Tyr-639. Таким чином, ліганд **3.30** взаємодіє з вісьмома залишками амінокислот вибраної ділянки каталітичної кишені, що може істотно гальмувати конформаційну рухливість транскрипційного комплексу, порушуючи тим самим синтез РНК.

Порівняльний аналіз впливу присутніх у гетероциклі 9-замісників на їхню поведінку в моделі вибраної ділянки каталітичної кишені проводили на двох групах лігандів. Перша з них містить *пара*-трифлуорометилфеніламіди обох 9-заміщених та незаміщеної ФКК-1 (**3.17**, **3.25** та **3.33**), друга – *пара*-*n*-бутилфеніламіди тих самих кислот (**3.18**, **3.26** та **3.34**).

З рис. 4.5 видно, що орієнтація феназинового гетероциклу і, відповідно, положення амідного лінкера в одну із двох вірогідних позицій залежить як від наявності 9-замісника, так і від природи амідного фрагмента.

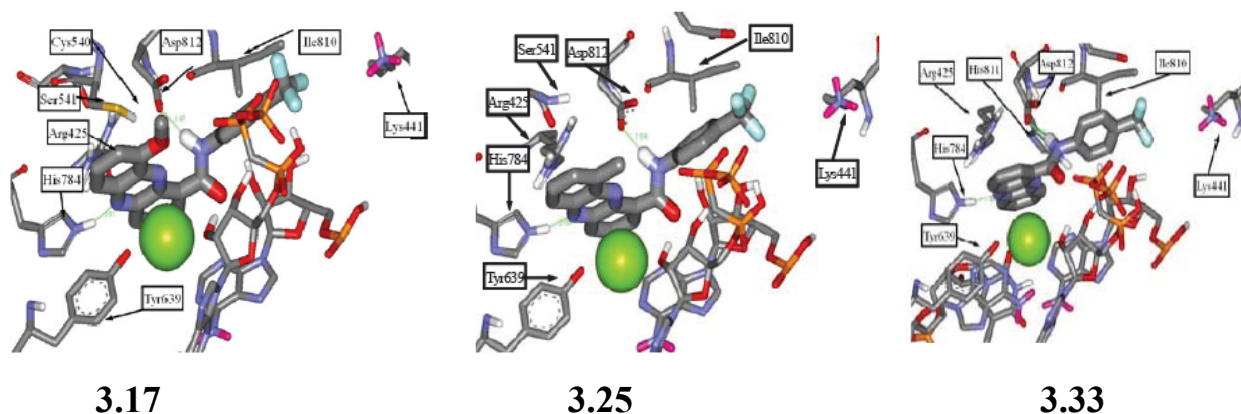


Рис. 4.5. Модель зв'язування сполук **3.17**, **3.25** та **3.33** з каталітичним сайтом РНКП Т7.

Логічним є заповнення 9-замісником об'єму гідрофобної кишені поблизу Cys-540, що додатково стабілізує положення феназинового ядра відносно найважливіших амінокислотних залишків. В обох групах сполук феназинове ядро, незалежно від його позиційного розташування, утримується Н-зв'язком N10...HN1 His-784 та  $\pi$ -стекінг-взаємодією з іоном  $Mg^{2+}$ , який контролюється Tyr-639. Іншим



зв'язком, присутнім у всіх шістьох структурах, є Н-зв'язок амідного протону з карбонільною групою Asp-812. Ліганди з низки N-(4-трифлуорометилфеніл)амідів (**3.25**, **3.33**) та низки N-(4-бутилфеніл)амідів (**3.26**, **3.34**) 9-заміщених ФКК-1 додатково стабілізують комплекс, заповнюючи залишковий об'єм каталітичної кишені, обмежений залишками полярного Lys-441 та неполярного Ile-810. Крім того, всі без винятку описані структури взаємодіють за рахунок  $\pi$ -стекингу з останнім, приєднаним до РНК, нуклеотидом.

Взаємодія ліганду з амінокислотним оточенням цієї кишені може суттєво впливати на функціонування ензиму та визначати рівень інгібіторних властивостей ліганду. У випадку *пара*-н-бутилфеніламіду **3.18** реалізується конфігурація його розміщення у транскрипційному комплексі РНКП Т7 "перевернута" відносно конфігурації феніламідів **3.26** і **3.34** (Рис. 4.6). Таке положення може бути пов'язане з об'ємом та полярністю 9-метоксигрупи сполуки **3.18**. При цьому, для реалізації важливого Н-зв'язку зв'язку амідного протону з карбонільною групою Asp-812 відбувається помітний вихід з площини базового феназинового гетероциклу амідного зв'язку сполуки **3.18**, у порівнянні із сполуками **3.26** та **3.34**.

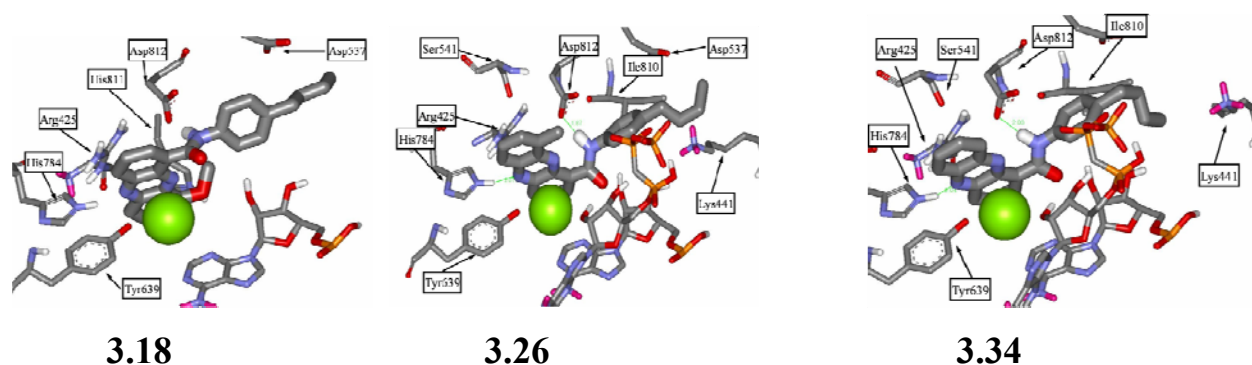


Рис. 4.6. Модель зв'язування сполук **3.18**, **3.26** та **3.34** з каталітичним сайтом РНКП Т7.

Загалом, усі досліджені сполуки мають подібний тип взаємодії з мішенню. Ліганди заповнюють простір, необхідний для впізнавання і зв'язування функціональних фрагментів вхідного нуклеозидтрифосфату, утримують іони магнію та перешкоджають процесивним змінам руху доменів ензиму, необхідним

для відтворення елонгаційного процесу. Відносна оцінка взаємодії ліганд-мішень у рамках силового поля, що використовується у програмі (QXP/FLO+), визначається співвідношенням енергетичних характеристик контактів представлених сполук із протеїновим оточенням під час утворення комплексу.

В табл. 4.7 представлено основні параметри, які характеризують спорідненість сполук до мішені. За розрахованими показниками  $pI$ , вільної енергії зв'язування ( $FreE$ ), енергії Н-зв'язків ( $Hbnd$ ) та гідрофобних взаємодій ( $Cntc$ ) всі досліджувані сполуки мають достатню афінність до рецептора – каталітичної кишені РНКП Т7.

Таблиця 4.7.

Енергетичні параметри комплексів ліганд – рецептор, одержані з використанням програми QXP/FLO+.

Ліганд	Енергія, кДж/моль				IC <sub>50</sub> (мкМ)
	$pI$	$FreE$	$Cntc$	$Hbnd$	РНКП Т7
<b>3.17</b>	4,2	-24,2	-69,5	-4,1	н/а
<b>3.18</b>	4,1	-23,4	-69,2	-3,8	31,2±4
<b>3.25</b>	4,4	-25,0	-66,4	-3,9	32,8±5
<b>3.26</b>	4,1	-23,2	-68,0	-4,1	0,48±0,1
<b>3.30 (А)</b>	2,5	-14,5	-69,5	-1,3	~57
<b>3.30 (Б)</b>	1,6	-9,0	-69,0	-1,2	~57
<b>3.33</b>	4,4	-24,9	-69,4	-3,8	10,9±2
<b>3.34</b>	3,9	-22,5	-70,2	-4,2	33,8±5

\*-log  $K_i$  – зворотній логарифм розрахованої константи інгібування;  $FreE$  – вільна енергія зв'язування;  $Hbnd$  – енергія водневих зв'язків;  $Cntc$  – енергія гідрофобних взаємодій; н/а – сполука не активна за початкової концентрації.

Активність амідів **3.18**, **3.26** та **3.34** у системі РНКП Т7 корелює з результатами [115], де показано, що конформаційно лабільний бутильний «хвіст» сполук здатний стабілізувати транскрипційний комплекс РНКП Т7, заповнюючи залишковий об'єм каталітичної кишені, обмежений залишками амінокислот Lys-441 та Ile-810 (Рис. 4.6), а 9-метильна група феніламиду **3.26** фіксується у вузький

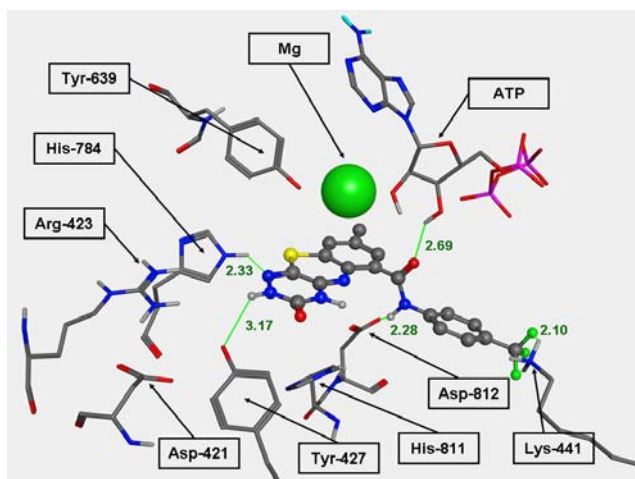
гідрофобній кишені, характерній для багатьох ДНК-залежних РНК-полімераз [125].

Результати докінгу гарно корелюють з даними впливу сполук на синтез РНК *in vitro* у модельному транскрипційному комплексі РНКП Т7. Сполука **3.30**, що має за результатами докінгу найгірше значення  $pI$  слабо впливає на синтез РНК ( $IC_{50} \sim 57,4$  мкМ). Серед 6 інших речовин з майже рівним значенням  $pI$ , лише сполука **3.17**, не проявила активності, тоді як інші 5 сполук: **3.18**, **3.25**, **3.26**, **3.33** та **3.34** виявилися ефективними інгібіторами синтезу РНК ( $IC_{50} = 31,2-0,48$  мкМ).

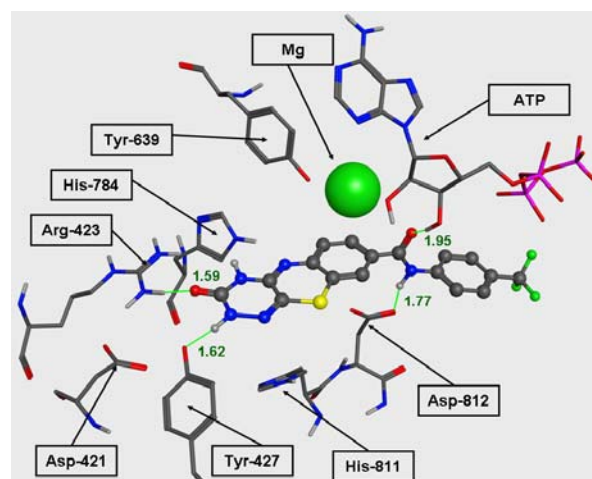
#### 4.4.2 Моделювання способу взаємодії ариламідів ТБТКК з каталітичним сайтом РНКП Т7

Для порівняльного аналізу вибрано моделі докінгу молекулярних структур *пара*-трифлуорометилфеніл- (**4.13** і **4.20**) та *пара*-*n*-бутилфеніламідів (**4.14** і **4.21**) з обох серій.

Як видно з Рис. 4.7 обидві структури (**4.13** і **4.20**) розміщені у ензиматичній кишені практично однаково та стабілізуються 4-ма водневими зв'язками майже з одними і тими ж амінокислотними залишками та утримуються також за рахунок  $\pi$ -стекінг-взаємодії бензольного фрагменту ТБТ з каталітичним йоном  $Mg^{2+}$ . Однак орієнтація коровових гетероциклів сполук **4.13** і **4.20** відносно амінокислотного оточення активного сайту відрізняється на  $180^\circ$ . Така відмінність обумовлена, на нашу думку, можливістю обертання ТБТ фрагменту відносно зв'язку C8-C1' (зв'язок між ТБТ та карбоксамідним фрагментом) аміду **4.20** у порівнянні із аналогічним зв'язком C6-C1' аміду **4.13**.



4.13



4.20

Рис. 4.7. Моделі зв'язування 8-метил-ТБТ-6-*n*-трифлуорометилфенілкарбоксаміду (**4.13**) та ТБТ-8-*n*-трифлуорометилфенілкарбоксаміду (**4.20**) з каталітичним сайтом транскрипційного комплексу РНКП Т7.

Хоча зазначені структури розташовані у майже однаковій площині, згадувана відмінність приводить до різного профілю зв'язування триазинобензотіазинового фрагменту з амінокислотним оточенням кишені. Так, для сполуки **4.20** – *para*-трифлуорометилфеніламід ТБТ-8-КК – характерним є утворення міцних Н-зв'язків: між N2H триазинового циклу та гідроксигрупою Tyr-427, між карбонільною групою триазинову та NH гуанідинової групи Arg-423. Натомість, для сполуки **4.13** – *para*-трифлуорометилфеніламід ТБТ-6-КК – реалізуються слабші Н-зв'язки між N1 азотом триазинову та NH His-784, між N2H триазинову та гідроксигрупою Tyr-427. Для обох *n*-CF<sub>3</sub>-фенілкарбоксамідів однаковим є утворення Н-зв'язків між амідним NH та карбоксильною групою Asp-812 та між амідним карбонілом і 3'-ОН групою АТФ.

На рис. 4.8 представлена суперпозиція сполук **4.13** та **4.20**, де чітко видно топологічну схожість у розташуванні корового фрагменту речовин у каталітичній кишені.

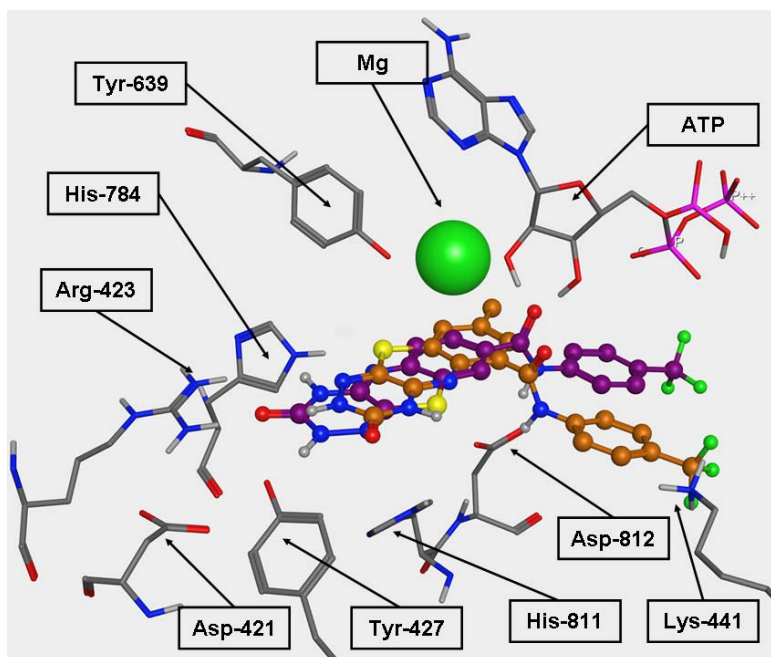
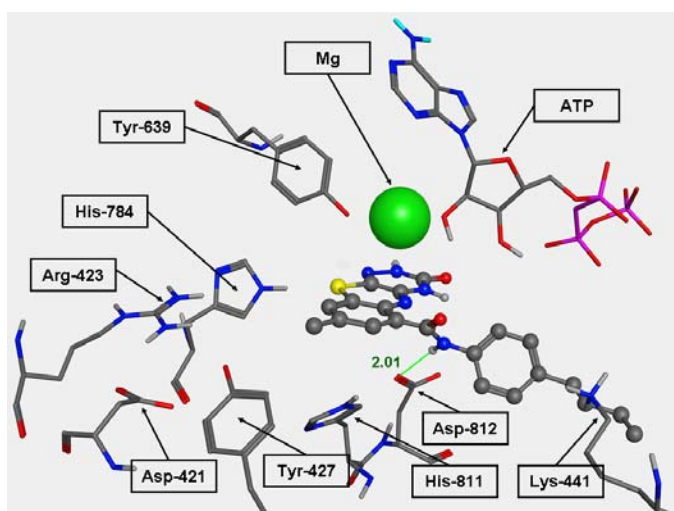
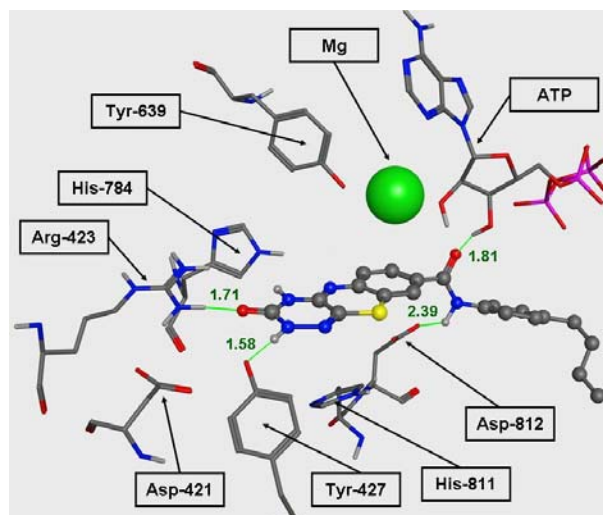


Рис. 4.8. Суперпозиція 8-метил-ТБТ-6-*para*-трифлуорометилфенілкарбоксаміду (**4.13**) та ТБТ-8-*para*-трифлуорометилфенілкарбоксаміду (**4.20**) в активному сайті РНКП Т7 за результатами докінгу. За кольором карбонового скелету молекули: темно-помаранчевий – **4.13**, темно-пурпурний – **4.20**.

