

**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

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата хімічних наук

**Київ – 2015**

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі молекулярної та квантової біофізики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
**Говорун Дмитро Миколайович**,  
заступник директора інституту з наукової роботи,  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН  
України

**Офіційні опоненти:** доктор хімічних наук, професор  
**Броварець Володимир Сергійович**,  
заступник директора інституту з наукової роботи,  
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН  
України

кандидат хімічних наук  
**Григоренко Олександр Олегович**,  
доцент кафедри органічної хімії хімічного  
факультету,  
Київський національний університет  
імені Тараса Шевченка

Захист відбудеться «18» грудня 2015 року о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.220.01 Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України за адресою: 02660, м. Київ, вул. Мурманська, 1.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (02660, м. Київ, вул. Мурманська, 1).

Автореферат розіслано «\_\_\_» листопада 2015 року.

Вчений секретар спеціалізованої  
вченої ради Д 26.220.0  
кандидат хімічних наук

В.О. Євдокименко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**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 аміди 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, триазинобензотіазинкарбонових 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 T7 (РНКП T7);
- 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 T7.

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 T7. 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 “блудінг-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 ариламід 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: ІХ всеукраїнська конференція студентів та аспірантів “Сучасні проблеми хімії”, 14-16 травня 2008 р., м. Київ; ІІІ Міжнародна конференція молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери”, 18-21 листопада 2008 р., м. Харків; ІІ Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 3-6 квітня 2012 р., м. Львів; ІХ міжнародная 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.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми дослідження, показано зв'язок роботи з науковими темами, визначено об'єкт, предмет, мету та завдання дослідження, розкрито наукову новизну і практичне значення роботи, особистий внесок автора, наведено апробацію результатів дослідження.

У **першому розділі** на основі ретельного, критичного аналізу літературних джерел систематизовано та проаналізовано дані щодо методів синтезу та біологічної

активності ТГКК та їхніх амідів. Для деяких зазначених класів сполук виявлено залежність “структура-біологічна активність”. Наведено основні шляхи синтезу ТГКК.

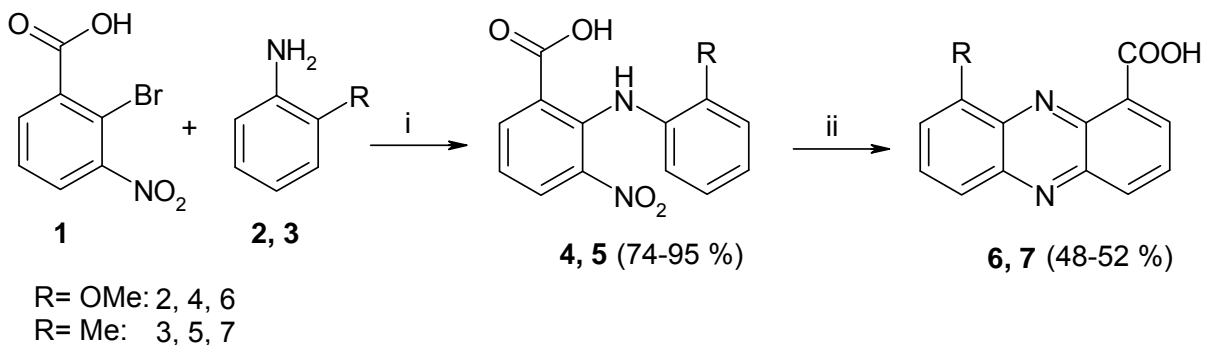
У **матеріалах і методах** наведено методи та обладнання, що використовували у дослідженні та обробці результатів експериментів, методики синтезу сполук, а також підтвердження їхньої будови за допомогою спектральних методів досліджень.

**Результати роботи** викладено в трьох розділах, в яких наведено методи синтезу сполук, результати їхнього біологічного тестування і комп’ютерне моделювання їхньої взаємодії з активним сайтом РНКП Т7. Найважливіші результати роботи наведено в розділі **аналіз та узагальнення результатів роботи**.

## Результати досліджень та їхнє обговорення

### 1. Синтез нових ТГКК та їхніх ариламідів

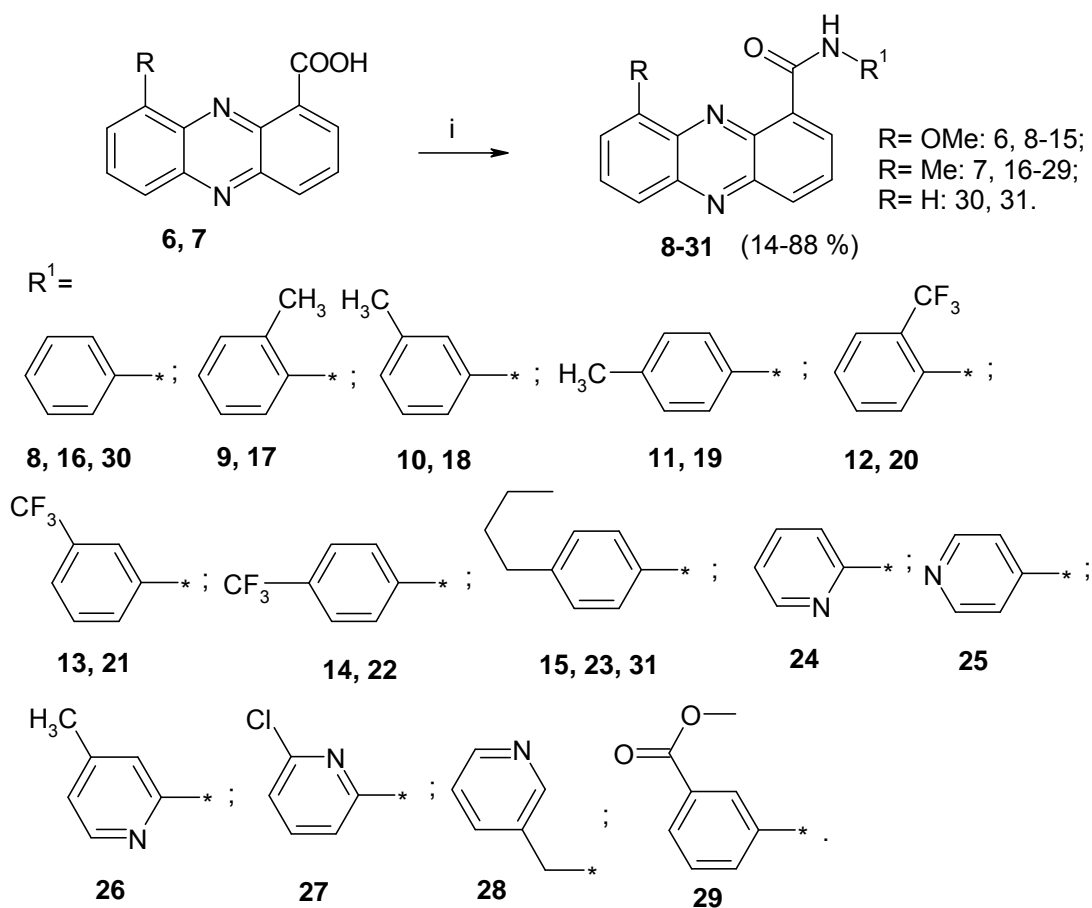
Для синтезу 9-заміщених ФКК-1 обрано класичний двохстадійний підхід (Схема 1). На першій стадії, в умовах реакції Жордана-Ульмана, при арилюванні *орто*-заміщених анілінів (**2, 3**) за допомогою 2-бром-3-нітробензойної кислоти (**1**) отримано N-(2-метилфеніл)- та N-(2-метоксифеніл)-3-нітроантранілові кислоти (**4, 5**) з виходами 95 та 74 %, відповідно. На наступному етапі проводили внутрішньомолекулярну конденсацію арилпохідних нітроантранілових кислот (**4, 5**) у розчині етилового спирту за присутності етилату натрію та  $\text{NaBH}_4$  – вихід цільової 9-метокси-ФКК-1 становив 52 % і був дещо вищим, ніж такий у разі 9-метил-ФКК-1 (45 %). Вихідну 2-бром-3-нітробензойну кислоту (**1**) синтезовано у три стадії (утворення солі гідраргіриму, декарбоксілювання, бромовання), виходячи з 3-нітрофталевої кислоти з виходом 60 %.



