

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 547.836 +543.422+577.15

НОВІ ГІБРИДНІ ІНГІБІТОРИ РНК-ПОЛІМЕРАЗИ ФАГА T7: СИНТЕЗ, ДОКІНГ ТА СКРИНІНГ *IN VITRO*

В. Г. КОСТИНА, Л. Г. ПАЛЬЧИКОВСЬКА, М. О. ПЛАТОНОВ,
О. В. ВАСИЛЬЧЕНКО, Н. А. ЛИСЕНКО, І. В. АЛЕКСЄЄВА

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: L.Palchykovska@ukr.net

Розробленим нами методом синтезу одержано низку нових гібридних сполук, трициклічні фрагменти яких представлені акридоном, тіоксантоном та феназином, а біциклічні – такими азолами як бензімідазол, бензотіазол та бензоксазол. Скринінг одержаних похідних у модельній системі транскрипції ДНК-залежної РНК-полімерази фага T7 (РНКП T7) виявив три ефективні інгібітори синтезу РНК із показником IC_{50} 8,9 мкМ, 5,7 мкМ та 19,8 мкМ. Методом молекулярного докінгу на моделі каталітичної кишені транскрипційного комплексу РНКП T7 встановлено спосіб взаємодії синтезованих сполук із мішенню. Сітка зв'язків ліганду з консервативними амінокислотними залишками рецептора утворюється за рахунок Н-зв'язків та π -взаємодії з іоном Mg^{2+} . Важливою структурною характеристикою, необхідною для прояву високої активності, є планарна геометрія гібридних молекул, що реалізується завдяки внутрішньомолекулярним Н-зв'язкам.

Ключові слова: гібридні молекули, феназин, акридон, тіоксантон, біциклічні азоли, синтез, докінг, інгібітори РНК-полімерази фага T7.

Відомо, що гетероциклічні сполуки входять до складу протеїнів, нуклеїнових кислот, коензимів, а також беруть участь у багатьох хімічних процесах, що здійснюються в живих клітинах. Значна частина існуючих лікарських препаратів різного призначення як природного, так і синтетичного походження представлена моно- та поліядерними гетероциклічними сполуками [1–4].

Серед синтезованих нами раніше похідних феназину, акридону та триазинобензотіазину виявлено низку сполук із виразною активністю проти вірусів грипу, Епстайна–Барра, герпесу простого та гепатиту С, які ефективно пригнічували синтез РНК та ДНК у модельних системах транскрипції та реплікації [5–7]. Найцікавішими виявилися представники серії амідів акридон-4-карбонової кислоти – ефективні інгібітори вірусів грипу, гепатиту С і герпесу. Цілком вірогідно, що мішенню для них є ензиматичні комплекси біосинтезу нуклеїнових кислот у вірусів.

Одержані результати стимулювали пошук і розробку нових біологічно активних акридон-, тіоксантон- та феназинвмісних сполук.

Метою роботи було: 1) створення гібридних сполук акридону, тіоксантону,

феназину з біциклічними азолами – бензімідазолом, бензотіазолом і бензоксазолом, 2) оцінка їхньої інгібуючої активності в модельній системі транскрипції ДНК-залежної РНК-полімерази фага T7, 3) вивчення методом молекулярного докінгу вірогідного способу, в який відбувається пригнічення синтезу РНК синтезованими гібридними структурами.

Матеріали і методи

У роботі використано реагенти та розчинники фірми Хімлаборреактив (Україна) та Sigma (США). Очищення і абсолютування розчинників проведено за стандартною методикою. Феназин-1-карбонову кислоту (ФКК-1) та її амід синтезовано методом, описаним в роботі [8], акридон-4-карбонову кислоту (АКК) – в роботі [5]. Перебіг реакцій та чистоту синтезованих сполук контролювали за допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ) на платівках фірми Merck (Німеччина) у системі розчинників хлороформ – метанол (9 : 1), (95 : 5). Продукти реакції очищали методом препаративної хроматографії на силікагелі G-60 фірми Merck. 1H ЯМР-спектри синтезованих речовин реєстрували на

спектрометрі «Mercury-400» (Varian, США) в DMSO-d₆ із використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту. МС-спектри реєстрували на рідинному хроматографі Agilent 1100 LCMSD SL (Німеччина) методом хімічної іонізації. Температуру плавлення сполук визначали на приладі Боетіуса (Німеччина). Методи синтезу та характеристики гібридних сполук наведено у розділі «Додаток».

Процедуру докінгу ліганду в модельний рецептор здійснювали за методом, описаним у роботі [9]. Усі розрахунки, в тому числі і оптимізацію геометрії лігандів, проводили за допомогою пакету програм QXP /Flo+, розробленого McMartin та ін. [10]. Докінг проводили з використанням гнучкого ліганду та фіксованої моделі рецептора. Модель рецептора сформовано, спираючись на рентгеноструктурні дані для транскрипційного комплексу РНКП Т7–ДНК, що відповідає фазі впізнання вхідного нуклеотиду (PDB X-Ray code: 1SOV) [11]. Під час створення моделі активного сайту враховували амінокислотні залишки в радіусі 1,0 нм навколо природного субстрату, що беруть участь у впізнанні і зв'язуванні субстрату та забезпечують функціонування полімерази.