Доволі цікавими виявилися результати докінгу бутил-феніламідів **4.14** та **4.21** (рис.4.9). Так, *para*-н-бутилфеніламід-ТБТ-8-КК (**4.21**) розташовується та утримується у ензиматичній кишені ідентично сполукам **4.13** та **4.20**, тоді як розміщення *para*-н-бутилфеніламід-ТБТ-6-КК (**4.14**) в активному сайті є дзеркальним відображенням вищезгаданих сполук **4.13**, **4.14**, **4.20**. Така топологія розташування амідів **4.14**, яку вірогідно провокує подовжений бутильний «хвіст», приводить до утворення лише одного, але міцного Н-зв'язку між амідним протоном NH і карбоксильною групою Asp-812 (зв'язок присутній у всіх досліджуваних моделях), а ТБТ ядро утримується за рахунок  $\pi$ -стекингу взаємодії з каталітичним йоном  $Mg^{2+}$  не бензольним, як у випадку сполук **4.13**, **4.20** і **4.21**, а триазиновим фрагментом ТБТ.



4.14



4.21

Рис. 4.9. Моделі зв'язування 8-метил-ТБТ-6-*n*-бутилфенілкарбоксаміду (**4.14**) та ТБТ-8-*n*-бутилфенілкарбоксаміду (**4.21**) з каталітичним сайтом транскрипційного комплексу РНКП Т7.

Суперпозиція бутильних ариламідів обох ТБТ-кислот (**4.14**) та (**4.21**) представлена на Рис. 4.10. і яскраво ілюструє різницю у їхньому розташуванні у заданій ділянці мішені.

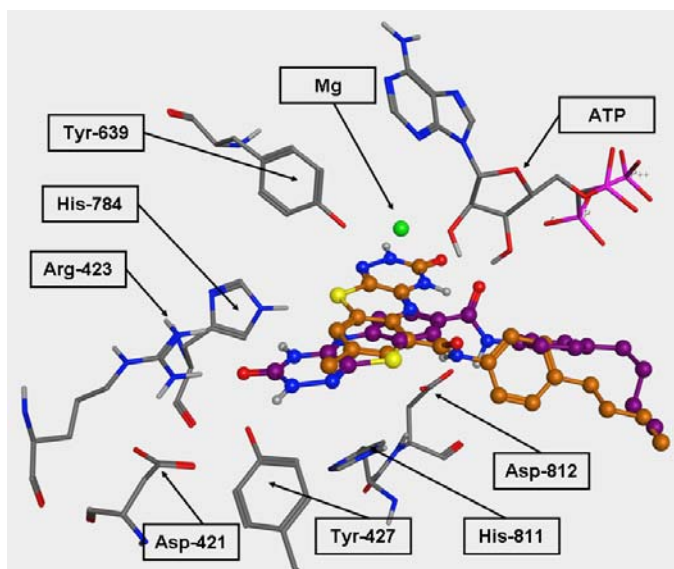


Рис. 4.10. Суперпозиція 8-метил-ТБТ-6-*para*-*n*-бутилфенілкарбоксаміду (**4.14**) та ТБТ-8-*para*-*n*-бутилфенілкарбоксаміду (**4.21**) в активному сайті РНКП Т7 за результатам докінгу. За кольором карбонового скелету молекули: темно-помаранчевий – **4.14**, темно-пурпурний – **4.21**.

В табл. 4.8 представлено основні параметри, які характеризують спорідненість сполук до мішені. За розрахованими показниками  $pI$ , вільної енергії зв'язування ( $FreE$ ), енергії Н-зв'язків ( $Hbnd$ ) та гідрофобних взаємодій ( $Cntc$ ) всі досліджувані сполуки, окрім сполуки **4.14** мають високу афінність до рецептора – каталітичної кишені РНКП Т7.

Таблиця 4.8.

Енергетичні параметри комплексів ліганд – рецептор, одержані з використанням програми QXP/FLO+ ензиматична і антивірусна активність сполук

№ сполуки	$-\log K_i^*$	Енергія, кДж/моль			$EC_{50}$ (мкМ) ВБВД	$IC_{50}$ (мкМ) РНКП Т7
		$FreE^*$	$Cntc^*$	$Hbnd^*$		
<b>4.13</b>	3,1	-15,0	-72,1	-5,5	$29,8 \pm 3$	$6,0 \pm 1$
<b>4.14</b>	1,7	-9,5	-69,2	-4,9	н/а	~61
<b>4.20</b>	3,4	-19,4	-74,8	-7,9	$1,5 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,5$
<b>4.21</b>	3,4	-19,3	-71,4	-5,6	$12,7 \pm 2$	$15,3 \pm 2$

\* $-\log K_i$  – зворотній логарифм розрахованої константи інгібування;  $FreE$  – вільна енергія зв'язування;  $Hbnd$  – енергія водневих зв'язків;  $Cntc$  – енергія гідрофобних взаємодій; н/а – сполука не активна за початкової концентрації.

Можливо, саме слабе зв'язування сполуки **4.14** з каталітичною кишенею пояснює дуже низьку здатність інгібувати синтез РНК (РНКП Т7) та відсутність впливу на реплікацію ВБВД. Водночас сполуки: **4.13**, **4.20** і **4.21**, котрі за даними докінгу міцно зв'язуються з активним сайтом каталітичної кишені, ефективно блокують як синтез РНК, так і реплікацію вірусу.



#### 4.5. Дослідження зв'язування ТБТ-8-*n*-трифлуорометилфенілкарбоксаміду (4.20) з ДНК

Під час проведення досліджень, для деяких представників амідів ТБТ-кислот виявлено здатність до флюоресценції. Детально досліджували флюоресценцію *n*-трифлуорометилфеніл-ТБТ-8-карбоксаміду (4.20), сполуки, що найактивніше інгібує як синтез РНК, так і реплікацію ВБВД. Спектри флюоресценції сполуки 4.20 в різних розчинниках наведені на рис. 4.11.

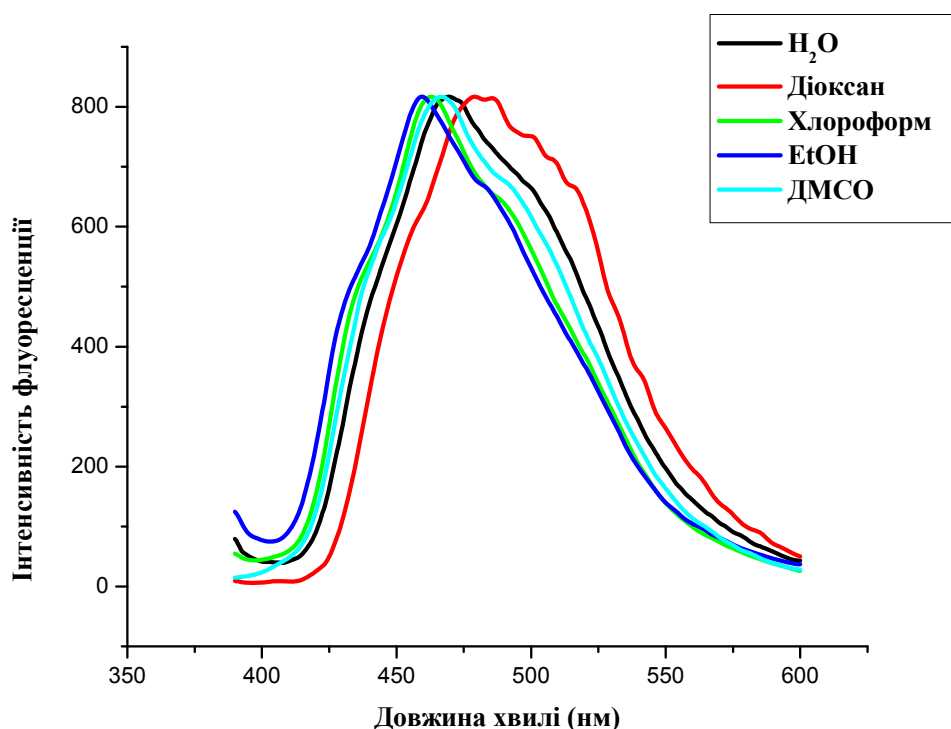


Рис. 4.11. Спектри флюоресценції сполуки 4.20 в різних розчинниках. Спектри нормовані за смугою випромінення у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Як видно з графіку на рис. 4.11 для речовини 4.20 спостерігається незначний батохромний зсув максимуму флюоресценції у разі коли спектри записані у воді, ДМСО і  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , та більш суттєвий (20 нм) у разі діоксану відносно спектру порівняння знятого в етиловому спирті.

Інтенсивність флюоресценції значно чутливіша до зміни розчинника. Аналіз спектрів флюоресценції (рис. 4.12.) сполуки 4.20 в різних розчинниках показав, що тоді як форма і положення смуг достатньо близькі, мінімум інтенсивності



флуоресценції спостерігається у протонних розчинниках – воді та етиловому спирті, а у апротонних розчинниках відбувається «розгортання» флуоресценції.

Сполука **4.20** має максимум поглинання при довжині хвилі 360 нм (розчин ДМСО). Максимум флуоресценції фіксується для неї при довжині хвилі 460 нм (ДМСО). На рис. 4.12 представлені спектри флуоресценції записані у різних розчинниках.

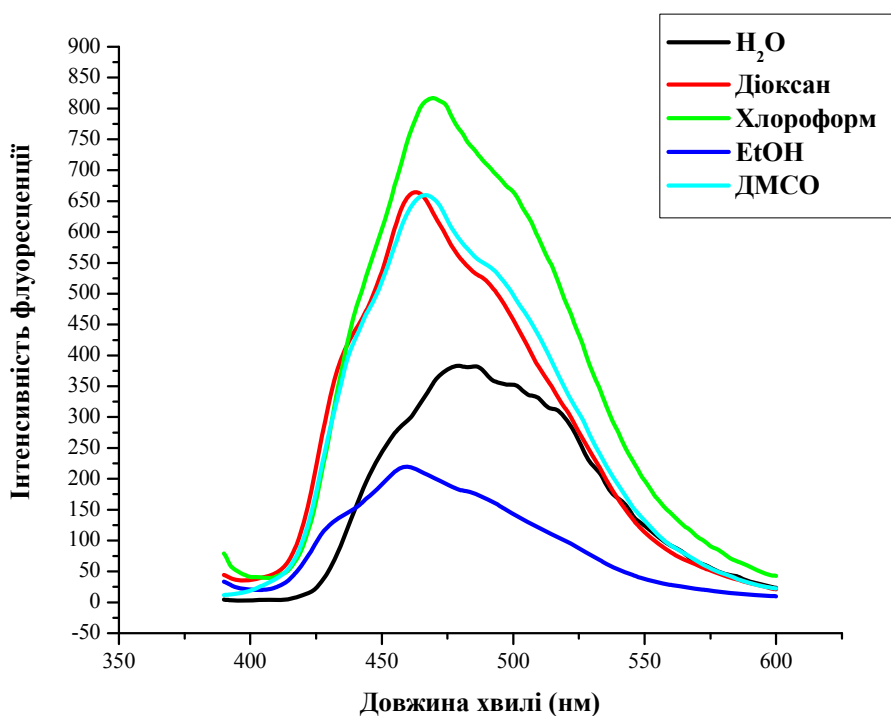


Рис. 4.12. Спектри флуоресценції сполуки **4.20** записані у різних розчинниках.

Як відомо синтетичні і природні планарні, поліциклічні, ароматичні сполуки такі як феназини, акридони, акридини, антрацикліни зв'язуються з ДНК та/або РНК [147-148]. ТБТ та його похідні також належать до подібних структур і можна припустити притаманність їм аналогічних властивостей.

Існує ряд методів виявлення взаємодії сполук з НК. Одним з спектральних методів є дослідження зміни флуоресцентних властивостей речовини, яке відбувається за взаємодії з НК.

Речовини можуть взаємодіяти з НК у різний спосіб. Ліганди можуть зв'язуватися ковалентно, електростатично, або інтеркалювати. У спектрах

флуоресценції ліганду при взаємодії з ДНК можуть відбуватися характеристичні зміни, такі як зсув та/або зміна інтенсивності флуоресценції.

Для визначення взаємодії сполуки **4.20** з ДНК було проведено дослідження залежності її флуоресценції від концентрації ДНК у розчині ТЕ буферу за  $\text{pH}=7,9$ . Дослідження проводилися методом титрування за сталої концентрації ліганду.

На Рис. 4.13 представлена залежність інтенсивності флуоресценції від концентрації ДНК у розчині ТЕ буферу на якій спостерігається достовірне збільшення інтенсивності флуоресценції при підвищенні концентрації ДНК, що вказує на взаємодію сполуки **4.20** з ДНК. На графіку представлено залежність інтенсивності флуоресценції від концентрації ДНК (рис. 4.14). За концентрації ДНК у межах 1:0,1 - 1:25 п.о. відбувається інтенсивне зростання флуоресценції, яке значно уповільнюється за подальшого збільшення кількості ДНК (від 30 до 100 п.о.).

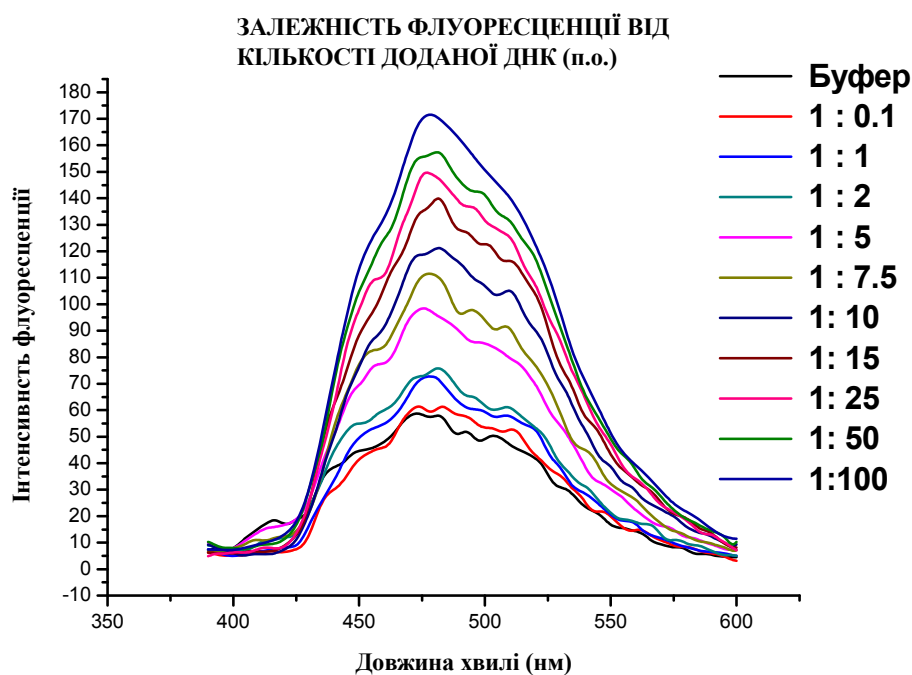


Рис. 4.13. Залежність інтенсивності максимуму флуоресценції сполуки **4.20** за різної концентрації ДНК у розчині.

Як було зазначено сполука **4.20** має будову (структуру) характерну для сполук-інтеркаляторів та для достеменного визначення способу зв'язування її з

ДНК необхідне додаткове ретельне дослідження. Однак підтвердження такої властивості сполуки **4.20** є корисним для визначення можливого механізму або способу її інгібуючої активності у біологічних системах.