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

Схема 1. Синтез 9-заміщених ФКК-1.

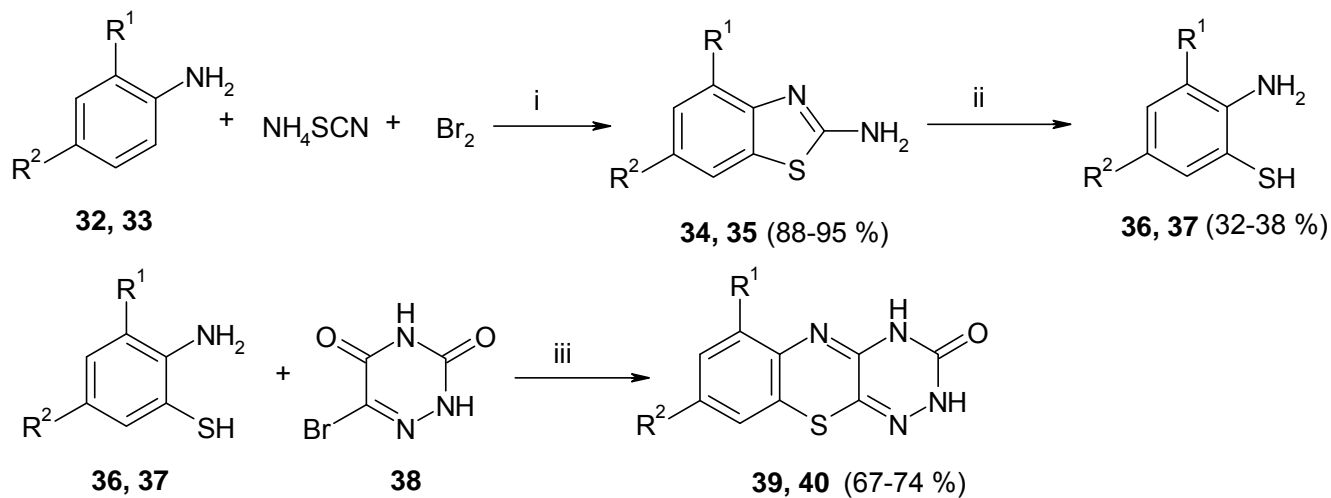
Для синтезу ариламідів застосовували метод, що включає попередній синтез хлорангідридів із подальшою їхньою конденсацією з невеликим надлишком відповідних ариламінів (Схема 2). Одержані ариламіді ФКК-1 – дрібнокристалічні, забарвлені сполуки з високими температурами плавлення, обмежено розчинні у воді та етиловому спирті, добре розчинні у диметилсульфоксиді (ДМСО) та диметилформаміді (ДМФА). Виходи арилкарбоксамідів суттєво залежать від будови вихідних ариламінів.



i) 1) PhCH<sub>3</sub>, SOCl<sub>2</sub>, Py, 40°C, 1 год; 2) R<sup>1</sup>NH<sub>2</sub>, 60°C, 3 год.

Схема 2. Синтез ариламідів 9-заміщених ФКК-1.

Синтез ТБТКК (**39**, **40**) здійснювали у три стадії (Схема 3). На першій стадії амінобензойні кислоти **32** та **33** перетворювали з високими виходами у 2-амінобензотіазолкарбонові кислоти **34** та **35**. Останні під час тривалого гідролізу у концентрованому розчині гідроксиду калію і подальшому підкисленні льодяною оцтовою кислотою перетворюються у *o*-амінотіофенолкарбонові кислоти **36** та **37**.



R<sup>1</sup> = COOH, R<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>: 32, 34, 36, 39;

R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = COOH: 33, 35, 37, 40.

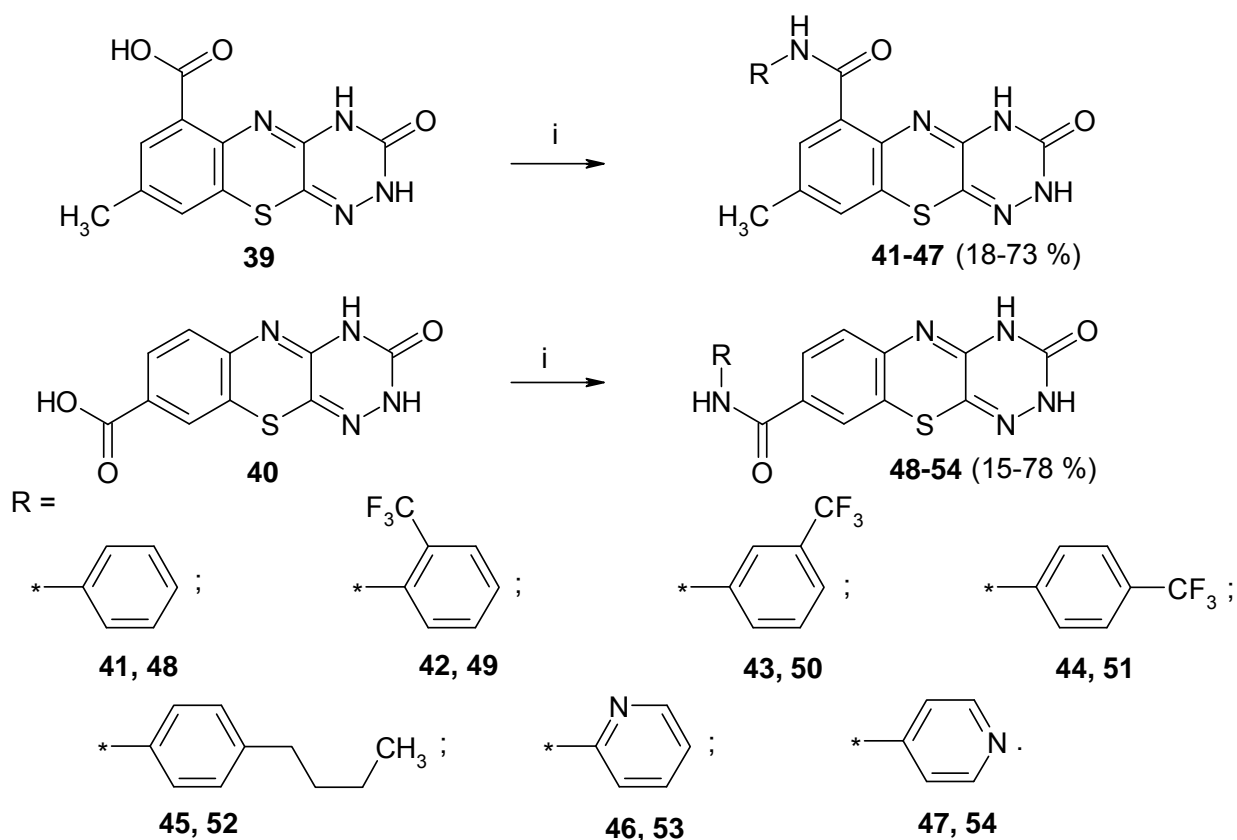
i) АсОН, 5-10°C 2 год; ii) 1) КОН кип. 30 год; 2) АсОН; iii) ДМФА 120°C, 1 год.

Схема 3. Синтез *o*-амінотіофенолкарбонових кислот та ТБТКК.

Повільний гідроліз вихідних сполук **34** і **35** та окислення продуктів **36** і **37** перешкоджає кількісному отриманню бажаних продуктів. Проведення гідролізу в інертній атмосфері дозволило збільшити виходи цільових сполук **36** та **37** удвічі – до 32 % та 38 % відповідно.