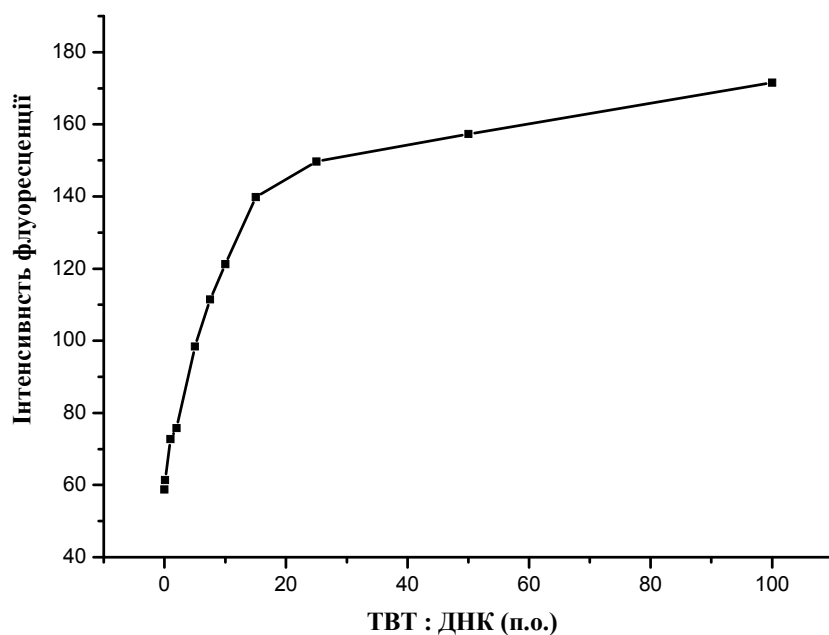


Рис. 4.14. Графік залежності інтенсивності максимуму флуоресценції сполуки **4.20** від концентрації ДНК у розчині.

#### 4.6. Дослідження відповідності ТГКК та їхніх ариламідів правилам Ліпінського

При створенні біологічно активних сполук – попередників лікарських засобів, важливими є не лише характеристики їхньої біологічної активності, але й інші параметри. До таких характеристик відносяться наступні: розчинність речовини у воді та біологічних буферах (кров, шлунковий сік, середовище кишківника, цитозоль), ліпофільність сполуки (здатність проникати через клітинну мембрану), зв'язування з білками плазми крові, стабільність у організмі, та шляхи її метаболізму. Всі ці характеристики зазвичай разом називаються абривіатурою ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion).

Для сполук «драг-кандидатів» існують так звані правила «п'яти» Ліпінського [149]. Це набір властивостей яким відповідає більшість «драглайк» сполук. До таких властивостей, відносяться наступні:

- 1) Не більше 5-ти донорів Н-зв'язку зв'язку (загальна кількість N-H та O-H зв'язків в молекулі)
- 2) Не більше 10-ти акцепторів Н-зв'язку зв'язку (всі атоми нітрогену та оксисену)
- 3) Молекулярна маса від 180 до 500 г/моль
- 4) Коефіцієнт розподілу октанол-вода ( $\log P$ ) не більше 5.

Для всіх синтезованих сполук були розраховували значення цих параметрів. Результати розрахунків наведені в таблиці 4.9 та 4.10.

Таблиця 4.9

Розраховані фізико-хімічні параметри 9-заміщених ФКК-1 та їхніх ариламідів.

№	M <sub>w</sub> г/моль	Hbond donors	Hbond acceptors	logP
<b>3.9</b>	254.25	1	5	2,32
<b>3.10</b>	238.25	1	4	2,50
<b>3.11</b>	329.36	1	5	3,76
<b>3.12</b>	343.39	1	5	4,08
<b>3.13</b>	343.39	1	5	4,06
<b>3.14</b>	343.39	1	5	4,13
<b>3.15</b>	397.36	1	5	4,58
<b>3.16</b>	397.36	1	5	4,80
<b>3.17</b>	397.36	1	5	4,72
<b>3.18</b>	385.47	1	5	4,85
<b>3.19</b>	313.36	1	4	3,62
<b>3.20</b>	327.39	1	4	4,17
<b>3.21</b>	327.39	1	4	4,13
<b>3.22</b>	327.39	1	4	4,14
<b>3.23</b>	381.36	1	4	4,70
<b>3.24</b>	381.36	1	4	4,73
<b>3.25</b>	381.36	1	4	4,80
<b>3.26</b>	369.47	1	4	4,99
<b>3.27</b>	314.35	1	5	3,28
<b>3.28</b>	314.35	1	5	2,90
<b>3.29</b>	328.38	1	5	3,58
<b>3.30</b>	348.79	1	5	3,73
<b>3.31</b>	328.38	1	5	3,14
<b>3.32</b>	371.40	1	6	3,06

H-bond donors – донори Н-зв'язку зв'язку, H-bond acceptors – акцептори Н-зв'язку зв'язку

Таблиця 4.10.

Розраховані фізико-хімічні параметри ТБТКК та їхніх ариламідів

№ сполуки	Mw г/моль	H-bond donors	H-bond acceptors	logP
<b>4.8</b>	276.28	3	7	1,05
<b>4.9</b>	262.25	3	7	0,69
<b>4.10</b>	351.39	3	7	2,56
<b>4.11</b>	419.39	3	7	3,22
<b>4.12</b>	419.39	3	7	3,53
<b>4.13</b>	419.39	3	7	3,51
<b>4.14</b>	407.50	3	7	3,93
<b>4.15</b>	352.38	3	8	1,92
<b>4.16</b>	352.38	3	8	1,71
<b>4.17</b>	337.36	3	7	2,21
<b>4.18</b>	405.36	3	7	2,97
<b>4.19</b>	405.36	3	7	3,16
<b>4.20</b>	405.36	3	7	3,11
<b>4.21</b>	393.47	3	7	3,56
<b>4.22</b>	338.35	3	8	1,53
<b>4.23</b>	338.35	3	8	1,35

\*H-bond donors – донори Н-зв'язку зв'язку, H-bond acceptors – акцептори Н-зв'язку зв'язку

З результатів наведених в таблицях 4.9 та 4.10 випливає, що синтезовані сполуки відповідають правилам Ліпінського і за цими параметрами можуть бути «драг -кандидатами».

#### 4.7. Визначення ліпофільності та розчинності сполук 3.26 та 4.20.

Для сполук, що проявили найкращу здатність інгібувати синтез РНК та репродукцію ВБВД, а саме *n*-бутилфеніламід 9-метил-ФКК-1 (3.26) та *n*-трифлуорометилфеніл-ТБТ-8-карбоксаміду (4.20) експериментально визначили значення  $\log D$  (різниця з  $\log P$  полягає у тому, що  $\log D$  це коефіцієнт розподілу між PBS буфером (рН = 7,4) та октанолом) і розчинність цих сполук у водному фосфатному буфері. За результати експерименту для сполуки 3.26 значення  $\log D$  рівне  $4,95 \pm 0,3$ . Це значення гарно корелює з розрахованим значенням  $\log P = 4,99$ . Таке значення параметру ліофільності є доволі великим, але прийнятним для сполуки «драг-кандидатами». Розчинність сполуки 3.26 у водному фосфатному буфері, визначена експериментальним шляхом, рівна  $17 \pm 5$  мкМ. За результати експерименту для сполуки 4.20 значення  $\log D$  рівне  $3,67 \pm 0,3$ . Це значення дуже гарно корелює з розрахованим значенням  $\log P = 3,49$ . Розчинність сполуки 4.20 у воді, визначена експериментальним шляхом складає  $42 \pm 7$  мкМ.

Відповідність правилам Ліпінського, рівень розчинності цих сполук, їхня висока активність та селективність спонукають до подальших досліджень цих сполук у *in vivo* системах. Також доцільним є дослідження цих сполук щодо здатності інгібувати реплікацію вірусу гепатиту С.

#### Висновки:

1. Серед 40 синтезованих сполук виявлено 21 інгібітор синтезу РНК *in vitro* зі значенням  $IC_{50} < 40$  мкМ.
2. З 40 досліджених сполук виявлено 18 речовин з високою антибактерійною дією з  $MIK = 4-0,25$  мкМ. 10 з цих 18 сполук ефективно інгібують синтез РНК *in vitro*. Можливий механізм антибактерійної дії сполук – інгібування бактерійних РНК-синтезувальних комплексів.
3. Серед 11 досліджених ариламідів ТГКК виявлено 7 сполук, що ефективно інгібують реплікацію ВБВД зі значенням  $EC_{50} < 30$  мкМ. Всі сполуки що блокують репродукцію вірусу є інгібіторами синтезу РНК. Кореляція активності

свідчить про те, що ймовірний механізм дії досліджених сполук є інгібування РНК-синтизувального комплексу вірусу.

4. Методом молекулярно докінгу встановлено можливий механізм зв'язування синтезованих сполук з каталітичною кишенею транскрипційного комплексу РНКП Т7. Визначено ключові міжмолекулярні зв'язки ліганд–рецептор. Показано кореляцію результатів докінгу та здатності синтезованих сполук інгібувати синтез РНК у модельній транскрипційній системі РНКП Т7.

5. Показано зв'язування *n*-трифлуорометилфеніл-ТБТ-8-карбоксаміду (**4.20**) з ДНК шляхом флуоресцентної спектроскопії.

6. Показано, що ТГКК та їхні ариламідні відповідники відповідають правилам «п'яти» Ліпінського.

7. Для сполук **3.26** та **4.20** в експериментально визначено значення  $\log D$  і розчинність цих сполук у водному фосфатному буфері. Для сполуки **3.26** значення  $\log D$  рівне 4,95, розчинність складає 17 мкМ. Для сполуки **4.20** значення  $\log D$  рівне 3,67, розчинність складає 42 мкМ. Відповідність правилам Ліпінського, рівень розчинності цих сполук, їхня висока активність та селективність спонукають до подальших досліджень цих сполук у *in vivo* системах. Також доцільним є дослідження цих сполук щодо здатності інгібувати реплікацію вірусу гепатиту С.

8. Загалом дані біологічних тестувань говорять про те що ариламідні ТГКК є перспективним класом для створення нових біологічно активних сполук з антибактерійною та противірусною дією, механізм роботи яких може полягати в інгібуванні РНК-синтезувальних комплексів патогенів.

Основні наукові результати розділу опубліковані в працях:

Конструювання інгібіторів транскрипції на основі N-ариламідів 9-метил-та 9-метоксифеназин-1-карбонових кислот / Пальчиковська Л. Г., Васильченко О. В., Платонов М. О., Костіна В. Г., Лисенко Н. А., Алексєєва І. В., Говорун Д. М., Швед А. Д. // Укр. біохім. журн. – 2011, – т. 83. № 2. – С. 65-73.



Оцінка антибактерійної та антивірусної активності N-ариламідів 9-заміщених ФКК-1 – інгібіторів модельної транскрипції фагу T7 / Пальчиковська Л.І., Васильченко О.В., Бабкіна М. М., Тарасов О.А., Платонов М.О., Старосила Д. Б., Самійленко С. П., Рибалко С. Л., Дерябин О. М., Говорун Д. М. // *Biopolymers and Cell.* – 2012. – Vol. 28. № 6.. – P. 477-485.

Нові інгібітори транскрипції на основі N-ариламідів 8-метил-триазинобензотіазин-6- і триазинобензотіазин-8-карбонових кислот: синтез і докінг / Васильченко О.В., Платонов М.О., Говорун Д. М., Пальчиковська Л.І. // *Ukrainica Bioorganica Acta.* – 2012. – Vol. 2.. – P. 30-38.

N-ариламід триазинобензотіазинових кислот – інгібітори синтезу РНК, антимікробні та антивірусні агенти / Васильченко О.В., Старосила Д. Б., Тарасов О. А., Платонов М. О., Дерябин О. М., Рибалко С. Л., Пальчиковська Л. Г. // *Ukrainica Bioorganica Acta.* – 2013. – Vol. 1. – P. 16-22.

## РОЗДІЛ 5

### ДОСЛІДЖЕННЯ ГІБРИДНИХ СПОЛУК ТРИ- ТА БІЦИКЛІЧНИХ ГЕТЕРООСНОВ

#### 5.1. Обумовлення вибору сполук для дослідження

Серед синтезованих нами похідних феназину та триазинобензотіазину виявлено низку сполук із виразною антибактерійною та противірусною активністю, які ефективно пригнічують синтез РНК у модельній системі транскрипції РНКП Т7. Цілком вірогідно, що їхніми клітинними мішенями є ензиматичні комплекси біосинтезу нуклеїнових кислот. Одержані результати стимулювали пошук і розробку нових біологічно активних сполук на основі трициклічних гетероароматичних основ. Крім того існує зацікавленість у підтвердженні впливу на синтез РНК різних представників цього класу сполук.

Якщо розглянути загальну формулу синтезованих у попередніх розділах ариламідів ТГКК (рис. 5.1), то зрозуміло, що жорстке пласке трициклічне ядро молекули з'єднане з арильним фрагментом аміду трьома зв'язками, які мають «нежорстку» природу. Два зв'язки можуть обертатися навколо власної осі, а один вільно, відповідно, арильний фрагмент має значну ступінь свободи відносно центрального гетероциклу.

Нами було досліджено вплив на активність сполук більш високої «жорсткості» закріплення «псевдоарилкарбоксамідного» фрагменту до центрального гетероциклу, а ніж в ариламидах трициклічних карбонових кислот.

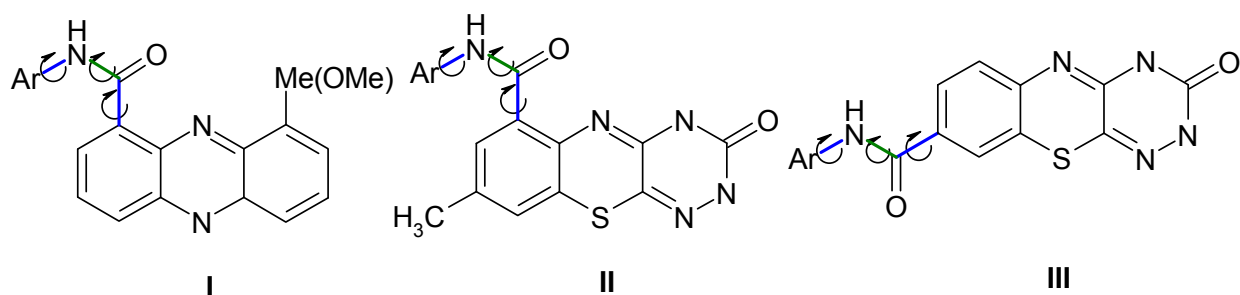


Рис. 5.1. Розміщення арильного фрагменту по відношенню до центрального гетероциклу, в досліджуваних сполуках на прикладі ариламідів ФКК-1 (I) та ТБТКК (II і III). Синім кольором виділені зв'язки, що обертається навколо осі зв'язку, зеленим – той що може вільно обертатися.

Якщо розглянути структуру гібридних сполук (рис. 5.2), то їхній гетероароматичний бициклічний фрагмент можна представити як жорсткий циклічний аналог арилкарбоксамідної групи. Циклічний двокоординований атом азоту, акцептор Н-зв'язку, можна представити як аналог карбонільної групи, а групу «X», як аналог амідної NH групи, донор Н-зв'язку («X» = «NH»), або як нейтральний лінкер, («X» = O/S). Слід зазначити, що циклічна група NH має виразніші донорні властивості, а ніж амідний протон.

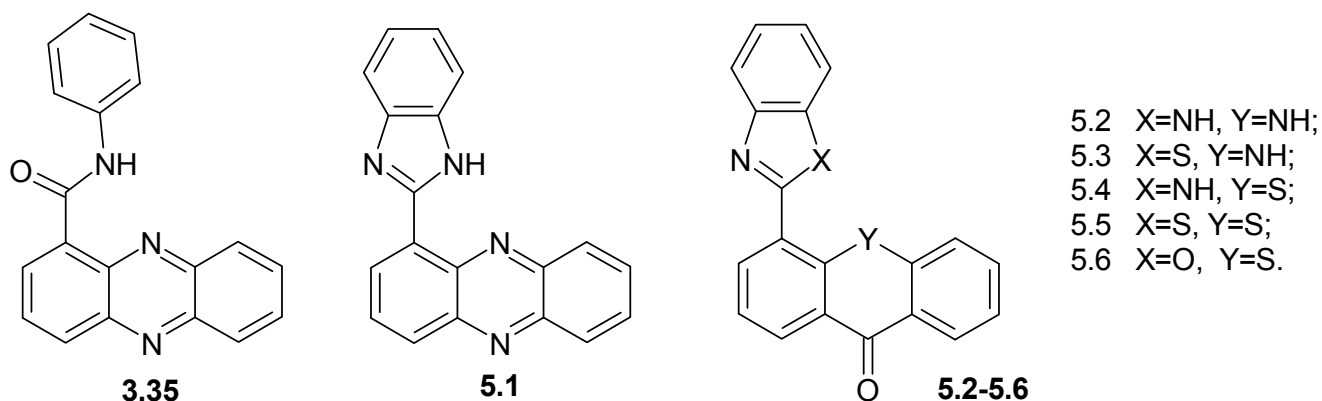
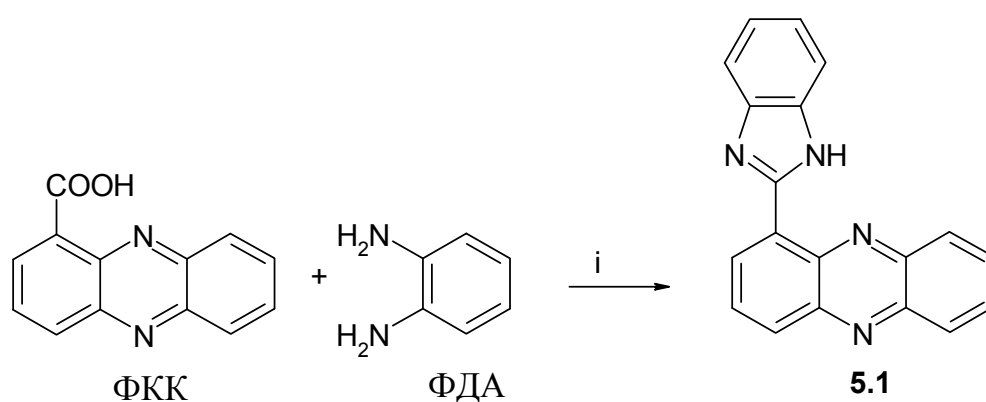


Рис. 5.2. Феніламід-ФКК-1 (3.35) та трициклічно-біциклічні гібридні сполуки.

## 5.2. Синтез та спектральні характеристики трициклічно-біциклічних гібридних сполук

Для одержання гідридної сполуки феназину з бензімідазолом (**5.1**) використовували методику, що полягає в циклізації піридинкарбонових кислот з *о*-фенілендіаміном (ФДА) при нагріванні за температури 160 °С в поліфосфорній кислоті (ПФК), схема 5.1 [150]. Даний метод не підходить для синтезу інших похідних, через надзвичайно малі виходи продукту та присутність у великих кількостях побічних продуктів реакції.



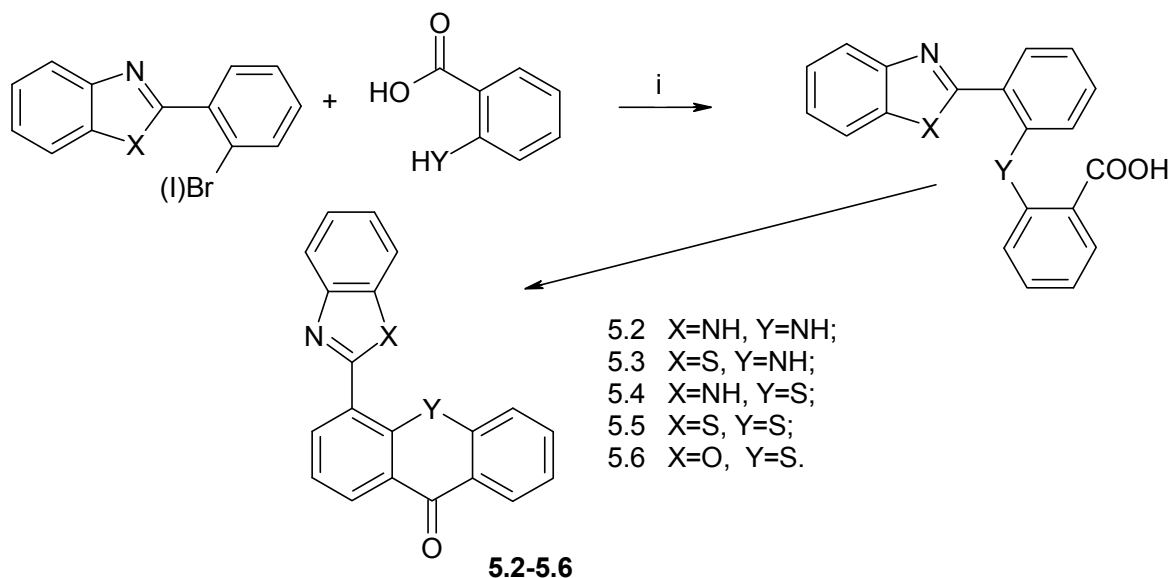
i) ПФК, 150-160 °С, 5-6 год.

Схема 5.1. Синтезу 1-(1Н-бензімідазол-2-іл)феназину (**5.1**).

Тому для отримання гібридних сполук акридону та тіоксантону застосовували інший метод. Спочатку синтезували вихідні 2-арил(2'-галоген) похідні бензімідазолу, бензотіазолу і бензоксазолу. Синтез здійснювали за модифікованою методикою раніше наведеною в літературі, схема 5.2 [150, 151].

Формування гібридних структур акридону і тіоксантону здійснювали постадійно. На першій стадії синтезу одержували *орто*-N(S)-арилзаміщені бензойні кислоти. Одержані продукти виділяли з реакційної суміші і без додаткового очищення піддавали внутрішньомолекулярній циклізації в ПФК, яка одночасно слугувала розчинником і каталізатором реакції. Вихід очікуваних похідних тіоксантону був трохи нижчим за такий для похідних акридону. Синтезовані сполуки – стійкі кристалічні речовини з високими температурами

плавлення. Розчинність у органічних розчинниках обмежена, найкраща – в ДМФА та ДМСО.



i) ПФК, 150-160 °C, 5-6 год

Схема 5.2. Загальна схема синтезу гібридних сполук акридону та тіаксантону з бензімідазолом, бензотіазолом і бензоксазолом.

У  $^1\text{H}$ -ЯМР спектрах сполук **5.1-5.4**, положення N-H протонів спостерігається в області 12,93-14,22 м. ч., що, ймовірно, спричинено утворенням внутрішньомолекулярних (хелатного типу) і/або міжмолекулярних Н-зв'язків.

Так у сполуках **5.2** і **5.3** до внутрішньомолекулярного зв'язку спонукає сама електронна будова гібридної молекули на основі акридону. Підтвердженням цього припущення є найбільший зсув N-1 протону бензімідазольного фрагмента в сполуці **5.2** (відносно такого у сполуках **5.1** та **5.4**), що можна пояснити появою додаткового позитивного заряду на атомі N-3 внаслідок утворення Н-зв'язку зв'язку хелатного типу.

Сполука **5.2** також потенційно здатна на такий зв'язок, тоді як сполуки **5.1** та **5.3** більш схильні до утворення міжмолекулярних Н-зв'язків. У  $^1\text{H}$ -ЯМР спектрах сполуки **5.1** в області 13,2 м.ч. спостерігається розширений сигнал протону N-1, який знаходиться в обміні (0,4 Н), у сполуці **5.3** сама геометрія гібридної молекули на основі тіоксантону унеможливорює утворення внутрішньомолекулярного Н-зв'язку.

### 5.3. Дослідження біологічної активності трициклічно-біциклічних гібридних сполук

#### 5.3.1. Дослідження впливу трициклічно-біциклічних гібридних сполук на синтез РНК *in vitro*

Первинне тестування гібридних сполук проводили за концентрації 25 мкг/мл (70–80 мкМ залежно від структури). Для детальнішого дослідження інгібіторної дії активних сполук застосовували метод подвійних розведень. Показники ефективності сполук ( $IC_{50}$ ) визначали із графіка активності та інтерпретували в молярній концентрації, рис. 5.3.

Гібридні сполуки **5.2**, **5.3** і **5.4** повністю блокують функціонування транскрипційної системи, натомість, РНКП Т7 нечутлива до сполук **5.1**, **5.5** і дуже слабо інгібується сполукою **5.6**, рис. 5.4.А. Найактивнішим інгібітором синтезу РНК є сполука **5.3**, рис 5.4.Б. Розраховані значення  $IC_{50}$  для тест-агентів **5.2**, **5.3** і **5.4** становлять 8,9, 5,7 і 19,8 мкМ, відповідно.

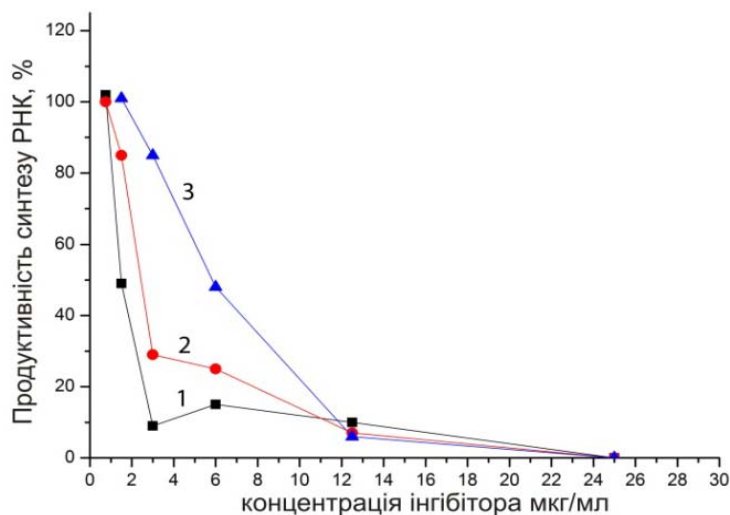


Рис. 5.3. Концентраційна залежність впливу гібридних сполук на синтез РНК *in vitro*: 1 – сполука **5.3**; 2 – сполука **5.2**; 3 – сполука **5.4**.

Отримані результати показують, що визначальну роль у інгібіторній активності сполук в модельній системі транскрипції РНКП Т7 відіграє трициклічний гетероцикл. Похідні акридонового гетероциклу **5.2** та **5.3** активно

інгібують синтез РНК *in vitro*. Похідні тіаксантону **5.4**, **5.5** і **5.6** менш активні, а похідне феназину **5.1** не впливає на синтез РНК. Сполуки **5.1** **5.2** та **5.4** мають однаковий бензімідазольний фрагмент і різні трициклічні гетероцикли, похідна феназину **5.1** неактивна, тоді як похідні акридону та тіоксантону інгібують синтез РНК. Важливість присутності донору Н-зв'язку у вигляді бензімідазольного NH спостерігається лише для похідних тіоксантону. Так, бензімідазольна похідна **5.4** активно інгібує синтез РНК, тоді як її бензотіазольний (**5.5**) та бензоксазольний (**5.6**) аналоги не проявляють активності.

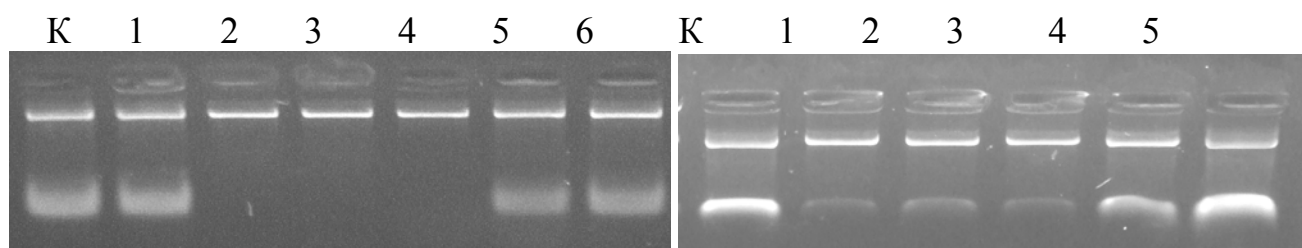


Рис. 5.4. Фотографія гел-електрофорезу результатів реакції транскрипції *in vitro*. Верхня смужка ДНК-матриця, нижня РНК-продукт. Відсутність РНК- продукту свідчить про інгібування реакції транскрипції.

(А) К - позитивний контроль; доріжки 1-6 – РНК-транскрипти отримані за присутності 25 мкг/мл сполук **5.1-5.6**, відповідно.

(Б) К - позитивний контроль; доріжки 1-5 – РНК-транскрипти за присутності 12,5, 6, 3, 1,5 і 0,75 мкг/мл сполуки **5.3**, відповідно.

Бензімідазольної похідна феназину **5.1**, не інгібує синтез РНК *in vitro*, а її нециклічний «аналог» – фенілкарбоксамід ФКК-1 (**3.35**) слабо інгібує синтез РНК зі значенням  $IC_{50}$  близько 35 мкМ. Протилежні результати спостерігаються для гібридної сполуки **5.2** та її нециклічного аналога феніламиду акридон-4-карбонової кислоти. Так сполука **5.2** ( $IC_{50} = 8,9$  мкМ), ефективно інгібує синтез РНК, тоді як феніламід акридон-4-карбонової кислоти має значення  $IC_{50}$  близько 40 мкМ. Для встановлення більш детальної залежності впливу «жорсткості» структури необхідно синтезувати та дослідити низку нових трициклічно-біциклічних гібридних сполук. Враховуючи, що великий вплив на активність ариламідів ТГКК мають заміщення, як в амідному фрагменті, так і в

центральному гетероциклі, ми прогнозуємо, що така функціоналізація гібридних сполук повинна привести до появи агентів з кращою здатністю інгібувати синтез РНК у порівнянні з нефункціоналізованими гібридами. Синтез та дослідження таких сполук буде одним з наступних напрямків нашої роботи.

### 5.3.2. Дослідження зв'язування трициклічно-біциклічних гібридних сполук з ДНК

Важливою рисою досліджуваних сполук є планарна структура обох фрагментів їхніх молекул, що може обумовлювати здатність останніх зв'язуватися з молекулами ДНК.

Дослідження гібридних сполук за описаною методикою передбачає, що сполуки, які взаємодіють з ДНК, запобігають взаємодії з нею відомого інтеркалятора EtBr, в результаті чого смужка ДНК на електрофоретичному гелі частково або повністю зникає [147]. За результатом аналогічного дослідження, гібридні сполуки **5.1**, **5.2** та **5.4** демонструють достовірну здатність зв'язуватися з ДНК, при чому найсильніше взаємодіяли з ДНК гібриди **5.2** і **5.4**, рис. 5.5.

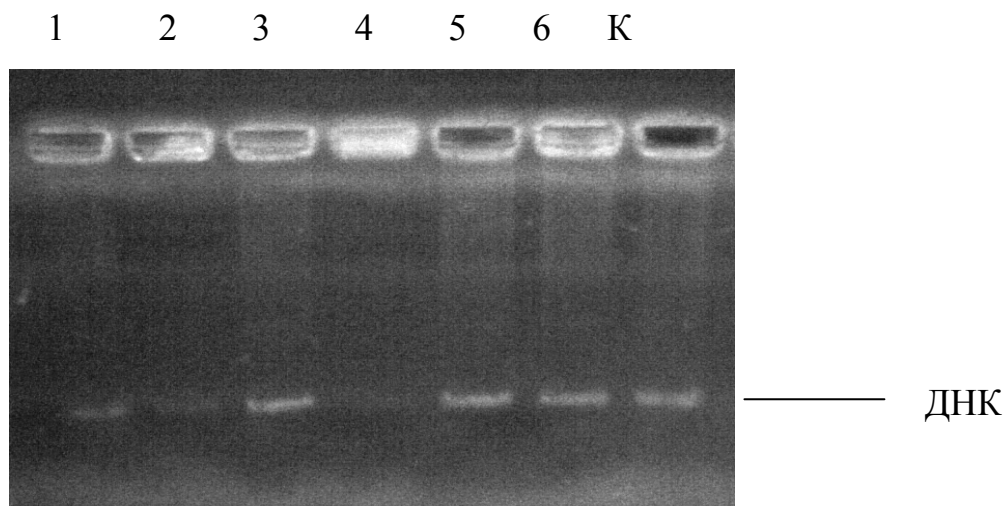


Рис. 5.5. Зв'язування трициклічно-біциклічних гібридних сполук з ДНК, фотографія типової електрофореграми: доріжки 1-6 – ДНК інкубоване з сполуки **5.1-5.6** (25 мкг/мл), відповідно + ДНК (250 мкг/мл) + етидій бромід (30 мг/мл), К – контроль, (250 мкг/мл) + етидій бромід (30 мг/мл) без додавання сполук.



### 5.3.3. Дослідження антибактерійної активності трициклічно-біциклічних гібридних сполук

Стійкість патогенних мікроорганізмів до антибіотиків становить сьогодні велику проблему сучасної медицини [152-156]. Представники родів *Staphylococcus*, *Enterococcus* і *Pseudomonas* є провідними збудниками внутрішньо-лікарняних та опортуністичних інфекцій. Представники родів *Staphylococcus* і *Enterococcus* – одні з найбільш поширених у мікробіотопах людини та тварин грампозитивних мікроорганізмів. Бактерії роду *Staphylococcus*, зокрема *Staphylococcus aureus*, є збудниками багатьох захворювань: гнійних інфекцій (ангіни, тонзилітів), хвороб центральної нервової системи (менінгітів, абсцесу мозку) тощо [153]. Найбільш поширеним видом серед ентерококів є *Enterococcus faecalis*. Його вірулентні штами можуть викликати інфекції сечостатевого шляху, менінгіти, ендокардити та інші хвороби [154]. Мікроорганізми виду *Pseudomonas aeruginosa* є опортуністичними патогенами людини і деяких тварин і активізуються в разі ослаблення імунітету носія [156]. Для всіх зазначених мікробних патогенів характерна висока здатність формувати стійкі форми до антимікробних препаратів. Серед основних причин, що сприяють виникненню резистентності, є нераціональна антибіотикотерапія як людини, так і тварин, а також використання антибіотиків в якості стимуляторів росту у тваринництві. Проблема резистентності у тваринництві небезпечна через те, що дозволяє стійким штамам бактерій з генами резистентності передаватись через харчові ланцюги від сільськогосподарських тварин і при безпосередньому контакті від домашніх тварин до людей [152]. Таким чином, пошук нових лікарських засобів, ефективних у боротьбі з цими патогенами, є необхідним і актуальним.

Первинний скринінг антибактерійної активності проводили за концентрації 100 мкМ. Для виявлених активних сполук визначали показники мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) методом послідовних розведень. Результати скринінгу наведено у табл. 5.1.

Таблиця 5.1.