На третій стадії *o*-амінотіофенолкарбонові кислоти циклізували з 5-бром-6-азаурацилом (**38**) при нагріванні у розчині ДМФА за температури 120 °С. Продукти реакції погано розчинні у ДМФА і викристалізуються чистими при охолодженні реакційної суміші. ТБТКК – дрібнокристалічні, забарвлені в яскраво жовтий колір сполуки з високими температурами плавлення, нерозчинні у воді, етиловому спирті та ДМФА і слабо розчинні у ДМСО.

N-Ариламід триазинобензотіазинкарбонових кислот (**41-54**) синтезували конденсацією хлорангідридів, отриманих *in situ*, з невеликим надлишком відповідних амінів (Схема 4). Одержані сполуки – дрібнокристалічні, забарвлені речовини з високими температурами плавлення, обмежено розчинні у воді та етиловому спирті, добре розчинні у ДМСО та ДМФА.



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 4. Синтез арилкарбоксамідів 8-метил-ТБТ-6 та ТБТ-8-карбонових кислот.

Загалом синтезовано 40 представників ТГКК та їхніх ариламідів – 24 похідних ФКК-1 та 16 похідних ТБТ.

## 2. Дослідження біологічної активності ТГКК та їхніх ариламідів

### 2.1. Визначення впливу синтезованих сполук на синтез РНК *in vitro*.

Дослідження впливу отриманих сполук на синтез РНК проводили у системі транскрипції на основі ДНК-залежної РНК-полімерази фагу Т7 за початкової



концентрації 25 мкг/мл (~ 80 мкМ). Для виявлених активних сполук встановлювали значення  $IC_{50}$  методом двохкратних розведень. За контроль приймали реакцію транскрипції за присутності ДМСО і відсутності тест-агенту; як агент порівняння використовували Актиноміцин D ( $IC_{50} = 0,85$  мкМ). На рис. 1 наведено типові електрофореграми результатів реакції транскрипції.

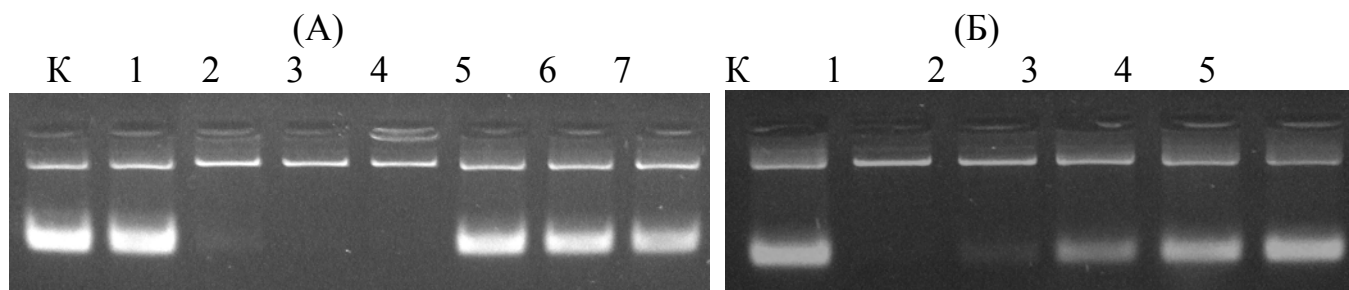


Рис. 1. Фотографії гель-електрофорезів результатів реакції транскрипції *in vitro*. Верхня смужка – ДНК-матриця, нижня – РНК-продукт. К – позитивний контроль за присутності ДМСО і відсутності тест-агенту. Відсутність РНК- продукту свідчить про інгібування реакції транскрипції.

(А) Доріжки 1-7 – результати реакції транскрипції за присутності сполук **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11** і **12** з концентрацією 25 мкг/мл кожна.

(Б) Доріжки 1-5 – результати реакції транскрипції за присутності різних концентрацій сполуки **51**: 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 і 0,78 мкг/мл, відповідно.

За результатами скринінгу 15 із 24 синтезованих похідних ФКК-1 інгібують синтез РНК у межах значень  $IC_{50} = 38,3-0,48$  мкМ (табл. 1). Найефективнішим є *n*-н-бутилфеніламід 9-метил-ФКК-1 (**23**) зі значенням  $IC_{50} = 0,48$  мкМ. Високу активність демонструють також піридил-4-амід (**25**) ( $IC_{50} = 9,6$  мкМ) та *m*-карбометоксифеніламід (**29**) ( $IC_{50} = 16,2$  мкМ) 9-метилзаміщеної ФКК-1.

Таблиця 1.

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

№	$IC_{50}$ РНКП Т7	№	$IC_{50}$ РНКП Т7	№	$IC_{50}$ РНКП Т7	№	$IC_{50}$ РНКП Т7
<b>6</b>	–*	<b>16</b>	38,3	<b>26</b>	~ 61	<b>46</b>	–
<b>7</b>	37,8	<b>17</b>	32,1	<b>27</b>	~ 57	<b>47</b>	~ 71
<b>8</b>	30,4	<b>18</b>	26,0	<b>28</b>	–	<b>40</b>	–
<b>9</b>	30,4	<b>19</b>	–	<b>29</b>	16,2	<b>48</b>	~ 74
<b>10</b>	–	<b>20</b>	36,7	<b>39</b>	–	<b>49</b>	~ 65
<b>11</b>	–	<b>21</b>	28,9	<b>41</b>	–	<b>50</b>	9,9
<b>12</b>	~ 63	<b>22</b>	32,8	<b>42</b>	~ 60	<b>51</b>	4,9
<b>13</b>	25,2	<b>23</b>	0,48	<b>43</b>	8,4	<b>52</b>	15,3
<b>14</b>	–	<b>24</b>	28,7	<b>44</b>	6,0	<b>53</b>	~ 74
<b>15</b>	31,2	<b>25</b>	9,6	<b>45</b>	~ 61	<b>54</b>	15,9

\* – сполука не активна за початкової концентрації

Тестування 8-метил-ТБТ-6- і ТБТ-8-карбонових кислот та їхніх ариламідів показало, що шість сполук: **43**, **44**, **50**, **51**, **52** та **54** ефективно пригнічують синтез РНК у межах значень  $IC_{50} = 15,9-4,9$  мкМ (табл. 1). Найефективнішим є *n*-CF<sub>3</sub>-феніламід-ТБТ-8-КК (**51**) зі значенням  $IC_{50} = 4,9$  мкМ. Присутність трифлуорометильних замісників у мета- і пара-положеннях ариламідного фрагменту відповідних похідних обох серій ТБТКК (сполуки **43**, **44**, **50** та **51**) підвищує ефективність пригнічення синтезу РНК у порівнянні з іншими замісниками. Серед піридиламідів тільки сполука **54** (N4-піридиламід-ТБТ-8-КК) демонструє високу інгібувальну активність ( $IC_{50} = 15,9$  мкМ). Загалом ариламідні ТБТ-8-КК є активнішими інгібіторами процесу транскрипції, аніж їхні 8-метил-ТБТ-6 аналоги.

Із 40 синтезованих та досліджених сполук виявлено 21 ефективний інгібітор синтезу РНК зі значенням  $IC_{50} < 40$  мкМ. Для 6 сполук: **23**, **25**, **43**, **44**, **50** та **51** значення  $IC_{50} < 10$  мкМ.

## 2.2. Дослідження антибактерійної активності ТГКК та їхніх ариламідів.

Первинний скринінг антибактерійної активності синтезованих речовин проводили за концентрації 100 мкМ. Для виявлених активних сполук встановлювали значення мінімальної інгібувальної концентрації (МІК) методом послідовних розведень. В якості агента порівняння використовували флуорохінолоновий антибіотик офлоксацин.

Скринінг антибактерійної активності похідних ФКК-1 проводили на культурах клітин грампозитивної бактерії *Erysipelothrix rhusiopathiae* VR-2 var. IVM (викликає бешиху свиней) та грамнегативних умовно-патогенних бактерій *Klebsiella Spp* та *E.coli ATCC25922*. У табл. 2 представлено МІК сполук та значення  $IC_{50}$  у системі транскрипції РНКП T7.