Значення IC<sub>50</sub> (мкМ) та МІК (мкМ) трициклічно-біциклічних гібридних сполук як інгібіторів синтезу РНК та росту бактерій

№	МІК <i>P. aeruginosa</i>	МІК <i>St. aureus</i>	МІК <i>En. faecalis</i>	IC <sub>50</sub> РНКП Т7
<b>5.1</b>	—	16,8 ± 3	8,4 ± 3	—
<b>5.2</b>	—	36,8 ± 3	9,0 ± 3	8,9 ± 2
<b>5.3</b>	—	16,6 ± 3	8,2 ± 2	5,5 ± 1
<b>5.4</b>	—	—	7,8 ± 2	19,8 ± 3
<b>5.5</b>	—	15,7 ± 3	7,9 ± 2	—
<b>5.6</b>	—	7,6 ± 2	7,6 ± 3	~ 45
<b>Офлоксацин</b>	—	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,4	—

\* — сполука не активна за початкової концентрації.

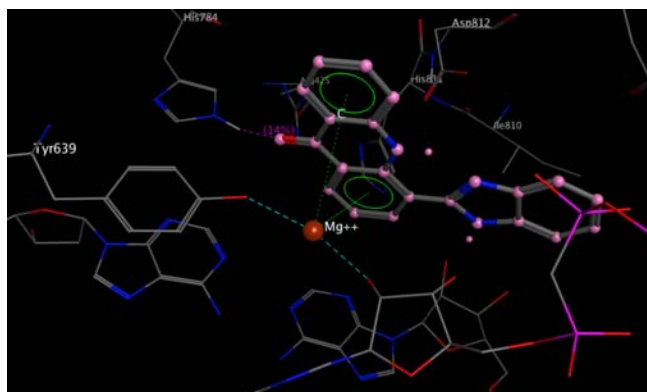
Грам негативна бактерія *P. aeruginosa* нечутлива до всіх тест-агентів, на відміну від двох досліджуваних грампозитивних бактерій. Найчутливішою є бактерія *E. faecalis*, при чому МІК тест-сполук коливалася в близьких межах від 9 до 7,6 мкМ. Натомість, активність речовин щодо *St. aureus* значно залежить від їхньої структури. Так, сполука **5.4** не інгібує ріст цієї бактерії, а найбільш ефективною є сполука **5.6** з МІК 7,6 мкМ. Варто зазначити, що сполука **5.6** однаково ефективно пригнічує обидві грампозитивні бактерії.

#### 5.4. Моделювання способу взаємодії трициклічно-біциклічних гібридних сполук з каталітичним сайтом РНКП Т7

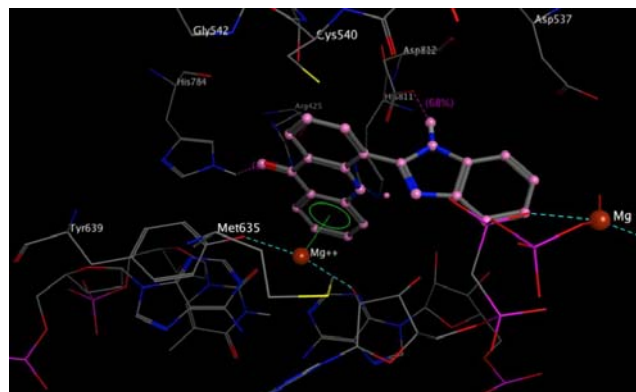
Для з'ясування можливого способу взаємодії гібридних сполук з каталітичним сайтом та виявлення ключових взаємодій «ензим-ліганд» проведено їхній молекулярний докінг у модель каталітичної кишені транскрипційного комплексу РНКП Т7, що відповідає фазі впізнавання вхідного нуклеотиду в послідовних актах синтезу РНК (pdb code 1S0V).

Вибрана ділянка каталітичної кишені радіусом 1,0 нм містила амінокислотні залишки Arg-425, Ser-541, Gly-542, Tyr-639, His-784 і Asp-812, що відповідають за зв'язування ліганду з рецептором. Більшість з них належать до функціонально важливих консервативних мотивів РНКП Т7 [46]. Докінг проводили з використанням гнучкого ліганду та фіксованої моделі рецептора.

За результатами докінгу при зв'язуванні з активним сайтом РНКП Т7 в обох сполуках акридону – **5.2** і **5.3** – утворюється внутрішньомолекулярний зв'язок між HN-10 акридонового фрагмента та N-3 бензімідазолу і аналогічно HN-10...N-3 бензотіазолу (довжина зв'язку 0,196 та 0,193 нм відповідно), рис. 5.6 і 5.7. У таких конформаціях – **5.2** та **5.3a** – обидва гетероциклічні фрагменти лежать в одній площині. Для сполуки **5.2** існує альтернативна непланарна конформація **5.2b**, (рис. 5.7) коли кут (торсійний кут) між акридоновим і бензімідазольним фрагментами стає близьким до 90° і внутрішньомолекулярний Н-зв'язок розривається. Натомість виникає Н-зв'язок між ендоециклічним атомом нітрогену бензімідазольного фрагмента та карбоксильною групою каталітичної Asp-812.



5.2a



5.2b

Рис. 5.6. Моделі зв'язування сполуки **5.2** із каталітичною кишенею транскрипційного комплексу РНКП Т7.

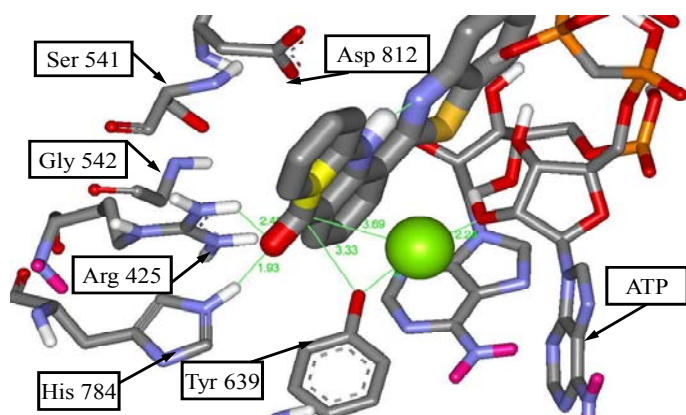
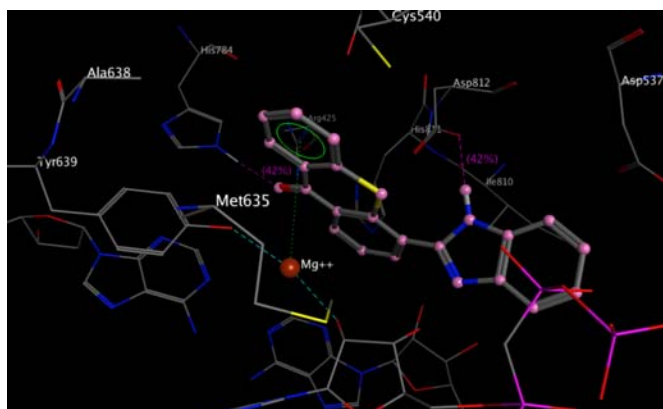
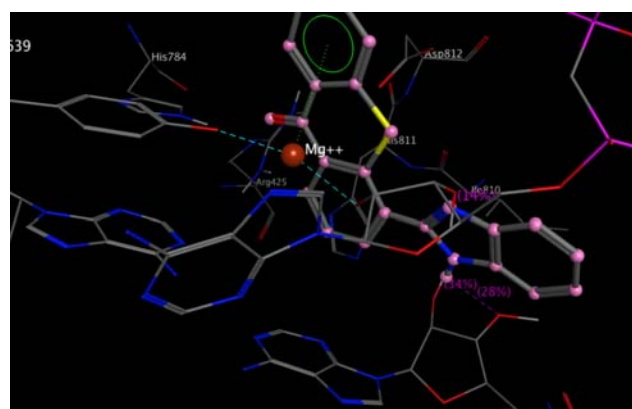


Рис. 5.7. Модель зв'язування сполуки **5.3** із каталітичною кишенею транскрипційного комплексу РНКП Т7.

Похідні тіоксантону з бензімідазолом та бензотіазолом не утворюють внутрішньомолекулярний Н-зв'язок і набувають непласкої конформації в ензиматичній мішені. Для гібриду тіоксантону з бензімідазолом **5.4** можливі два конформаційні варіанти, рис. 5.8. В першому утворюється Н-зв'язок бензімідазольного фрагмента з карбоксильною групою Asp-812 – конформація **5.4a**. У другому – бензімідазольний фрагмент зорієнтований таким чином, що утворює Н-зв'язок з 2'-ОН групою цукрового залишку останнього нуклеозиду РНК ланцюга – конформація **5.4b**, рис. 5.8.



5.4a



5.4b

Рис. 5.8. Моделі зв'язування сполуки **5.4** із каталітичною кишеною транскрипційного комплексу РНКП Т7.

Гібридні структури тіоксантону з бензотіазолом **5.5** та бензоксазолом **5.6** зв'язуються в активному сайті однаково рис. 5.9. Реалізується така конформація за якої N-1 атом азоту бензотіазолу (бензоксазолу) взаємодіє з 2'-ОН групою цукрового залишку вхідного нуклеотиду.

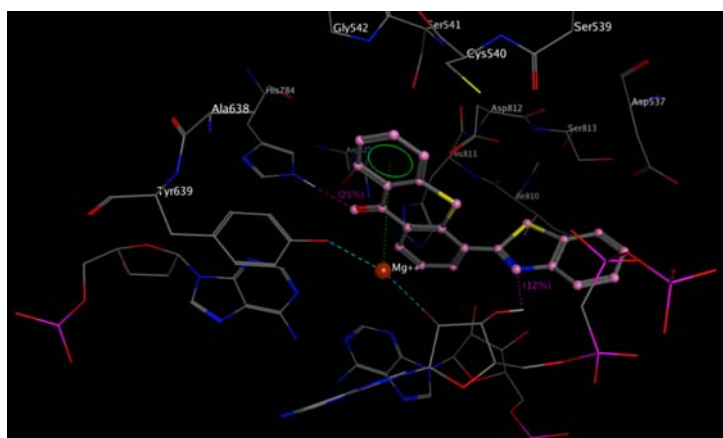


Рис. 5.9. Модель зв'язування сполуки **5.5** із каталітичною кишеною транскрипційного комплексу РНКП Т7.

Відносна оцінка взаємодії ліганд-мішень у рамках силового поля, що використовується в програмі (QXP/FLO+), визначається співвідношенням енергетичних характеристик контактів представлених сполук із протеїновим оточенням під час утворення комплексу. В табл. 5.2 відображено основні параметри які характеризують спорідненість сполук до мішені. За розрахованими показниками константи інгібування (pI), вільної енергії зв'язування (FreE), енергії

Н-зв'язків (Hbnd) та гідрофобних взаємодій (Cntc) всі досліджувані сполуки мають достатню афінність до рецептора – каталітичної кишені РНКП Т7.

Беручи до уваги одержані дані, можна запропонувати модель взаємодії досліджуваних гібридних сполук з ензиматичною мішенню. Згідно з цією моделлю трициклічні фрагменти сполук утримуються Н-зв'язками з гуанідиноювою групою Arg-425 і HN-1 His-784 та  $\pi$ -стекінг-взаємодією з йоном  $Mg^{2+}$ . За даними докінгу для реалізації інгібіторних властивостей гібридів необхідним є утворення копланарної структури молекули або взаємодія її біциклічного фрагмента з амінокислотним залишком каталітично важливої Asp-812.

Таблиця 5.2.

Енергетичні параметри комплексів ліганд – рецептор, одержані з використанням програми QXP/FLO+ та ензиматична активність сполук

Ліганд	Енергія, кДж/моль				IC <sub>50</sub> (мкМ) РНКП Т7
	pI*	FreE	Cntc	Hbnd	
<b>5.1</b>	3,7	-21,1	-57,4	-4,2	н/а
<b>5.2a</b>	3,6	-20,3	-58,8	-3,7	8,9 ± 2
<b>5.2б</b>	2,6	-15,1	-55,7	-2,9	8,9 ± 2
<b>5.3</b>	3,6	-20,6	-62,2	-1,9	5,5 ± 2
<b>5.4a</b>	4,1	-23,3	-58,9	-5,7	19,8 ± 1
<b>5.4б</b>	2,4	-13,7	-61,8	-2,0	19,8 ± 3
<b>5.5</b>	3,3	-18,9	-59,6	-2,6	н/а
<b>5.6</b>	3,1	-15,9	-57,7	-2,7	~ 45

\*-log K<sub>i</sub> – зворотній логарифм розрахованої константи інгібування; FreE – вільна енергія зв'язування; Hbnd – енергія водневих зв'язків; Cntc – енергія гідрофобних взаємодій; н/а – сполука не активна за початкової концентрації.

Ліганди заповнюють простір, необхідний для впізнавання і зв'язування функціональних фрагментів вхідного нуклеозидтрифосфату, утримують іони магнію та перешкоджають процесивним змінам руху доменів ензиму, необхідним для відтворення елонгації.

Різниця між розрахунковими даними та результатами експерименту пояснюється наступним. Відмінності в енергії взаємодії близьких за структурою лігандів з ензиматичною мішенню можуть бути досить незначними, тоді як їхні конформації та зв'язки з амінокислотним оточенням значно різняться, що приводить до появи так званих «помилково позитивних хітів».

### 5.5. Дослідження відповідності трициклічно-біциклічних гібридних сполук правилам Ліпінського

Для трициклічно-біциклічних гібридних сполук були розраховані значення  $\log P$ , кількість донорів та акцепторів Н-зв'язку та молекулярну вагу, щоб визначити їхню відповідність правилам «п'яти» Ліпінського [150]. Результати розрахунків наведені в табл. 5.3.

Таблиця 5.3.

Розраховані фізико-хімічні параметри трициклічно-біциклічних гібридних сполук

№ сполуки	Mw г/моль	Hbond donors	Hbond acceptors	$\log P$
<b>5.1</b>	296,33	1	3	4,02
<b>5.2</b>	311,34	2	4	3,55
<b>5.3</b>	328,39	1	3	4,12
<b>5.4</b>	328,39	1	3	4,16
<b>5.5</b>	345,44	0	2	4,60
<b>5.6</b>	329,37	0	3	3,98

\*Hbond donors – донори Н-зв'язку

Hbond acceptors – акцептори Н-зв'язку

За даними розрахунків наведених в табл. 5.3 всі гібридні сполуки відповідають правилам Ліпінського, і за цією характеристикою можуть бути драг кандидатами.

## ВИСНОВКИ

1. Серед трициклічно-біциклічних гібридних сполук виявлено три ефективні інгібітори синтезу РНК **5.2**, **5.3**, **5.6** ( $IC_{50}$  8,9; 5,7 та 19,8 мкМ).

2. Показано концентраційно- та структуро-залежну антибактерійну дію трициклічно-біциклічних гібридних сполук щодо грампозитивних патогенних мікроорганізмів. Найефективнішою є сполука **5.6** [4-(1Н-Бензоксазол-2-іл)-10-



тіоксантенон], яка пригнічує ріст *Enterococcus faecalis* та *Staphylococcus aureus* зі значеннями МІК = 7,6 мкМ.

3. Визначено, що сполуки **5.1** [1-(1Н-бензімідазол-2-ил)феназин], **5.2** [4-(1Н-Бензімідазол-2-іл)-10Н-акридин-9-он] та **5.4** [4-(1Н-Бензімідазол-2-іл)-10-тіоксантенон] зв'язуються з ДНК. Висунуто припущення, що саме здатність зв'язуватися з ДНК сполуки **5.2** може бути відповідальною за інгібування нею активності РНК-полімерази фагу Т7.

4. Продемонстровано методом молекулярного докінгу можливий спосіб взаємодії синтезованих сполук з транскрипційний комплексом РНКП Т7.

Основні наукові результати розділу опубліковані в працях:

Гібридні інгібітори РНК-полімерази фага Т7: синтез, докінг та скринінг *in vitro* / Костіна В. Г., Пальчиковська Л. Г., Платонов М. О., Васильченко О. В., Лисенко Н. А., Алєксєєва І. В. // Укр. біохім. журн. – 2012. – т. 84. № 5. – С. 38-47.

Оцінка антибактерійної активності сполук – гібридів три- і біциклічних гетеро основ – інгібіторів синтезу РНК / Васильченко О. В., Єгоров Д. П., Маньковська О. С., Трунцева І. Г., Григор'єва С. М., Костіна В. Г., Пальчиковська Л. Г. // The animal biology. – 2013. – Vol. 15. № 1.. – Р. 34-40.

## РОЗДІЛ 6

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ РОБОТИ

#### 6.1. Синтез ТГКК та їхніх ариламідів

У результаті виконання дисертаційної роботи розроблено зручні препаративні методи синтезу ариламідів 9-заміщеної феназин-1-карбонової кислоти і триазинобензотіазин-6-та 8- арилкарбоксамідів. Синтезовано та охарактеризовано нові сполуки 6- та 8- триазинобензотіазинкарбонові кислоти, а також їхні попередники, *орто*-амінотеофенолкарбонові кислоти. За розробленими методиками було синтезовано та охарактеризовано 40 нових ТГКК та їхніх ариламідів. Структуру речовин доведено за допомогою протонного магнітного резонансу та хроматомасс спектрометрії.