Вісім сполук демонструють значну активність щодо грампозитивної бактерії *Erysipelothrix rhusiopathiae* у межах значень МІК = 3,1-0,3 мкМ. Найвищу активність проявляють 9-метокси-ФКК-1 (**6**) та її *орто*-толіламід (**9**), за концентрації 0,39 та 0,30 мкМ, відповідно, спостерігається практично повне гальмування ними росту мікроорганізму. Ріст грамнегативної бактерії *Klebsiella* ефективно пригнічують сім сполук **7**, **9**, **11**, **13**, **16**, **17** та **27** у межах значень МІК = 4,2-2,5 мкМ. Дві сполуки **12** та **26** ефективно інгібують ріст *Escherichia coli ATCC25922* із значеннями МІК 0,25 та 0,3 мкМ, відповідно. Чотири сполуки **7**, **9**, **12**, та **17** ефективно гальмують ріст як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій (МІК < 10 мкМ). Загалом похідні 9-метокси-ФКК-1 проявили вищу антибактерійну активність у порівнянні з 9-метил аналогами.

Антибактерійний скринінг похідних ТБТ проводили на більшій кількості бактерійних штамів. Крім трьох ліній, що використовувалися для похідних ФКК-1, до скринінгу було включено патогенну грампозитивну бактерію *Staphylococcus aureus* (збудник різноманітних інфекцій, що є четвертою за частотою причиною внутрішньо-клінічних захворювань) і грамнегативні бактерії *Salmonella holerasuis* (збудник черевного тифу, а також ентеритів людей і тварин) та *Pasteurella multocida* (викликає різноманітні хвороби як у домашніх, так і диких тварин у тому числі пташину холеру).

Найчутливішою до похідних ТБТ є грампозитивна бактерія *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Вісім досліджуваних тест-агентів: **39, 40, 41, 43, 4,13 48, 50** та **52** повністю пригнічують її ріст у межах МІК = 9,7-1,0 мкМ. Натомість *Staphylococcus aureus* чутлива лише до *n*-*n*-бутилфеніламіду-ТБТ-8-КК (**52**), для якого МІК = 1,0 мкМ, МІК офлоксацину складає 0,40 мкМ.

Таблиця 2.

Значення IC<sub>50</sub> (мкМ) та МІК (мкМ) 9-заміщених ФКК-1 та їхніх ариламідів як інгібіторів синтезу РНК та росту бактерій

№ Сполуки	МІК <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> <i>VR2 var. IVM</i>	МІК <i>Klebsiella</i> <i>spp.</i>	МІК <i>E.coli</i> <i>ATCC25922</i>	IC <sub>50</sub> РНКП Т7
<b>6</b>	0,39	–*	–	–
<b>7</b>	4,2	4,2	–	37,8
<b>8</b>	3,0	30,0	30,0	30,4
<b>9</b>	0,30	3,0	30,0	30,4
<b>11</b>	3,0	3,0	–	–
<b>12</b>	2,5	–	0,25	~ 63
<b>13</b>	–	2,5	–	25,2
<b>15</b>	–	26,0	26,0	31,2
<b>16</b>	–	3,2	–	38,3
<b>17</b>	3,1	3,1	–	32,1
<b>18</b>	3,1	–	–	26,0
<b>26</b>	–	30,0	3,0	~ 61
<b>27</b>	–	3,0	30,0	~ 57
<b>Офлоксацин</b>	–	0,80	0,10	–

\* – сполука не активна за початкової концентрації

Щодо грамнегативних бактерій, то досліджувані сполуки демонструють вибіркочувальну активність. Три сполуки **39, 47** та **51** повністю блокують ріст бактерії *E.coli* у межах МІК = 14,8-10 мкМ, а сполуки **39, 40, 41** та **44** інгібують ріст бактерії *Klebsiella spp* зі значенням МІК в межах 15,6-1,2 мкМ.

Три сполуки **39, 48** та **50** ефективно інгібують ріст *Pasteurella multocida* зі значенням МІК близько 1,0 мкМ, МІК офлоксацину складає 0,1 мкМ. *Salmonella cholerasuis* чутлива лише до ТБТ-6-КК (МІК = 14,8 мкМ), МІК офлоксацину складає 0,40 мкМ.

Слід зазначити, що 8-метил-ТБТ-6-КК (**39**) проявляє множинну антибактерійну дію, ефективно пригнічує усі чотири грамнегативні бактерії – *Escherichia coli*, *Salmonella cholerasuis* і *Klebsiella* за МІК = 14,8 мкМ та *Pasteurella multocida* і грампозитивну бактерію *Erysipelothrix rhusiopathiae* за МІК = 1,5 мкМ.

Загалом із 40 досліджених сполук виявлено 18 речовин з високою антибактерійною дією з МІК = 4-0,25 мкМ, 10 з яких є інгібіторами синтезу РНК у системі транскрипції РНКП Т7.

### 2.3. Дослідження антивірусної активності ариламідів ТГКК.

Вірус бичачої вірусної діареї (ВБВД) є однією з провідних ветеринарних інфекцій, яка спричиняє серйозні проблеми зі здоров'ям у тварин і приводить до значних економічних втрат. Це РНК-вірус, що належить до пестивірусів родини *Flaviviridae* і його клітинну модель, зокрема застосовують як сурогатну модель для селекції сполук, що пригнічують репродукцію вірусу гепатиту С. Нині не існує офіційних препаратів для лікування ВБВД, хоча в усьому світі інтенсивно розробляють інгібітори цього вірусу. Відомо, що похідні трициклічних гетероароматичних систем проявляють високу інгібувальну активність щодо реплікації ВБВД та ВГС.

Дослідження антивірусної активності проводили за базової концентрації 100 мкМ, для активних сполук визначали значення  $EC_{50}$  методом послідовних розведень. Паралельно визначали цитотоксичність речовин на перещеплюваній культурі клітин нирки теляти (ПККНТ) та встановлювали показник  $CC_{50}$ .

Для оцінки антивірусних властивостей та з'ясування взаємозв'язку між активністю і структурою ариламідів ФКК-1 до тестування залучено три *n*-н-бутилфеніламіди – сполуки **15**, **23** та **31**.

З'ясовано, що природа 9-замісника в ариламідах ФКК-1 значно впливає як на цитотоксичність, так і на антивірусні властивості сполук. Так, *n*-н-бутилфеніламід ФКК-1 (**31**) демонструє високу активність зі значенням  $EC_{50} = 0,88$  мкМ. Введення у положення 9 феназинового гетероциклу гідрофобної метильної групи приводить до підвищення активності –  $EC_{50}$  *n*-н-бутилфеніламіду **23** дорівнює 0,42 мкМ. Натомість, заміна метильної групи на метоксигрупу приводить до повної втрати антивірусних властивостей *n*-н-бутилфеніламіду **15**. Незаміщений *n*-н-бутилфеніламід **31** демонструє високу цитотоксичну дію зі значенням  $CC_{50} = 8,8$  мкМ, тоді як 9-заміщені аміди проявляють значно нижчу цитотоксичну дію –  $CC_{50} \sim 65$  мкМ.

Для оцінки терапевтичної доцільності сполук використовують поняття хімотерапевтичного індексу або індексу селективності ( $XTI = SI$ ), який розраховується як відношення  $CC_{50}$  до  $EC_{50}$ . Сполуки із  $XTI \geq 4$  вважають перспективними. Таким чином амід **23**,  $XTI$  якого становить 160, видається вельми перспективним інгібітором реплікації ВБВД.

Сполука **23** проявляє ефективну інгібувальну дію, як щодо синтезу РНК у модельній системі транскрипції РНКП Т7, так і репродукції ВБВД. Більше того, значення  $EC_{50}$  та  $IC_{50}$  для неї 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 ариламідів ТБТКК до тестування залучено *o*-,*m*-,*n*-CF<sub>3</sub>-феніламіди та *n*-н-бутилфеніламіди обох кислот (табл. 3).