Для синтезу похідних ФКК-1 використовували двохстадійний вдосконалений підхід. Вибір нових умов проведення стандартних реакцій дозволив збільшити виходи кінцевих сполук. Для синтезу 8-мктил-ТБТ-6- та ТБТ-8-КК розроблено зручний метод отримання їхніх попередників – *орто*-амінотеофенолкарбонових кислот, не описаних раніше сполук. Використання інертної атмосфери під час реакції гідролізу дозволило суттєво збільшити вихід сполук **4.5**, **4.6**. Аналіз спектрів ЯМР  $^1\text{H}$  дозволив встановити таутомерні форми синтезованих похідних ТБТ, а також трициклічно-біциклічних гібридних сполук **5.1-5.6**.

## 6.2. Дослідження впливу ТКГГ та їхніх ариламідів на синтез РНК *in vitro*

Дослідження впливу синтезованих сполук на синтез РНК проводили в модельній системі транскрипції РНКП Т7. Серед 24 протестованих 9-заміщених ФКК-1 та їхніх ариламідів 15 достовірно інгібують процес транскрипції зі значеннями  $IC_{50}$  в межах 38,3-0,48 мкМ. Найвищу активність демонструють сполуки (**3.16**, **3.18**, **3.24**, **3.25**, **3.26** і **3.32**), що мають об'ємні замісники ( $CF_3$ ,  $COOMe$ , парабутил) в *мета*- та *пара*-положеннях арильного фрагменту амідів, виключенням є *n*-трифлуорометилфеніламід 9-метокси ФКК-1 (**3.17**), що не впливає на процес транскрипції *in vitro*. Найефективнішим є *n*-бутилфеніламід 9-метил ФКК-1 (**3.26**) зі значенням  $IC_{50} = 0,48$  мкМ.

Тестування синтезованих 8-метил-ТБТ-6- ТБТ-8-КК та їхніх ариламідів в модельній системі транскрипції РНКП Т7 показав, що шість з шіснадцяти сполук, а саме **4.12**, **4.13**, **4.19-4.21** і **4.23** ефективно пригнічують синтез РНК в межах значень  $IC_{50} = 15,9-4,9$  мкМ. Найефективнішим є *n*- $CF_3$ -феніламід ТБТ-8-карбонової кислоти (**4.20**) зі значенням  $IC_{50} = 4,9$  мкМ. Присутність трифлуорометильних замісників у *мета*- і *пара*-положеннях ариламідного фрагменту відповідних похідних обох серій (сполуки **4.12**, **4.13**, **4.19** і **4.20**) підвищує ефективність пригнічення синтезу РНК у порівнянні з ТБТКК та їхніми не заміщеними феніламидами. Серед піридиламідів тільки сполука **4.23** (піридин-4-ил-амід-ТБТ-8-кислоти) демонструє достатньо високу інгібуючу активність зі значенням  $IC_{50} = 15,9$  мкМ. Загалом ариламиди ТБТ-8-КК виявилися більш активними інгібіторами транскрипції, аніж їхні 8-метил-ТБТ-6 аналоги.

Загалом серед синтезованих 40 нових ТКГК та їхніх ариламідів виявлено 21 ефективний інгібітор синтезу РНК. Отримані результати свідчать про те, що трициклічні гетероароматичні карбонові кислоти та їхні ариламиди є перспективним класом для створення нових інгібіторів синтезу РНК.

### 6.3. Дослідження антибактерійної дії ТГКК та їхніх ариламідів

Антибактерійну активність синтезованих похідних 9-заміщених ФКК-1 проводили на бактеріальних лініях клітин *Erysipelothrix rhusiopathiae* VR-2 var. IVM, *Klebsiella Spp*, *E.coli* ATCC25922.

Грампозитивна бактерія *Erysipelothrix rhusiopathiae* виявилася чутливою до 8 досліджуваних сполук. Найвищу здатність пригнічувати ріст цього штаму демонструють 9-метокси-ФКК-1 (**3.9**) та її орто-толїламід (**3.12**) з МІК 0,39 та 0,3 мкМ, відповідно. Значна кількість досліджуваних тест-агентів виявилася ефективними інгібіторами грамнегативних бактерій. Ріст *Klebsiella Spp*. ефективно пригнічують сім сполук: **3.10**, **3.12**, **3.14**, **3.16**, **3.19**, **3.20** і **3.30** в межах значень МІК від 4 до 2 мкМ. Ріст *Escherichia coli* пригнічують дві сполуки **3.15** та **3.29** зі значеннями МІК 0,25 та 3 мкМ, відповідно. Причому сполуки **3.11**, **3.12** і **3.13** гальмували ріст обох грамнегативних бактерій. Загалом похідні 9-метокси-ФКК-1 проявляють вищу антибактерійну дію, аніж похідні 9-метил-ФКК-1.

Під час вивчення антибактерійної активності похідних ТБТ встановлено, що найчутливішою до дії сполук є грампозитивна бактерія *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Вісім досліджуваних тест-агентів: **4.8-4.10**, **4.12**, **4.13**, **4.17**, **4.19** і **4.21** повністю пригнічують її ріст у межах МІК 9,7-1,0 мкМ. Натомість друга грампозитивна бактерія *St. aureus* чутлива лише до *n*-н-бутилфеніламіду-ТБТ-8-КК (**4.21**) МІК якого 1 мкМ. Щодо грамнегативних бактерій досліджувані похідні ТБТ демонструють вибіркову активність. Три сполуки: **4.8**, **4.16** і **4.20** повністю блокують ріст бактерії *E.coli* за МІК у межах від 14,8 до 10 мкМ, а сполуки **4.8**, **4.9**, і **4.13** у тому ж діапазоні концентрацій повністю інгібують ріст бактерії *Klebsiella spp*. Ріст *Pasteurella Multocida* ефективно пригнічують 3 сполуки: **4.8**, **4.17**, і **4.19** зі значенням МІК близько 1 мкМ, тоді як ріст *Salmonella holerasuis* інгібує лише лише ТБТ-6-КК (**4.8**) з МІК = 14,8 мкМ.

З 40 досліджених сполук виявлено 18 речовин з антибактерійними властивостями з МІК = 4-0,25 мкМ, 10 з яких інгібують синтез РНК в системі

транскрипції РНКП T7. Для сполук **4.12**, **4.13**, **4.19**, **4.20** і **4.21** значення МІК та  $IC_{50}$  знаходяться у близьких межах.

Отримані результати свідчать про те, що трициклічні гетероароматичні карбонові кислоти та їхні ариламідні є перспективним класом для пошуку нових антибактерійних агентів. Ймовірний механізм дії цих сполук – інгібування бактерійних РНК-синтезувальних комплексів.

#### 6.4. Дослідження протівірусної дії ТГКК та їхніх ариламідів

Для оцінки антивірусних властивостей та з'ясування взаємозв'язку між функціональною активністю і структурою феніламідів ФКК-1 до тестування залучено три *пара*-*n*-бутилфеніламіди – сполуки **3.18**, **3.26** та **3.34**. З'ясувалося, що природа замісника у положенні 9 феназинового гетероциклу значно впливає як на токсичність, так і на протівірусні властивості ариламідів ФКК-1. Так, *пара*-*n*-бутилфеніламід **3.34** демонструє високу активність зі значенням  $EC_{50} = 0,88$  мкМ. Введення у положення 9 феназинового гетероциклу гідрофобної метильної групи приводить до підвищення активності *пара*-*n*-бутилфеніламіду **3.26**, який демонструє найвищу активність зі значенням  $EC_{50} = 0,42$  мкМ. Натомість, заміна метильної групи на метоксигрупу, приводить до повної втрати антивірусної активності відповідного *пара*-*n*-бутилфеніламіду 9-метокси ФКК-1 (**3.18**). 9-заміщені аміді ФКК-1 **3.18** і **3.26** проявляють низьку токсичність на ПККНТ зі значенням  $EC_{50}$  близько 65 мкМ, тоді як не заміщений амід **3.34** демонструє доволі високу токсичну дію зі значенням  $EC_{50} = 8,8$  мкМ.

Слід зауважити, що сполука **3.26** демонструє найефективнішу інгібуючу дію як щодо синтезу РНК у модельній системі транскрипції РНКП Т7, так і щодо реплікації ВБВД. Більш того, значення  $EC_{50}$  та  $IC_{50}$  дуже близькі, що дозволяє прогнозувати можливий механізм дії - пригнічення РНК-синтезуального комплексу вірусу.

Для оцінки антивірусних властивостей та з'ясування взаємозв'язку між функціональною активністю і структурою феніламідів до тестування залучено *орто*-, *мета*- і *пара*- $CF_3$ -феніламіди та *пара*-*n*-бутилфеніламіди обох ТБТКК. Зіставлення результатів впливу вибраних N-аріламідів на синтез РНК у модельній системі транскрипції та зтаності інгібувати репродукцію ВБВД демонструє істотну кореляцію між цими даними. Обидва *орто*- $CF_3$ -феніламіди **4.11** і **4.18** мають слабку здатність інгібувати синтез РНК і практично не впливають на репродукцію ВБВД. *Пара*-*n*-бутилфеніл ТБТ-6-КК (**4.14**) не впливає як на синтез РНК *in vitro*, так і на репродукцію ВБВД, а його ТБТ-8 аналог (**4.21**),

як і інші досліджені сполуки ефективно інгібують як синтез РНК *in vitro*, так і репродукцію ВБВД. Ариламід 8-метил-ТБТ-6-КК з трифлуорометильною групою в *мета*- та *пара*-положеннях (**4.12** та **4.13**) продемонстрували більш ніж у двічі меншу противірусну активність у порівнянні з аналогічними похідними ТБТ-8-КК. Найефективнішим інгібітором як синтезу РНК, так і репродукції ВБВД є трифлуорометилфеніламід-ТБТ-8-КК (**4.20**),  $IC_{50} = 4,9$  мкМ,  $EC_{50} = 1,5$  мкМ.

Висока кореляція здатності інгібувати синтез РНК і репродукцію ВБВД вказує на те, що ймовірний механізм дії карбоксариламідів ТБТ – пригнічення РНК-синтезувального комплексу ВБВД.

Для двох сполук, що найактивніше інгібують реплікацію вірусу бичачої вірусної діареї, а саме **3.26** та **4.20** експериментально визначено параметри розчинності у водно-фосфатному буфері та параметри  $\log D$ . Для сполуки **3.26**  $\log D = 4,95$ , а розчинність складає 17 мкМ. Для сполуки **4.20**  $\log D = 3,67$ , а розчинність складає 42 мкМ. Біологічні та фізико-хімічні властивості цих сполук спонукають до продовження їхніх досліджень у тому числі в *in vivo*, а також щодо здатності інгібувати ними репродукцію вірусу гепатиту С.

Загалом з 11 досліджених сполук виявлено 8 речовин, що пригнічують реплікацію вірусу бичачої вірусної діареї зі значенням  $EC_{50} < 30$  мкМ. Кореляція результатів впливу сполук на синтез РНК та реплікацію ВБВД свідчить про те, що ймовірним механізмом дії досліджених сполук є інгібування РНК-синтезувального комплексу вірусу.

## 6.5. Моделювання взаємодії ариламідів ТГКК з каталітичною кишенею РНКП Т7

З метою визначення можливого механізму дії сполук у системі транскрипції РНКП Т7, досліджувані речовини були здоковані у активний сайт РНК-полімерази фагу Т7 в момент входження до сайту нового нуклеотиду. Аналіз результатів докінгу показав, що можливим механізмом дії сполук може полягати в утворенні потрійного непродуктивного комплексу: полімераза-ДНК-матриця-інгібітор. Так для похідних ФКК-1 Результати докінгу не погано корелюють з даними впливу сполук на синтез РНК *in vitro* у модельному транскрипційному комплексі РНКП Т7. Сполука **3.30**, що мала за результатами докінгу найнижче значення  $pI$  слабо впливала на синтез РНК ( $IC_{50} \sim 57,4$  мкМ). Серед 6 інших речовин, лише сполука **3.17**, не проявила активності, тоді як інші 5 сполук **3.18**, **3.25**, **3.26**, **3.33** та **3.34** виявилися ефективними інгібіторами синтезу РНК ( $IC_{50} = 0,48-31,2$  мкМ).

Для похідних ТБТ показано, що сполуки які ефективно зв'язувалися з активним сайтом за результатами докінгу **4.13**, **4.20**, **4.21** ефективно інгібували і синтез РНК *in vitro*. Натомість сполуки, що за даними докінгу слабо зв'язуються з активним сайтом, демонструють низьку активність в системі транскрипції, або не проявляють активності.



## 6.6. Дослідження гібридних сполук три- та біциклічних гетерооснов

Нами було досліджено вплив на активність сполук більш високої «жорсткості» закріплення «псевдоарилкарбоксамідного» фрагменту до центрального гетероциклу, а ніж в ариламидах трициклічних карбонових кислот.

Гібридні сполуки **5.2**, **5.3** і **5.4** повністю блокують функціонування транскрипційної системи, натомість, РНКП Т7 нечутлива до сполук **5.1**, **5.5** і дуже слабо інгібується сполукою **5.6**, рис. 5.4.А. Найактивнішим інгібітором синтезу РНК є сполука **5.3**, рис 5.4.Б. Розраховані значення  $IC_{50}$  для тест-агентів **5.2**, **5.3** і **5.4** становлять 8,9, 5,7 і 19,8 мкМ, відповідно.

Отримані результати показують, що визначальну роль у інгібіторній активності сполук в модельній системі транскрипції РНКП Т7 відіграє трициклічний гетероцикл. Похідні акридонового гетероциклу **5.2** та **5.3** активно інгібують синтез РНК *in vitro*. Похідні тіаксантону **5.4**, **5.5** і **5.6** менш активні, а похідне феназину **5.1** не впливає на синтез РНК.

За результатом дослідження гібридні сполуки **5.1**, **5.2** та **5.4** демонструють достовірну здатність зв'язуватися з ДНК, при чому найсильніше взаємодіяли з ДНК гібриди **5.2** і **5.4**.

Грам негативна бактерія *P. aeruginosa* нечутлива до всіх тест-агентів, на відміну від двох досліджуваних грампозитивних бактерій. Найчутливішою є бактерія *E. faecalis*, при чому МІК тест-сполук коливалася в близьких межах від 9 до 7,6 мкМ. Натомість, активність речовин щодо *St. aureus* значно залежить від їхньої структури. Так, сполука **5.4** не інгібує ріст цієї бактерії, а найбільш ефективною є сполука **5.6** з МІК 7,6 мкМ. Варто зазначити, що сполука **5.6** однаково ефективно пригнічує обидві грампозитивні бактерії.

## ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі представлено оригінальний узагальнений підхід до створення нових антибактерійних та противірусних сполук на основі ТГКК та їхніх ариламідів, механізм дії яких може полягати у пригніченні РНК-синтезувальних комплексів патогенів.

1. Показано, що представники ТГКК та їхніх ариламідів є ефективними інгібіторами синтезу РНК *in vitro*. Серед 40 синтезованих сполук виявлено 21 інгібітор синтезу РНК в межах значень  $IC_{50}$  від 38 до 0,48 мкМ.

2. Виявлено низку сполук з ефективною антибактерійною та противірусною дією. Значний рівень активності вибраних сполук вказують на їхню високу перспективність і спонукають до подальшого поглибленого дослідження, у тому числі *in vivo*.

3. Встановлено, що ймовірним механізмом антибактерійної та противірусної дії сполук є інгібування РНК-синтезувальних комплексів патогенів.

4. Виявлено, що наявність жорстко закріпленої псевдоарилкарбоксамідної групи у аналогів ариламідів ТГКК приводить до виникнення антибактерійної дії щодо *Enterococcus faecalis* та *Staphylococcus aureus*.

5. Показано, за допомогою методу молекулярного докінгу, що вірогідним способом взаємодії синтезованих сполук з модельним транскрипційним комплексом бактеріофагу Т7 є зв'язування інгібіторів з функціонально важливими амінокислотними залишками каталітичної кишені РНКП Т7.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Faramak A., Ghisalberti E., Skelton B. and White A. Molecular Structure of Terrecyclodiol: A Derivative of the Antifungal Metabolite Terrecyclic Acid A from *Aspergillus terreus* // J. Nat. Prod. – 1996. – Vol. 59, № 1. – P. 59-61.
2. Jayatilake G., Thornton M., Leonard A., Grimwade J. and Baker B. Metabolites from an Antarctic Sponge-Associated Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* // J. Nat. Prod. – 1996. – Vol. 59, № 3. – P. 293-296.
3. Maul C., Sattler I., Zerlin M., Hinze C., Koch C., Maier A., Grabley S., Thiericke R. Biomolecular-chemical screening: a novel screening approach for the discovery of biologically active secondary metabolites. III. New DNA-binding metabolites // J. Antibiot. – 1999. – Vol. 52, № 12. – P. 1124-1134.
4. Chatterjee S., Vijayakumar E., Franco C., Maurya R., Blumbach J., Ganguli B. Phencomycin, a new antibiotic from a *Streptomyces* species HIL Y-9031725 // J. Antibiot. – 1995. – Vol.48, № 11. – P. 1353-1354.
5. Pusecker K., Laatsch H., Helmke E., Weyland H. Dihydrophencomycin methyl ester, a new phenazine derivative from a marine *Streptomyces* // J. Antibiot. – 1997. – Vol.50, № 6. – P. 479-483.
6. Turner J., Messenger A. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production // J. Adv. Microb. Physiol. – 1986. – Vol. 27. – P. 211-275.
7. Tipton C., Rinehart K. Jr. Lomofungin. I. Degradative studies of a new phenazine antibiotic // J. Am. Chem. Soc. – 1970. – Vol. 92, № 5. – P. 1425-1426.
8. Bergy M., Johncon R. Antibiotic lomondomycin and method of production // Патент US3359165. – 1967.
9. Bush K., Henry P., Souser-Woehleke M., Trejo W., Slusarchyk D. Phenacein an angiotensin-converting enzyme inhibitor produced by a streptomyces. I. Taxonomy, fermentation and biological properties // J. Antibiot. – 1984. – Vol. 37, № 11. – P. 1308-1312.