Зіставлення результатів впливу вибраних *N*-аріламідів ТБТКК на синтез РНК у модельній системі транскрипції РНКП Т7 ( $IC_{50}$ ) та антивірусної активності ( $EC_{50}$ ) демонструє істотну кореляцію між цими даними. Обидва *o*-CF<sub>3</sub>-феніламіди **42** та **49** мають слабку здатність інгібувати синтез РНК і не впливають на репродукцію ВБВД, вірогідно, через просторові ускладнення, які створює *орто*-

трифлуорометильна група. Пара-н-бутилфеніламід ТБТ-6-КК (**45**) не впливає ні на синтез РНК, ні на репродукцію ВБВД, а його ТБТ-8 аналог **52** та інші досліджені сполуки, ефективно інгібують як синтез РНК *in vitro*, так і репродукцію ВБВД. Слід зазначити, що ТБТ-8-карбоксаміди є активнішими інгібіторами реплікації ВБВД, аніж їхні ТБТ-6 аналоги. З 11 досліджених сполук виявлено 7 речовин, що пригнічують реплікацію вірусу бичачої вірусної діареї із значенням  $EC_{50} < 30$  мкМ. Усі сполуки, що блокують репродукцію вірусу, є інгібіторами синтезу РНК.

Таблиця 3.

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

№ сполуки	$IC_{50}$ РНКП Т7	$CC_{50}$ ПККНТ	$EC_{50}$ ВБВД	ХТІ
<b>42</b>	~ 60	> 119	н/а*	–**
<b>43</b>	8,4	> 119	29,8	> 4
<b>44</b>	6,0	> 119	29,8	> 4
<b>45</b>	~ 61	12,3	н/а	–
<b>49</b>	~ 65	> 123,5	н/а	–
<b>50</b>	9,9	123,5	12,3	10
<b>51</b>	4,9	> 123,5	1,5	> 80
<b>52</b>	15,3	> 127	12,7	> 10

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

Висока кореляція здатності карбоксариламідів ТБТ інгібувати синтез РНК та реплікацію вірусу бичачої вірусної діареї дозволяє прогнозувати ймовірний механізм дії цих сполук – пригнічення РНК-синтезувального комплексу ВБВД.

#### 2.4. Моделювання взаємодії синтезованих сполук з транскрипційним комплексом 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 впізнання вхідного нуклеотиду у послідовних актах синтезу РНК (PDB code: 1SOV).

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 полімераза – А, В, С, розташованих у субдоменах «долоня» та «пальці». 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 у багатьох ДНК-залежних РНК полімеразах. Його функція полягає у стабілізації РНК–ДНК гібриду на ранніх стадіях ініціації транскрипції. Таким чином, взаємодія ліганду з амінокислотними залишками перелічених консервативних мотивів може суттєво впливати на функціонування ензиму та визначати рівень інгібіторних

властивостей ліганду.

Ефективність зв'язування лігандів з рецептором визначали за допомогою скорінг функцій: вільної енергії зв'язування (FreE), енергії водневих зв'язків (Hbnd) та енергії гідрофобних взаємодій (Cntc). Також розраховували зворотній логарифм константи інгібування ( $-\log K_i$ ).

При аналізі результатів докінгу ариламідів ТБТКК було виявлено ряд цікавих особливостей. Для порівняння вибрано дані докінгу *n*-трифлуорометилфеніламідів **44** та **51** і *n*-н-бутилфеніламідів **45** та **52** (рис. 2 та 3).

Як видно з рис. 2, сполуки **44** і **51** розміщені у ензиматичній кишені практично однаково та стабілізуються за допомогою чотирьох Н-зв'язків, а також утримуються за рахунок  $\pi$ -стекинг взаємодії бензольного фрагменту ТБТ з каталітичним іоном  $Mg^{2+}$ . Для сполуки **51** – *n*-трифлуорометилфеніламіду ТБТ-8-КК – характерним є утворення Н-зв'язків між N2H групою триазинового циклу та гідроксигрупою Tyr-427, між карбонільною групою триазинову та NH гуанідинової групи Arg-423. Натомість, для сполуки **44** – *n*-трифлуорометилфеніламіду ТБТ-6-КК – реалізуються Н-зв'язки між атомом нітрогену N1 триазинову та NH His-784, між N2H групою 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. Однак орієнтація корових гетероциклів сполук **44** і **51** відносно амінокислотного оточення активного сайту відрізняється на 180°.

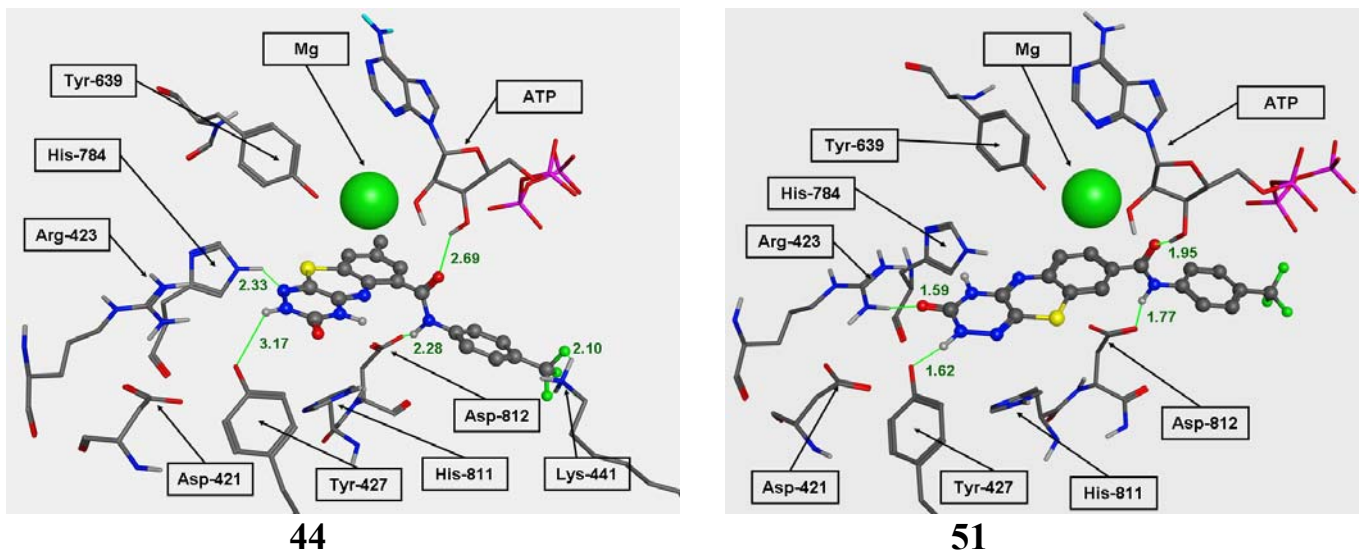


Рис. 2. Моделі зв'язування 8-метил-ТБТ-6-*n*-трифлуорометилфенілкарбоксаміду (**44**) та ТБТ-8-*n*-трифлуорометилфенілкарбоксаміду (**51**) з каталітичним сайтом транскрипційного комплексу РНКП Т7.

Така відмінність у зв'язуванні сполук з активним сайтом може, вірогідно, пояснювати вищу активність ТБТ-8-*n*-CF<sub>3</sub>-фенілкарбоксаміду щодо інгібування синтезу РНК в системі транскрипції РНКП Т7 та реплікації ВБВД у порівнянні з ТБТ-6 аналогом.

Доволі цікавими виявилися результати докінгу *n*-н-бутилфеніламідів **45** та **52** (рис. 3). Так, *n*-н-бутилфеніламід ТБТ-8-КК (**52**) розташовується та утримується у

ензиматичній кишені ідентично сполукам **44** і **51**, тоді як розміщення *n*-бутилфеніламідів 8-метил-ТБТ-6-КК (**45**) в активному сайті є дзеркальним відображенням вищезгаданих сполук – **44**, **45** і **51**. Така топологія розташування амідів **45** яку, напевно, провокує подовжений бутильний «хвіст», приводить до утворення лише одного Н-зв'язку між амідним NH і карбоксильною групою Asp-812, а ТБТ гетероцикл утримується за рахунок  $\pi$ -стекингу взаємодії з каталітичним іоном  $Mg^{2+}$  не бензольним кільцем, як у випадку сполук **44**, **51** і **52**, а триазиним фрагментом ТБТ. Таке розташування не дозволяє амідів **45** міцно зв'язуватися з каталітичною кишенею.