10. Liu W., Parker W., Brandt S., Atwal K., Ruby E. Phenacein an angiotensin-converting enzyme inhibitor produced by a streptomycete. II. Isolation, structure determination and synthesis // J. Antibiot. – 1984. – Vol. 37, № 11. – P. 1313-1319.
11. Gilpin M., Fulston M., Payne D., Cramp R., Hood I. Isolation and structure determination of two novel phenazines from a Streptomyces with inhibitory activity against metallo-enzymes, including metallo-beta-lactamase // J. Antibiot. – 1995. – Vol. 48, № 10. – P. 1081-1085.
12. Santamaria J., Ouchabane R., Rigaudy J. Electron-transfer activation. Photochemical N-demethylation of tertiary amines // Tetrahedron Lett. – 1996. – Vol. 30, № 22. – P. 2927-2928.
13. Smitka T., Bunge H., Wilton H., Hokanson C., French C., He H., Clardy J. PD 116,152, a new phenazine antitumor antibiotic. Structure and antitumor activity // J. Antibiot. – 1986. – Vol. 39, № 6. – P. 800-803.
14. Tunac B., Mamber W., Graham D., Dobson E. PD 116,152, a novel phenazine antitumor antibiotic. Discovery, fermentation, culture characterization and biological activity // J. Antibiot. – 1986. – Vol.39, № 2. – P. 192-197.
15. Umezawa H. On a new antibiotic, griseolutein, produced Streptomyces // J. Antibiot. – 1951. – Vol. 4, № 1. – P. 34-40
16. Alleaume M. and Hickel D. The crystal structure of grisorixin silver salt // J. Chem. Soc., Chem. Commun. – 1970. – Vol. 21. – P. 1422-1423.
17. Kitahara M., Nakamura H., Matsuda Y., Hamada M., Naganawa H., Maeda K., Umezawa H., Iitaka Y. Saphenamycin, a novel antibiotic from a strain of Streptomyces // J. Antibiot. – 1982. – Vol.35, № 10. – P. 1412-1414.
18. Nakamura S. Studies on the Structure of Griseolutein-B, a Streptomyces Antibiotic. II. Decarboxylation and Periodic Acid Oxidation // Chem. Pharm. Bull. – 1958. – Vol. 6, № 5. – P. 543-547.
19. Nakamura S. Studies on Structure of Griseolutein B, a Streptomyces Antibiotic. I. Characterization and Degradation // Chem. Pharm. Bull. – 1958. – Vol. 6, № 5. – P. 539-543.

20. Nakamura S. Structure of griseolutein B // J. Antibiot. – 1959. – Vol. 12, № 1. – P. 26-27.
21. Nakamura S. Studies on Structure of Griseolutein-B, a Streptomyces Antibiotic. III. The Complete Structure // Chem. Pharm. Bull. 1958. – Vol. 6, №5. – P. 547-550.
22. Nakano H., Yoshida M., Shirahata K., Ishii S., Arai Y., Morimoto M., Tomita F. Senacarcin A, a new antitumor antibiotic produced by Streptomyces endus subsp. aureus // J. Antibiot. – 1982. – Vol. 35, № 6. – P. 760-762.
23. Gebhardt K, Schimana J, Krastel P, Dettner K, Rheinheimer J, Zeeck A, Fiedler HP. Endophenazines A-D, new phenazine antibiotics from the arthropod associated endosymbiont Streptomyces anulatus. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities // J. Antibiot. 2002. – Vol. 55, №9. – P. 794-800.
24. Krastel P., Zeeck A., Gebhardt K., Fiedler P., Rheinheimer J. Endophenazines A-D, new phenazine antibiotics from the athropod associated endosymbiont Streptomyces anulatus II. Structure elucidation // J. Antibiot. – 2002. – Vol. 55, № 9. – P. 801-806.
25. Emoto T., Kubosaki N., Yamagiwa Y., Kamikawa T. A new route to phenazines // Tetrahedron Lett. – 2000. – Vol. 41, № 3. – P. 355-358.
26. Shinya K., Furihata K., Hayakawa Y., Seto H., Kato Y., Clardy J. The structure of benthocyanin A. A new free radical scavenger of microbial origin // Tetrahedron Lett. – 1991. – Vol. 22, № 7. – P. 943-946.
27. Shinya K., Furihata K., Teshima Y., Hayakawa Y., Seto H. Benthocyanins B and C, new free radical scavengers from Streptomyces prunicolor // J. Org. Chem. – 1993. – Vol. 58, № 15. – P. 4170-4172.
28. Geiger A. , Keller-Schierlein W., Brandl M., Zähler H. Metabolites of microorganisms. 247. Phenazines from Streptomyces antibioticus, strain Tü 2706 // J. Antibiot. – 1988. – Vol. 41, № 11. – P. 1542-1551.
29. Michel K., Hoehn H. Process for production of antibiotic from streptomyces // Патент US4316959. – 1982.

30. Asano K., Takahashi K., Tomita F., Kawamoto I. DC-86-M, a novel antitumor antibiotic. I. Taxonomy of producing organism and fermentation // *J. Antibiot.* – 1986. – Vol. 39, № 5. – P. 619-623.
31. Takahashi K., Takahashi I., Morimoto M., Tomita F. DC-86-M, a novel antitumor antibiotic. II. Structure determination and biological activities // *J. Antibiot.* – 1986. – Vol. 39, № 5. – P. 624-628.
32. Shoji J., Sakazaki R., Nakai H., Terui Y., Hattori T., Shiratori O., Kondo E., Konishi T. Isolation of a new phenazine antibiotic, DOB-41, from *Pseudomonas* species // *J. Antibiot.* – 1988. – Vol. 41, № 5. – P. 589-594.
33. Kim G., Ryoo J., Yun S., Shinya K., Seto H., Yoo D. Phenazostatin C, a new diphenazine with neuronal cell protecting activity from *Streptomyces* sp // *J. Antibiot.* – 1999. – Vol. 52, № 8. – P. 758-761.
34. Yun B., Ryoo I., Kim W., Kim J., Koshino H., Seto H., Yoo I. Structures of phenazostatins A and B, neuronal cell protecting substances of microbial origin // *Tetrahedron Lett.* – 1996. – Vol. 37, № 47. – P. 8529-8530.
35. Kim W., Ryoo J., Yun S., Shinya K., Seto H., Yoo I. New diphenazines with neuronal cell protecting activity, phenazostatins A and B, produced by *Streptomyces* sp // *J. Antibiot.* – 1997. – Vol. 50, № 9. – P. 715-721.
36. Pathirana C., Jensen P., Dwight R., Fenical W. Rare phenazine L-quinovose esters from a marine actinomycete // *J. Org. Chem.* – 1992. – Vol. 57, № 2. – P. 4170-4172.
37. Kato S., Shindo K., Yamagishi Y., Matsuoka M., Kawai H., Mochizuki J. Phenazoviridin, a novel free radical scavenger from *Streptomyces* sp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological properties // *J. Antibiot.* – 1993. – Vol. 46, № 10. – P. 1485-1493.
38. Kunigami T., Shinya K., Furihata K., Furihata K., Hayakawa Y., Seto H. A novel neuronal cell protecting substance, aestivophoenin C, produced by *Streptomyces purpeofuscus* // *J. Antibiot.* – 1998. – Vol. 51, № 9. – P. 880-882.

39. Imamura N., Nishijima M., Takadera T., Adachi K., Sakai M., Sano H. New anticancer antibiotics pelagiomicins, produced by a new marine bacterium *Pelagibacter variabilis* // *J. Antibiot.* – 1997. – Vol. 50, № 1. – P. 8-12.
40. Singh M., Menendez A., Petersen P., Ding W., Maiese W., Greenstein M. Biological and mechanistic activities of phenazine antibiotics produced by culture LL-14I352 // *J. Antibiot.* – 1997. – Vol. 50, № 9. – P. 785-787.
41. Giddens S., Feng Y., Mahanty H. Characterization of a novel phenazine antibiotic gene cluster in *Erwinia herbicola* Eh1087 // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 45, № 3. – P. 769-783.
42. Rewcastle G., Denny W., Baguley B. Potential antitumor agents. 51. Synthesis and antitumor activity of substituted phenazine-1-carboxamides // *J. Med. Chem.* – 1987. – Vol. 30, № 5. – P. 843-851.
43. Gamage S., Spicer J., Finlay G., Stewart A., Charlton P., Baguley B., Denny W. Dicationic bis(9-methylphenazine-1-carboxamides): relationships between biological activity and linker chain structure for a series of potent topoisomerase targeted anticancer drugs // *J. Med. Chem.* – 2001. – Vol. 44, № 9. – P. 1407-1405.
44. Spicer J., Gamage S., Rewcastle G., Finlay G., Bridewell D., Baguley B., Denny W. Bis(phenazine-1-carboxamides): structure-activity relationships for a new class of dual topoisomerase I/II-directed anticancer drugs // *J. Med. Chem.* – 2000. – Vol. 43, № 7. – P. 1350-1358.
45. Gamage S., Rewcastle G., Baguley B., Charlton P., Denny W. Phenazine-1-carboxamides: structure-cytotoxicity relationships for 9-substituents and changes in the H-bonding pattern of the cationic side chain // *Bioorg. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 14, № 4. – P. 1160-1168.
46. Пальчиковська Л. Г., Алексеева І. В., Костіна В. Г. // *Укр. біохім. журн.* – 2008. Т. 80, № 3. – P. 142-146.
47. De Logu A., Palchykovska L., Kostina V., Sanna A., Meleddu R., Chisu L., Alexeeva I., Shved A. Novel N-aryl- and N-heteryl phenazine-1-carboxamides as potential agents for the treatment of infections sustained by

- drug-resistant and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // J. Antimicrob. Agents. – 2009. – Vol. 33, № 3. – P. 223-229.
48. Chen Q., Deady L., Baguley B., Denny W. Electron-deficient DNA-intercalating agents as antitumor drugs: aza analogues of the experimental clinical agent N-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide // J. Med. Chem. – 1994. – Vol. 37, № 5. – P. 593-597.
  49. Wakelin L., Adams A., Denny W. Kinetic studies of the binding of acridinecarboxamide topoisomerase poisons to DNA: implications for mode of binding of ligands with uncharged chromophores // J. Med. Chem. – 2002. – Vol. 42, № 4. – P. 894-901.
  50. Palmer B., Rewcastle G., Atwell G., Baguley B., Denny W. Potential antitumor agents. 54. Chromophore requirements for in vivo antitumor activity among the general class of linear tricyclic carboxamides // J. Med. Chem. – 1988. – Vol. 31, № 4. – P. 707-712.
  51. Dodic N., Dumaitre B., Daugan A., Pianetti P. Synthesis and activity against multidrug resistance in Chinese hamster ovary cells of new acridone-4-carboxamides // J. Med. Chem. – 1988. – Vol. 38, № 13. – P. 2418-2426.
  52. Stankiewicz-Drogon A., Palchykovska L., Kostina V., Alexeeva I., Shved A., Boguszevska-Chachulska A. New acridone-4-carboxylic acid derivatives as potential inhibitors of hepatitis C virus infection // J. Antimicrob. Agents. – 2008. – Vol. 16, № 19. – P. 8846-8852.
  53. Stankiewicz-Drogoń A., Dörner B., Erker T., Boguszevska-Chachulska A. Synthesis of new acridone derivatives, inhibitors of NS3 helicase, which efficiently and specifically inhibit subgenomic HCV replication // J. Med. Chem. – 2010. – Vol. 53, №8. – P. 3117-3126.
  54. Henry D., Jurs P., Denny W. Structure-antitumor activity relationships of 9-anilinoacridines using pattern recognition // J. Med. Chem. – 1982. – Vol. 25, № 8. – P. 889-908.
  55. Denny W., Cain B., Atwell G., Hansch C., Panthananicakal A., Leo A. Potential antitumor agents. 36. Quantitative relationships between experimental antitumor



- activity, toxicity, and structure for the general class of 9-anilinoacridine antitumor agents // J. Med. Chem. – 1982. – Vol. 25, № 3. – P. 276-315.
56. Rewcastle G., Denny W., Baguley B. Potential antitumor agents. 51. Synthesis and antitumor activity of substituted phenazine-1-carboxamides // J. Med. Chem. – 1987. – Vol. 30, № 5. – P. 843-851.
  57. Atwell G., Rewcastle G., Baguley B., Denny W. Potential antitumor agents. 50. In vivo solid-tumor activity of derivatives of N-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide // J. Med. Chem. – 1987. – Vol. 30, № 4. – P. 664-669.
  58. Wakelin L., Atwell G., Rewcastle G., Denny W. Relationships between DNA-binding kinetics and biological activity for the 9-aminoacridine-4-carboxamide class of antitumor agents // J. Med. Chem. – 1987. – Vol. 30, № 5. – P. 855-861.
  59. Rewcastle G., Atwell G., Chambers D., Baguley B., Denny W. Potential antitumor agents. 46. Structure-activity relationships for acridine monosubstituted derivatives of the antitumor agent N-[2-(dimethylamino)ethyl]-9-aminoacridine-4-carboxamide // J. Med. Chem. – 1986. – Vol. 29, № 4. – P. 472-477.
  60. Denny W., Atwell G., Rewcastle G., Baguley B. Potential antitumor agents. 49. 5-substituted derivatives of N-[2-(dimethylamino)ethyl]-9-aminoacridine-4-carboxamide with in vivo solid-tumor activity // J. Med. Chem. – 1987. – Vol. 30, № 4. – P. 658-663.
  61. Spicer J., Gamage S., Atwell G., Finlay G., Baguley B., Denny W. Structure-activity relationships for acridine-substituted analogues of the mixed topoisomerase I/II inhibitor N-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide // J. Med. Chem. – 1997. – Vol. 40, № 12. – P. 1919-1929.
  62. Radadiya, V R; Purohit, D M; Patolia, V N. Synthesis and antimicrobial activity of 10N-{[(Aryl)-amino]-methyl}-3-methoxy-10,10 $\alpha$ -dihydro-4 $\alpha$ -H-phenothiazine-9-carboxylic acid // Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry. – 2005. – Vol. 44, № 4. – P. 1112-1114.
  63. Lee H., Palmer B., Boyd M., Baguley B., Denny W. Potential antitumor agents. 64. Synthesis and antitumor evaluation of dibenzo[1,4]dioxin-1-carboxamides: a

- new class of weakly binding DNA-intercalating agents // J. Med. Chem. – 1992. – Vol. 45, № 2. – P. 258-266.
64. Пальчиковская Л. И., Платонов М. О., Алексеева И. В., Швед А. Д. Композитные биорегуляторы на основе производных феназин-1-карбоновой кислоты и триазинов. Синтез и структурные характеристики // Biopolymers and Cell. – 2003. – Vol. 19, № 3. – P. 287-291.
65. Kaoru S., Yuji S. Pyrimido-benzothiazines // Патент US5418231A. – 1995.
66. Denny W., Atwell G., Baguley B. Potential antitumor agents. 38. 3-substituted 5-carboxamido derivatives of amsacrine // J. Med. Chem. – 1983. – Vol. 26, № 11. – P. 1619-1625.
67. Gautam N., Goyal K., Saini O., Kumar A., Gautam D. Synthesis and biological activity of substituted 3-fluoro/3-trifluoromethyl 10H-phenothiazines, its ribofuranosides and sulfones // Journal of Fluorine Chemistry. – 2011. – Vol. 132, № 6. – P. 420-426.
68. Akiyama T., Simeno T., Murakami M., Yoneda F. Flavin-6-carboxylic acids as novel and simple flavoenzyme models. Nonenzymatic stabilization of the flavin semiquinone radical and the 4a-hydroperoxyflavin by intramolecular hydrogen bonding // J. Am. Chem. Soc. – 1992. – Vol. 114, № 17. – P. 6613-6620.
69. Palmer B., Boyd M., Denny W. Aromatic lithiation directed by the carboxylic acid group. Synthesis of 9-substituted dibenzodioxin-1-carboxylic acids and 6-substituted phenoxathiin-4-carboxylic acids // J. Org. Chem. – 1990. – Vol. 55, № 2. – P. 438-441.
70. Sousa R. Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases // Trends. Biochem. Sci. – 1996. – Vol. 21, № 5. – P. 186-190.
71. Steitz T., Smerdon S., Jäger J. Two DNA polymerases: HIV reverse transcriptase and the Klenow fragment of Escherichia coli DNA polymerase // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. – 1993. – Vol. 58. – P. 495-504.
72. Joyce C., Steitz T. Function and structure relationships in DNA polymerases. // Annu. Rev. Biochem. – 1994. – Vol. 63. – P. 777-822.