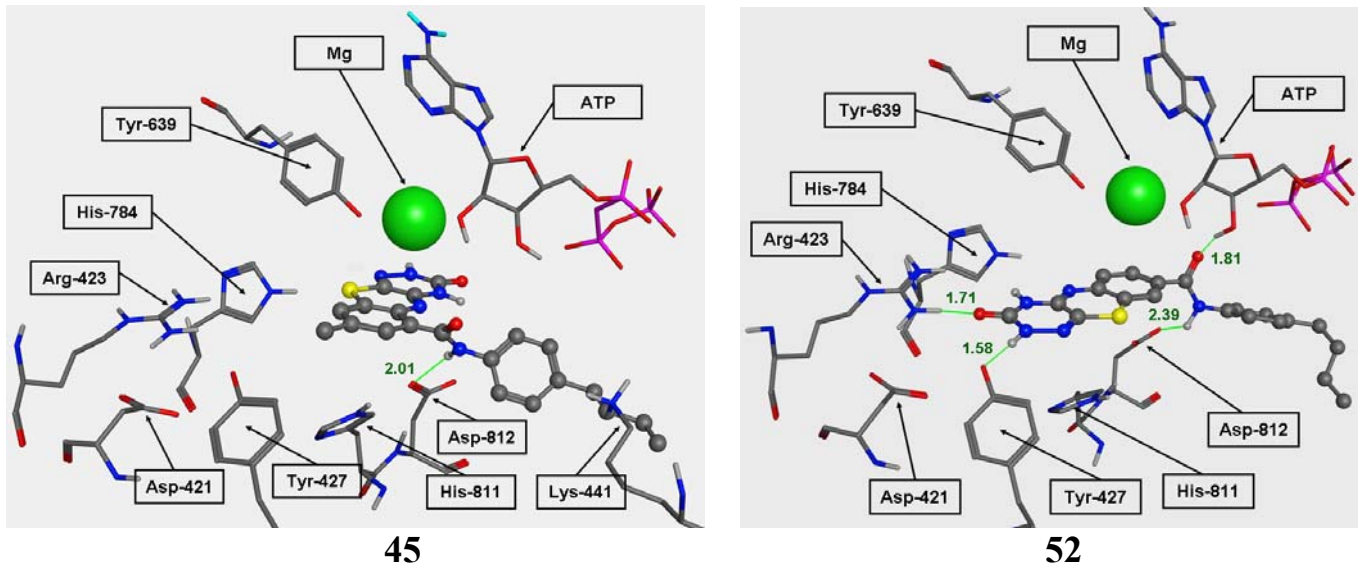


Рис. 3. Моделі зв'язування 8-метил-ТБТ-6-*n*-бутилфенілкарбоксаміду (**45**) та ТБТ-8-*n*-бутилфенілкарбоксаміду (**52**) з каталітичним сайтом транскрипційного комплексу РНКП Т7.

У табл. 4 представлено енергетичні параметри похідних ТБТКК. За розрахованими показниками сполуки **44**, **51** і **52** мають високу афінність до рецептора, тоді як сполука **45** значно слабше зв'язується з каталітичною кишенею РНКП Т7.

Таблиця 4.

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

№ сполуки	-log K <sub>i</sub> *	Енергія (кДж/моль)			EC <sub>50</sub> (мкМ) ВБВД	IC <sub>50</sub> (мкМ) РНКП Т7
		FreE*	Cntc*	Hbnd*		
<b>44</b>	3,1	-15	-72,1	-5,5	29,8	6,0
<b>45</b>	1,7	-9,5	-69,2	-4,9	н/а	~ 61
<b>51</b>	3,4	-19,4	-74,8	-7,9	1,5	4,9
<b>52</b>	3,4	-19,3	-71,4	-5,6	12,7	15,3

\*-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.

Можливо, саме слабе зв'язування сполуки **45** (табл. 4) з каталітичною кишенею пояснює дуже низьку здатність інгібувати синтез РНК (РНКП Т7) та відсутність впливу на реплікацію ВБВД. Водночас сполуки: **44**, **51** і **52**, котрі за даними докінгу міцно зв'язуються з активним сайтом, ефективно блокують як синтез РНК, так і реплікацію вірусу (табл. 4).

### 2.5. Встановлення відповідності ТГКК та їхніх ариламідів правилам «п'яти» Ліпінського та визначення ліпофільності і розчинності сполук **23** та **51**.

Для синтезованих ТГКК та їхніх ариламідів розраховано значення  $\log P$ , кількість донорів та акцепторів Н-зв'язку та молекулярну вагу. За даними розрахунків всі сполуки відповідають класичним правилам «п'яти» Ліпінського. Для найактивніших сполук **23** та **51** визначено експериментальні параметри ліпофільності  $\log D_{23} = 4,95$ ,  $\log D_{51} = 3,67$ , а також розчинності у водному фосфатному буфері (рН = 7,4)  $S_{23} = 17$  мкМ,  $S_{51} = 42$  мкМ.

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

### 3.1. Обумовлення вибору сполук для дослідження

Із загальної формули синтезованих ариламідів ТГКК видно, що жорстке трициклічне ядро молекули з'єднане з арильним фрагментом аміду трьома зв'язками, які мають «нежорстку» природу. Якщо розглянути структуру гібридних сполук (рис. 4), то їхній гетероароматичний біциклічний фрагмент можна представити як жорсткий циклічний аналог карбоксамідної групи. Циклічний двохкоординований 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, аніж амідний протон.

Нами було досліджено вплив на біологічну активність сполук вищої «жорсткості» закріплення псевдоарилкарбоксамідного фрагменту до центрального гетероциклу, у порівнянні з ариламидами ТГКК. Для цього нами було протестовано серію трициклічно-біциклічних гібридних сполук (рис. 4).

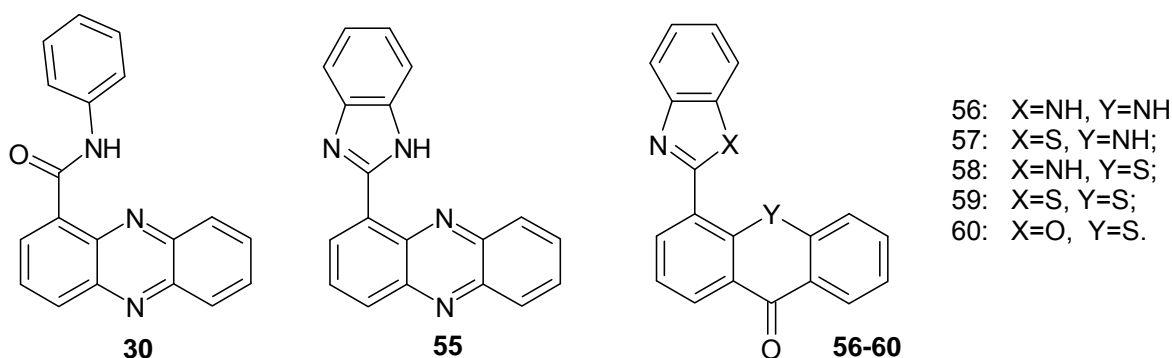


Рис. 4. Феніламід-ФКК-1 (**30**) та трициклічно-біциклічні гібридні сполуки (**56-60**).

### 3.2. Дослідження біологічної активності гібридних сполук.

Первинне тестування на здатність інгібувати синтез РНК у системі транскрипції РНКП Т7 проводили за концентрації сполук 25 мкг/мл (70-80 мкМ). Для виявлених активних сполук значення  $IC_{50}$  отримували методом двохкратних розведень. Гібридні сполуки **56**, **57** і **58** повністю блокують функціонування



транскрипційної системи, натомість РНКП Т7 виявилася нечутливою до сполук **55** і **59** і дуже слабо інгібується сполукою **60**. Розраховані значення  $IC_{50}$  для сполук **56**, **57** і **58** становлять 8,9, 5,7 і 19,8 мкМ, відповідно (табл. 5).

Отримані результати демонструють, що визначальну роль у інгібувальній активності гібридних сполук у модельній системі транскрипції РНКП Т7 відіграє центральний гетероцикл. Похідні акридонового гетероциклу **56** та **57** активно інгібують синтез РНК *in vitro*. Похідні тіаксантону **58**, **59** та **60** виявилися менш ефективними, тоді як похідна феназину **55** не впливає на синтез РНК. Сполуки **55**, **56** та **58** мають однаковий бензімідазольний фрагмент і різні центральні гетероцикли, похідна феназину **55** неактивна, тоді як похідні акридонону та тіоксантону інгібують синтез РНК. Важливість присутності донора Н-зв'язку у вигляді бензімідазольного NH спостерігається лише для похідних тіоксантону. Так, бензімідазольна похідна **58** активно пригнічує синтез РНК, на відміну від її бензтіазольного аналога **59**, а бензоксазольна похідна **60** дуже слабо впливає на синтез РНК.

Таблиця 5.

Значення  $IC_{50}$  (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>	$IC_{50}$ РНКП Т7
<b>55</b>	—*	16,8	8,4	—
<b>56</b>	—	36,8	9,0	8,9
<b>57</b>	—	16,6	8,2	5,5
<b>58</b>	—	—	7,8	19,8
<b>59</b>	—	15,7	7,9	—
<b>60</b>	—	7,6	7,6	~ 45
Офлоксацин	—	0,40	1,0	—

\* — сполука не активна за початкової концентрації.

Бензімідазольна похідна феназину **55** не інгібує синтез РНК *in vitro*, а її нециклічний аналог феніламід-ФКК-1 (**30**) слабо інгібує синтез РНК зі значенням  $IC_{50} \sim 35$  мкМ. Протилежні результати спостерігаються для гібридної сполуки **56** та її нециклічного аналога феніламіду акридон-4-карбонової кислоти. Так, сполука **56** ефективно інгібує синтез РНК ( $IC_{50} = 8,9$  мкМ), тоді як феніламід акридон-4-карбонової кислоти має значення  $IC_{50} \sim 40$  мкМ. Для встановлення детальнішої залежності впливу «жорсткості» структури на здатність інгібувати синтез РНК необхідно синтезувати та дослідити додаткову кількість сполук класу трициклічно-біциклічних гібридних сполук.

Дослідження антибактерійної активності гібридних сполук проводили за стартової концентрації 100 мкМ (табл. 5). Для виявлених активних агентів МІК визначали методом послідовних розведень. Грамнегативна бактерія *Pseudomonas aeruginosa* (викликає нозокоміальні інфекції у людини, лікування яких ускладнюється через резистентність до великого числа антибіотиків) нечутлива до всіх тест-агентів. Натомість гібридні сполуки проявили антибактерійну дію щодо

двох досліджуваних грампозитивних бактерій. Найчутливішою до дії сполук виявилася бактерія *Enterococcus Faecalis* (збудник різноманітних інфекцій: сечовивідних шляхів, органів малого тазу, поранених, ендокардиту), причому МІК тест-агентів коливається в близьких межах від 9,0 до 7,6 мкМ. Активність речовин щодо *Staphylococcus aureus* залежить від їхньої структури. Так, сполука **58** не пригнічує ріст цієї бактерії, а найефективнішою є сполука **60** (МІК = 7,6 мкМ). Слід відмітити, що серед досліджуваних похідних ТБТ лише одна речовина проявляє здатність пригнічувати ріст *Staphylococcus aureus*, тоді як всі гібридні сполуки, окрім **58**, достовірно інгібують цю бактерію.

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 значно вплинути на їхню біологічну активність у порівнянні з нефункціоналізованими гібридами. Синтез та дослідження таких речовин буде одним з наступних напрямків нашої подальшої роботи.

## 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 T7 є зв'язування інгібіторів з функціонально важливими амінокислотними залишками каталітичної кишені РНКП T7.

## Перелік наукових праць, опублікованих за темою дисертації

1. 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., Алексеєва І. В., Говорун Д. М., Швед А. Д. // Укр. біохім. журн. – 2011, – Т. 83, № 2. – С. 65-73.

*Особистий внесок здобувача – синтез 9-заміщених ФКК-1, аналіз та обговорення результатів докінгу, написання експериментальної частини у статті.*

2. Оцінка антибактерійної та антивірусної активності N-ариламідів 9-заміщених ФКК-1 – інгібіторів модельної транскрипції фага 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. // *Biorpolymers and Cell.* – 2012. – Vol. 28, № 6. – P. 477-485.

*Особистий внесок здобувача – дослідження впливу сполук на синтез РНК у модельній системі транскрипції, аналіз залежності “хімічна структура – активність” та обговорення біологічних досліджень, написання експериментальної частини у статті.*

3. 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, № 1. – P. 30-38.

*Особистий внесок здобувача – синтез похідних триазинобензотіазину, аналіз та обговорення результатів докінгу, написання експериментальної частини у статті.*

4. N-ариламіди 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, № 1. – P. 16-22.

*Особистий внесок здобувача – дослідження впливу похідних триазинобензотіазину на синтез РНК у модельній системі транскрипції, аналіз залежності “хімічна структура – активність” та обговорення результатів біологічних досліджень, написання експериментальної частини у статті.*

5. Нові гібридні інгібітори РНК-полімерази фага T7: синтез, докінг та скринінг *in vitro* / Костіна В. Г., Пальчиковська Л. Г., Платонов М. О., Васильченко О. В., Лисенко Н. А., Алексеєва І. В. // Укр. біохім. журн. – 2012. – Т. 84, № 5. – С. 38-47.

*Особистий внесок здобувача – дослідження впливу сполук на синтез РНК у модельній системі транскрипції, аналіз залежності “хімічна структура – активність”.*

6. Оцінка антибактеріальної 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. – P. 34-40.

*Особистий внесок здобувача – аналіз залежності “хімічна структура – активність” та обговорення біологічних досліджень.*

7. Синтез інгібіторів ДНК-залежної РНК-полімерази на основі ариламідів феназин-1 карбонової кислоти / Васильченко О. В., Платонов М. О., Алексеева І. В., Костюк Ю. К., Костіна В. Г., Пальчиковська Л. Г. // Тези доповідей дев'ятої всеукраїнської конференції студентів та аспірантів “Сучасні проблеми хімії”, 14-16 травня 2008 р.: м. Київ. – С. 55.

*Особистий внесок здобувача – синтез 9-заміщених ФКК-1, аналіз та обговорення результатів докінгу та біологічного скринінгу.*

8. Ингибиторы транскрипции на основе ариламидов феназин-1-карбоновой кислоты / Васильченко А. В., Платонов М. О., Костюк Ю. К., Костина В. Г., Алексеева И. В., Пальчиковская Л. И. // Матеріали III Міжнародної конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери”, 18-21 листопада 2008 р.: м.°Харків. – С. 22.

*Особистий внесок здобувача – синтез 9-заміщених ФКК-1, аналіз та обговорення результатів докінгу та біологічного скринінгу.*

9. Використання ДНК-залежної РНК-полімерази фагу Т7 для пошуку інгібіторів вірусу гепатиту С / Васильченко О. В., Платонов М. О., Старосила Д. Б., Пальчиковська Л. Г. // Збірник тез XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 3-6 квітня 2012 р.: м. Львів. – С. 279.