73. Delarue M., Tordo N., Moras D., Argos P. An attempt to unify the structure of polymerases. // Protein Eng. – 1990. – Vol. 3, № 6. – P. 461-467.
74. Jeruzalmi D., Steitz T. A. Structure of T7 RNA polymerase complexed to the transcriptional inhibitor T7 lysozyme // EMBO J. – 1998. – Vol. 17. – P. 4101-4113.
75. Schenborn E., Mierendorf R. A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. // Nucl. Acids Res. – 1985. – Vol. 13, № 17. – P. 6223-6236.
76. Ikeda R., Richardson C. Enzymatic properties of a proteolytically nicked RNA polymerase of bacteriophage T7. // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262, № 8. – P. 3790-3799.
77. Martin C., Muller D., Coleman J. Processivity in early stages of transcription by T7 RNA polymerase. // Biochemistry. – 1988. – Vol 27, № 11. – P. 3966-3974.
78. Muller D., Martin C., Coleman E. Processivity of proteolytically modified forms of T7 RNA // Biochemistry. – 1988. – Vol. 27, № 15. – P. 5763-5771.
79. Ridpath J., Bolin S., Dubovi E. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes // Virology. – 1994. – Vol. 205, № 1. – P. 66-74.
80. Carman S., Ridpath J., Hazlett M., Alves D., Dubovi E., Tremblay R., Bolin S., Godkin A., Anderson N. Severe Acute Bovine Viral Diarrhea in Ontario. // J. Vet. Diagn. Invest. – 1998. – Vol. 10. – P. 27-35.
81. Ellis J., Cortese V., Myers S., Carman S., Martin K., Haines D. Lesions and Distribution of Viral Antigen Following an Experimental Infection of Young Seronegative Calves with Virulent Bovine Virus Diarrhea Virus-Type II. // Can. J. Vet. Res. – 1998. – Vol. 62. – P. 161-169.
82. Pellerin C., Lecomte J., Tijssen P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus stari associate with severe outbreaks and high mortalities // Virology. – 1994. – Vol. 203, № 4. – P. 260-268.
83. Buckwold V., Donis, R. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents // Antviral Res. 2003. – Vol. 57. – P. 1-15.

84. Baginski S., Seipel M., Sun S., Benetatos C., Chunduru S., Collett M. Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2000. – Vol. 97. – P. 7981-7986.
85. Brooke J., Riley T. Erysipelothrix rhusiopathiae: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen // J. Med. Microbiol. – 1999. – Vol. 48. – P. 789-799.
86. Veraldi V., Girgenti F., Dassoni R. Erysipeloid: a review // Clinical and Experimental Dermatology. – 2009. – Vol. 34, № 8. – P. 859-862.
87. Wanga Q., Changa B, Riley T. Erysipelothrix rhusiopathiae // Veterinary Microbiology. – 2010. – Vol. 140, № 3-4. – P. 405-417.
88. Podschun R., Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors // Clin. Microbiol. Rev. – 1998. – Vol. 11, № 4. – P. 589-603.
89. Riggs P., Chelius M., Iniguez L., Kaeppler S., Triplett E. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria // Australian Journal of Plant Physiology. – 2001. – Vol. 28, № 9. – P. 829-836.
90. Haahtela K., Laakso T., Korhonen T. Associative Nitrogen Fixation by Klebsiella spp.: Adhesion Sites and Inoculation Effects on Grass Roots // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – Vol. 52, № 5. – P. 1074-1079.
91. Orskov I., Orskov F., Jann B., Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of Escherichia coli // Bacteriol. Rev. – 1977. – Vol. 41, №3. – P. 667-710.
92. Nataro J., Kaper J. Diarrheagenic Escherichia coli // Clin. Microbiol. Rev. – 1998. – Vol. 11, № 1. – P. 142-201.
93. Han M., Lee S. The Escherichia coli proteome: past, present, and future prospects Microbiol // Mol. Biol. Rev. – 2006. – Vol. 70, № 2. – P. 362-439.
94. Lee S. High cell-density culture of Escherichia coli // Trends Biotechnol. – 1996. – Vol. 14, № 3. – P. 98-105.

95. Schneewind O., Fowler A., Faull K. Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus* // *Science*. – 1995. – Vol. 268, № 5207. – P. 103-106.
96. Hanselman B., Kruth S., Rousseau J., Weese J. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets // *Can. Vet. J.* – 2009. – Vol. 50, №9. – P. 954-958.
97. Waters A., Contente-Cuomo T., Buchhagen J., Liu C., Watson L., Pearce K., Price L. Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and Poultry // *Clinical Infectious Diseases*. – 2011. – Vol. 52, № 10. – P. 1227-1230.
98. Capparelli R., Parlato M., Borriello G., Salvatore P., Iannelli D. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2007. – Vol. 51, № 8. – P. 2765-2773.
99. Swanson S., Snider C., Braden C., Boxrud D., Wünschmann A., Rudroff J., Lockett J., Smith K. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with pet rodents // *Engl. J. Med.* – 2007. – Vol. 356, № 1. – P. 21-28.
100. Sedwick C. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Slows Down to Dodge Antibiotics // *PLoS Biol.* – 2014. – Vol. 12, № 2. – e1001794.
101. Chiu C., Su L., Chu C. *Salmonella enterica* Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2004. – Vol. 17, № 2. – P. 311-322.
102. Su L., Chiu C., Chu C., Jonathan T. Antimicrobial Resistance in Nontyphoid *Salmonella* Serotypes: A Global Challenge // *Clinical Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 39, № 4. – P. 546-551.
103. Blanchlong J. Persistence of *Pasteurella multocida* in wetlands following avian cholera outbreaks // *Journal of Wildlife diseases*. – 2006. – Vol. 42, № 1. – P. 33-39.
104. Casolari C., Fabio U. Isolation of *Pasteurella multocida* from Human Clinical Specimens: First Report in Italy. // *European Journal of Epidemiology*. – 1988. – Vol. 4, №3. – P. 389-390.

105. Boyce J., Adler B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2) // *Infect Immun.* – 2000. – Vol. 68, № 6. – P. 3463-3468.
106. Hassett D. Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen // *J. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178, № 24. – P. 7322-7325.
107. Mathee K., Narasimhan G., Valdes C., Qiu X., Matewish J., Koehrsen M., Rokas A., Yandava C., Engels R., Zeng E., Olavarietta R., Doud M., Smith R., Montgomery P., White J., Godfrey P., Kodira C., Birren B., Galagan J., Lory S. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105, № 8. – P. 3100-3105.
108. Rahme L., Tan M., Le L., Wong S., Tompkins R., Calderwood S., Ausubel F. Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94, № 24. – P. 13245-13250.
109. Huycke M., Spiegel C., Gilmore M. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1991. – Vol. 35, № 8. – P. 1626-1634.
110. Ike Y., Hashimoto H., Clewell D. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice // *Infect Immun.* – 1984. – Vol. 45, № 2. – P. 528-530.
111. Hirt H., Schlievert P., Dunny G. In vivo induction of virulence and antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* mediated by the sex pheromone-sensing system of pCF10 // *Infect Immun.* – 2002. – Vol. 70, № 2. – P. 716-723.
112. Amyes S. Enterococci and streptococci // *Int. J. Antimicrob Agents.* – 2007. – Vol. 29. – P. 43-52.
113. McMartin C., Bohacek R. QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design // *Comput.-Aided Mol. Des.* – 1997. – Vol. 11, № 4. – P. 333–344.

114. Warren G., Andrews C., Capelli A., Clarke B., LaLonde J, Lambert M. A critical assessment of docking programs and scoring functions. // J. Med. Chem. – 2006. – Vol. 49, № 20. – P. 5912–5931.
115. Temiakov D., Patlan V., Anikin M., Callister W. T., Yokoyama. S., Vassilyev D. G. Structural basis for substrate selection by. T7 RNA polymerase // Cell. –2004. – Vol. 116, № 3. – P. 381-391.
116. Piestrzeniewicz M., Studzian K., Wilmanska D., Plucienniczak G., Gniazdowski M. Effect of DNA-interacting drugs on phage T7 RNA polymerase // Acta Biochim. Pol. – 1998. – Vol. 45, № 1. – P. 127-132.
117. Lubner P., Bartelt E., Genschow E., Wagner J., Hahn H. Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41, № 3. – P. 1062-1068.
118. Jorgensen J., Turnidge J., Washington J. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods // Manual of clinical microbiology / Eds Murray P. et. al., Am. Soc. Microbiol. publ. – 2007. – P. 1152-1172.
119. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically / Third ed. // Approved Standard NCCLS Document M7-A3.1993.–13, № 25, NCCLS, Villanova P., December 1993.
120. Basch H., Gadebusch H. In vitro antimicrobial activity of dimethylsulfoxide // Appl. Microbiol. – 1968. – Vol. 16, № 12. – P. 1953-1954.
121. Алексеева И. В., Пальчиковская Л. И., Усенко Л. С., Костина В. Г. Трициклическая 1,2,4-триазинсодержащая гетеросистема: направленный синтез новых биологически активных соединений // Biopolymers and Cell. – 2008. – Vol. 24, № 5. – P. 406-411.
122. Thomas L., Gupta A., Gupta V. Synthesis of 2-amino-5-chloro-3-(trifluoromethyl)benzenethiol and conversion into 4H-1,4-benzothiazines and their sulfones // J. Fluorine Chem. – 2003. – Vol. 112, № 2. – P. 207-213.

123. Palchykovska L., Alexeeva I., Platonov M., Kostenko O., Usenko L., Negrutska V., Shved A. New 1,2,4-triazine bearing compounds: molecular modeling, synthesis and biotesting // *Biopolym. Cell.* – 2009. – Vol. 25, № 6. – P. 491-499.
124. Palchykovska L., Alexeeva I., Negrutska V., Kostyuk Y., Indychenko T., Kostenko O., Kryvorotenko D., Shved A. Dubey I. Inhibition of in vitro transcription by 2-arylidene derivatives of thiazolo[3,2-a]benzimidazol-3(2H)-one // *Biopolym. Cell* 2010. – Vol. 26, № 6. – P. 508-511.
125. Hansen J., Long A., Schultz S. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus // *Structure.* – 1997. – Vol. 5, № 8. – P. 1109-1122.
126. Rao Y., Sureshkumar G. Oxidative-stress-induced production of pyocyanin by *Xanthomonas campestris* and its effect on the indicator target organism, *Escherichia coli* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2000, Vol. 25, № 5. – P. 266-272.
127. Price-Whelan A., Dietrich L., Newman D. Rethinking «secondary» metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics // *Nat. Chem. Biol.* – 2006. – Vol. 2, № 2. –P. 71-78.
128. Hollstein U., Van Gemert R. Interaction of phenazines with polydeoxyribonucleotides // *Biochemistry.* – 1971. – Vol. 10, №3. – P. 497-504.
129. Kerr J. Phenazine pigments: antibiotics and virulence factors // *Infect. Dis. Rev.* – 2000. – Vol. 29. P. 184-194.
130. Turner J., Messenger A. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production // *Adv. Microb. Physiol.* – 1986. – Vol. 27. P. 211-275.
131. Hollstein U., Butler P. Inhibition of ribonucleic acid synthesis by myxin // *Biochemistry.* – 1972. – Vol. 11, № 8. – P. 1345-1350.
132. Paeshuyse J., Leyssen P., Mabery E., Boddeker N., Vrancken R., Froeyen M., Ansari I., Dutartre H., Rozenski J., Gil L., Letellier C., Lanford R., Canard B., Koenen F., Kerkhofs P., Donis R., Herdewijn P., Watson J., De Clercq E., Puerstinger G., Neyts J. A novel, highly selective inhibitor of pestivirus



- replication that targets the viral RNA-dependent RNA Polymerase // *J. Virol.* – 2006. – Vol. 80, № 1. – P. 149-160.
133. Vrancken R., Paeshuyse J., Haegemana A., Puerstinger G., Froeyen M., Herdewijn P., Kerkhofs P., Neyts J., Koenen F. Imidazo[4,5\_c]pyridines inhibit the in vitro replication of the classical swine fever virus and target the viral polymerase // *Antiviral Res.* – 2008. – Vol. 77, № 2. – P. 114-119.
  134. King R., Scarnati H., Priestley E., De Lucca I., Bansal A., Williams J. Selection of a thiazole urea-resistant variant of bovine viral diarrhoea virus that maps to the RNA-dependent RNA polymerase // *Antiviral Chem. Chemother.* – 2002. – Vol. 13, № 5. – P. 315-323.
  135. Sun J., Lemm J., O'Boyle R., Racela J., Colonno R., Gao M. Specific inhibition of bovine viral diarrhea virus replicase // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77, № 12. – P. 6753-6760.
  136. Paeshuyse, J., Mabery E., Boddeker N., Vrancken R., Froeyen M., Ansari I., Dutartre, H., Rozenski, J., De Clercq E., Puerstinger, G., Neyts, J. A novel, highly selective inhibitor of pestivirus replication that targets the viral RNA-dependent RNA Polymerase // *J. Virol.* – 2006. – Vol. 80, № 2. – P. 149-160.
  137. Bartenschlager R. Innovation: Hepatitis C virus Replicons: Potential role for drug Development // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2002. – Vol. 1. – P. 911-916.
  138. Bartenschlager, R. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus // *Antiviral Res.* – 2001. – Vol. 52, № 1. – P. 1-17.
  139. Tan S., Shi Y., Sonenberg N. Hepatitis C Therapeutics: Current Status and Emerging Strategies. // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2002. – Vol. 1. – P. 867-881.
  140. Blight K., Hanson H, Rice C. The molecular biology of hepatitis C virus. In *Hepatitis Viruses* / Ou J. H. J., Ed. // Kluwer Academic Publishers: Boston. – 2002. – P. 81-108
  141. Shimizu Y., Yoshikura H. Cell culture systems for the detection of HCV infection // *Methods Mol. Med.* – 1999. – Vol. 19. – P. 483-488.

142. Manfroni G., Paeshuyse J., Massari S., Zanoli S., Gatto B., Maga G., Tabarrini O., Cecchetti V., Fravolini A., Neyts J. Inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA replication by acridone derivatives: identification of an NS3 helicase inhibitor // *J. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 52, № 10. – P. 3354-3365.
143. Tabarrini O., Manfroni G., Fravolini A., Cecchetti V., Sabatini S., De Clercq E., Rozenski J., Canard B., Dutartre H., Paeshuyse J., Neyts J. Synthesis and anti-BVDV activity of acridones as new potential antiviral agents // *J. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 49, № 8. – P. 2621-2627.
144. Dennehy J. Bacteriophages as model organisms for virus emergence research // *Trends Microbiol.* – 2009. – Vol. 17, № 10. – P. 450-457.
145. Egyeki M., Turoczy G., Majer Z., Toth K., Fekete A., Maillard P., Csik G. Photosensitised inactivation of T7 Phage as surrogate of non-enveloped DNA viruses: efficiency and mechanism of action // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – Vol. 1624, № 1-3. – P. 115-124.
146. Osumi-Davis P., de Aguilera M., Woody R., Woody A. Asp537, Asp812 are essential and Lys631, His811 are catalytically significant in bacteriophage T7 RNA polymerase activity // *J. Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 226, № 1. – P. 37-45.
147. Hutchins R., Crenshaw J., Graves D., Denny W. Influence of substituent modifications on DNA binding energetics of acridine-based anticancer agents // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42, № 46. – P. 13754-13761.
148. Crenshaw J., Graves D., Denny W. Interactions of acridine antitumor agents with DNA: binding energies and groove preferences // *Biochemistry.* – 1995. – Vol. 34, № 41. – P. 13682-13687.
149. Wakelin L., Chetcuti P., Denny W. Kinetic and equilibrium binding studies of amsacrine-4-carboxamides: a class of asymmetrical DNA-intercalating agents which bind by threading through the DNA helix // *J. Med. Chem.* – 1990. – Vol. 33, № 7. – P. 2039-2044.
150. Lipinski C., Lombardo F., Dominy B., Feeney P. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug

discovery and development settings // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2001. – Vol. 46, № 1-3. – P. 3-26.

151. Rope M., Isensee R., Joseph L. The Reaction of Acrylonitrile with Alkyl Lactates // *J. Am. Chem. Soc.* – 1952. – Vol. 74, № 4, – P. 1095-1096.
152. Hein D., Alheim R., Leavitt J. The Use of Polyphosphoric Acid in the Synthesis of 2-Aryl- and 2-Alkyl-substituted Benzimidazoles, Benzoxazoles and Benzothiazoles // *J. Am. Chem. Soc.* – 1957. – Vol. 79, № 2. – P. 427-429.
153. Demeunynck M., Charmantray F., Martelli A. Interest of acridine derivaties in the anti-cancer chemoteraty// *Current Pharmaceutical Design.* – 2001. – Vol. 7, № 17. – P. 1703-1724.
154. Goodell J., Madhok A., Hiasa H. Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity // *Bioorg. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 14, № 16. – P. 5467-5480.
155. Bretner M., Baier A., Kopanska K. Synthesis and biological activity of 1H-benzotriazole and 1H-benzimidazole analogues – inhibitors of the NTPase/helicase of HCV and of some related Flaviviridae // *Antivir. Chem. Chemother.* – 2005. – Vol. 16, № 5. – P. 315-326.
156. Cholody W., Hernandez L., Hassner L. Bisimidazoacridones and Related Compounds: New Antineoplastic Agents with High Selectivity against Colon Tumors // *J. Med. Chem.* – 1995. – Vol. 16, № 16. – P. 3043-3052.