*Особистий внесок здобувача – аналіз тривимірних структур РНК-полімераз фагу Т7, гепатиту С та вірусу бичачої вірусної діареї, синтез сполук, аналіз та обговорення результатів докінгу та біологічного скринінгу.*

10. Оцінка антибактеріальної та антивірусної активності N-ариламідів триазинобензотіазин-карбонових кислот – інгібіторів модельної транскрипції бактеріофага Т7 / Васильченко О. В., Платонов М. О., Маньковська О. С., Тарасов О. А., Старосила Д. Б., Рибалко С. Л., Пальчиковська Л. Г. // Матеріали ІХ міжнародної науково-технічної конференції “Актуальні питання біологічної фізики і хімії”, 22-26 квітня 2013 р.: м. Севастополь. – С. 116.

*Особистий внесок здобувача – синтез триазинобензотіазинкарбонових кислот, дослідження впливу сполук на синтез РНК у модельній системі транскрипції, аналіз та обговорення результатів біологічного скринінгу.*

11. Biological properties of heteroaromatic tricyclic DNA-binding compounds / Vsylychenko O.V., Mankovska O. S., Truntseva I. G., Egorov D. P., Grigoryeva S. M., Palchykovska L. G. // Abstracts book of the I International Scientific Conference of Students and PhD Students “Cell Technology Week 2013”, 14-17 May 2013: Kyiv. – P. 65.

*Особистий внесок здобувача – дослідження впливу сполук на синтез РНК у модельній системі транскрипції, аналіз та обговорення результатів біологічного скринінгу.*

## АНОТАЦІЯ

**Васильченко О. В. Нові антибактерійні та противірусні сполуки серед ариламідів трициклічних карбонових кислот.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія. Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ, 2015.

Дисертацію присвячено синтезу та дослідженню біологічної активності трициклічних гетероароматичних карбонових кислот та їхніх ариламідів.

Синтезовано серії нових ариламідів 9-метил- та 9-метоксифеназин-1-карбонових кислот, 8-метилтриазинобензотіазин-6- та триазинобензотіазин-8-карбонових кислот.

Досліджено вплив синтезованих сполук на синтез РНК *in vitro* у модельній транскрипційній системі РНКП Т7. Проведено дослідження антибактерійної активності синтезованих сполук на низці грампозитивних та грамнегативних бактерій. Для активних сполук визначено показники МІК.

Для ряду вибраних сполук досліджено антивірусну активність щодо здатності інгібувати реплікацію ВБВД. Встановлено, що ймовірним механізмом дії сполук є інгібування РНК-синтезувального комплексу вірусу.

Методом молекулярного докінгу з'ясовано спосіб взаємодії синтезованих сполук із РНК-синтезувальним комплексом РНКП Т7. Визначено ключові міжмолекулярні зв'язки між лігандами та функціонально важливими амінокислотними залишками каталітичної кишені.

**Ключові слова:** феназин-1-карбонова кислота, триазинобензотіазин, синтез РНК, антибактерійна активність, вірус бичачої вірусної діареї, антивірусна активність, молекулярний докінг.

## АННОТАЦИЯ

**Васильченко А. В. Новые антибактериальные и противовирусные соединения среди ариламидов трициклических карбоновых кислот.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биорганическая химия. Институт биорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, 2015.

Диссертация посвящена синтезу и исследованию биологической активности трициклических гетероароматических карбоновых кислот (ТГКК) и их ариламидов. В работе использованы методы органического синтеза, ферментативного скрининга, исследования антибактериальной и противовирусной активности *in vitro*. Для определения возможного механизма взаимодействия соединений с транскрипционным комплексом ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага Т7 (РНКП Т7) использован метод молекулярного докинга.

Синтезированы серии новых, ариламидов 9-метил- и 9-метоксифеназин-1-карбоновых кислот (ФКК-1), 8-метилтриазинобензотіазин-6- и триазинобензотіазин-8-карбоновых кислот (ТБТКК). Разработан метод получения и синтезированы орто-аминотифенол карбоновые кислоты – исходные «билдинг-блоки» для синтеза трициклических карбоновых кислот.

Исследовано влияние полученных соединений на синтез РНК *in vitro* в

модельной системе транскрипции РНКП Т7. Показано, что на активность ариламидов ФКК-1 влияет природа заместителя в положении 9 гетероцикла. Выяснено, что активность производных ТБТКК зависит как от положения карбоксамидной группы, так и от природы и положения заместителей в амидном фрагменте.

Проведено исследование антибактериальной активности синтезированных соединений на ряде грамположительных и грамотрицательных бактерий. Для активных веществ определены значения МИК. Показано, что вероятный механизм антибактериального действия – ингибирование бактериальных РНК-синтезирующих комплексов.

Для ряда соединений исследована противовирусная активность в отношении вируса бычьей вирусной диареи (ВБВД) и определены параметры цитотоксичности и химиотерапевтического индекса. Показано, что активность производных ФКК-1 зависит от природы заместителя в положении 9 гетероцикла. Для производных ТБТ установлена зависимость структура-активность. Для исследованных соединений показана высокая корреляция их влияния на синтез РНК и репродукцию ВБВД. Вероятный механизм противовирусного действия этих соединений – ингибирование РНК-синтезирующего комплекса ВБВД.

Изучена биологическая активность гибридных соединений – аналогов ариламидов ТГКК с жесткой структурой псевдоарилкарбоксамидной группы. Установлено, что такая модификация соединений приводит к возникновению антибактериальной активности по отношению к *Enterococcus faecalis* и *St. aureus*.

Методом молекулярного докинга очерчен предполагаемый механизм взаимодействия синтезированных соединений с транскрипционным комплексом РНКП Т7. Определены ключевые межмолекулярные связи между лигандами и функционально важными аминокислотными остатками в каталитическом кармане. Установлена корреляция между результатами докинга и биологической активностью исследованных соединений.

Для всех исследованных соединений показано их соответствие правилам «пяти» Липинского по данным компьютерных расчетов. Для наиболее активных соединений установлены параметры липофильности и растворимости в водном фосфатном буфере (рН = 7,4).

Установлено, что ариламиды ТГКК являются перспективным классом для создания новых биологически активных соединений с антибактериальным и противовирусным действием, механизм работы которых может заключаться в ингибировании РНК-синтезирующих комплексов патогенов.

**Ключевые слова:** феназин-1-карбоновая кислота, триазинобензотиазин, синтез РНК, антибактериальная активность, вирус бычьей вирусной диареи, противовирусная активность, молекулярный докинг.

## SUMMARY

**Vasylchenko O.V. New antibacterial and antiviral compounds among arylamides of tricyclic carboxylic acids.** - Manuscript.

A thesis for candidate's degree in chemical sciences, specialty: 02.00.10 - bioorganic chemistry. Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

Dissertation is devoted to the synthesis and investigation of biological activity derivatives of tricyclic heteroaromatic carboxylic acids. The new series of 9-methyl and 9-methoxyphenazine-1-carboxylic acid (PCA-1), 8-methyltryazinebenzotiazine-6- and tryazinebenzotiazine-8-carboxylic acids arylamides were synthesized.

The effect of RNA synthesis inhibition by the obtained compounds was revealed using the model transcription system on the base of T7 phage DNA-dependent RNA-polymerase phage T7 (RNAP T7). For some compounds were shown the structure-activity relationship.

Antibacterial activity of all synthesized compounds against various gram-positive and gram-negative bacterial strains was determined. For all active compounds were fixed the minimal inhibition concentration value.

For a number of selected compounds antiviral activity against of bovine viral diarrhea virus was studied. It is shown that the activity of PCA-1 arylamides depend on the substituent in the 9 position of heterocycle.

By the molecular docking method potential mechanism of synthesized compounds interaction with the transcriptional complex of RNAP T7 was shown. The key intermolecular bonds between ligands and functionally important amino acid residues of the catalytic pocket were defined.

Results of computer calculations for all the studied compounds demonstrate their conformance with the Lipinski rules of "five".

**Key words:** phenazine-1-carboxylic acid, tryazinebenzotiazine, RNA synthesis, antibacterial activity, bovine viral diarrhea virus, antiviral activity, molecular docking.