Реакція транскрипції *in vitro*. Перевірку впливу синтезованих речовин на синтез РНК проводили в системі транскрипції *in vitro* з використанням ДНК-залежної РНК полімерази бактеріофага Т7, застосовуючи комерційні реагенти фірми Fermentas (Литва) [12]. Транскрипцію проводили в 20 мкл реакційної суміші, яка містила 0,5 мкг лінеаризованої плазмідної ДНК рTZ19R, 2 мМ кожного з рибонуклеозидтрифосфатів, 20 од. акт. інгібітора РНК-аз RiboLock™ у присутності (у мМ): 40 трис-НСl, рН 7,9; 6 – MgCl₂, 2 – спермидину, 10 – NaCl, 10 – DTT та 12 од. акт. Т7 РНК полімерази. Досліджувані речовини розчиняли в ДМСО (1 мг/мл) і додавали до реакційної суміші в кількості 0,5 мкл. Концентрація ДМСО в контрольній та дослідних пробах становила 2,5%. Реакційну

суміш витримували впродовж 45 хв при 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 транслюмінаторі в УФ-світлі з наступним фотографуванням електрофореграм цифровою камерою. Інтенсивність смуг РНК вимірювали денситометрично за допомогою програми Scion Image.

Інгібіторну активність тест-агентів визначали, порівнюючи кількість одержаного РНК-продукту з контролем (кількість РНК-продукту без додавання інгібітора). Значення IC₅₀ – концентрацію інгібітора, необхідну для пригнічення ензиматичної активності на 50% визначали за графіком залежності активності від концентрації.

Результати та обговорення

Ідея створення нової серії біологічно активних сполук полягала в поєднанні фармакофорних три- і біциклічних гетерооснов з метою збагатити їхні біологічні властивості. Нежорстка структура таких гібридних молекул обумовлює їхню конформаційну рухливість, що, вірогідно, сприятиме ефективнішій взаємодії з ензиматичною мішенню.

Для одержання гібридних сполук феназину та акридону з бензimidазолом використовували методику, що застосовувалася в циклізації піридин-карбонових кислот з *o*-фенілендіаміном (ФДА) за нагрівання (150–160 °С) в поліфосфорній кислоті (ПФК) [13]. З'ясувалося, що для феназин-1-карбонової кислоти (чи її аміду) та акридон-4-карбонової кислоти жорсткі умови аналогічної конденсації (рис. 1) виявилися мало прийнятними. Відповідні реакції супроводжуються значним декарбоксілюванням вихідних кислот, що призводить до значного зниження виходу бажаного продукту. Зміна температури та тривалості реакції не відбивається на

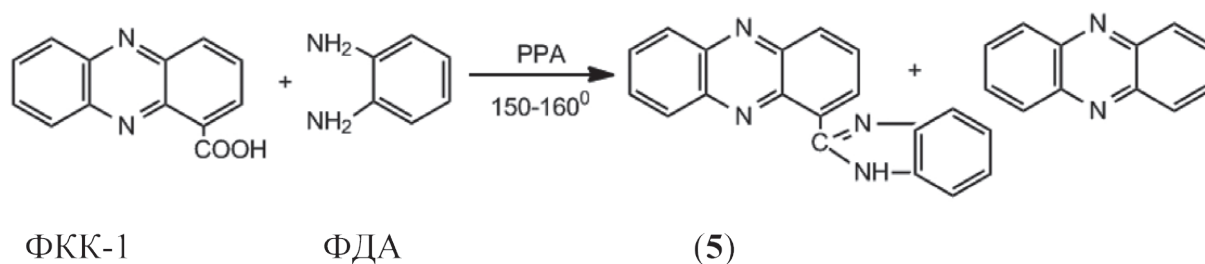


Рис. 1. Схема синтезу 1-(1H-бензimidазол-2-іл)феназину (5)

збільшенні виходу цільових сполук. Найкращий вихід 1-(1Н-бензімідазол-2-іл)феназину (сполуки **5**) (рис. 1) становив 20% і був нижчим за вихід незаміщеного феназину (25%), а гібридну сполуку акридону (**6**) (рис. 2) вдалося одержати з виходом не більшим ніж 5%. Спроби одержати аналогічні похідні феназину з іншими азолами описаним вище методом виявилися безрезультатними.

Тому для отримання гібридних сполук акридону та тіоксантону ми застосовували інший метод. Спочатку синтезували вихідні 2-арилпохідні бензімідазолу, бензотіазолу і бензоксазолу (табл. 1, **1–4**). Синтез здійснювали за раніше наведеною в літературі методикою [13, 14]. Суттєві модифікації способу виділення та очищення цільових продуктів дозволили значно підвищити їх вихід.

Формування гібридних структур акридону і тіоксантону здійснювали поетапно, як показано на схемі (рис. 2). Виходячи із відповідних похідних **1–4** (табл. 1), добудовували трициклічний гетероцикл.

На першій стадії синтезу похідних акридону з вихідних сполук **1a** і **2** (табл. 1) одержували N-арилзаміщені амідини з карбоксильною групою в арильному радикалі (рис. 2). Їхня подальша гетероциклізація в присутності ПФК приводить до утворення сполук **6** і **7** із задовільним виходом (> 30 і 40% відповідно). Проте синтез похідної **7** на основі стартової сполуки **3** (табл. 1) був менш вдалий (вихід 9%) вірогідно внаслідок слабшої реакційної здатності *o*-бромфенілпохідної бензотіазолу.

У разі одержання аналогічних гібридних сполук тіоксантону на першому етапі синтезу-

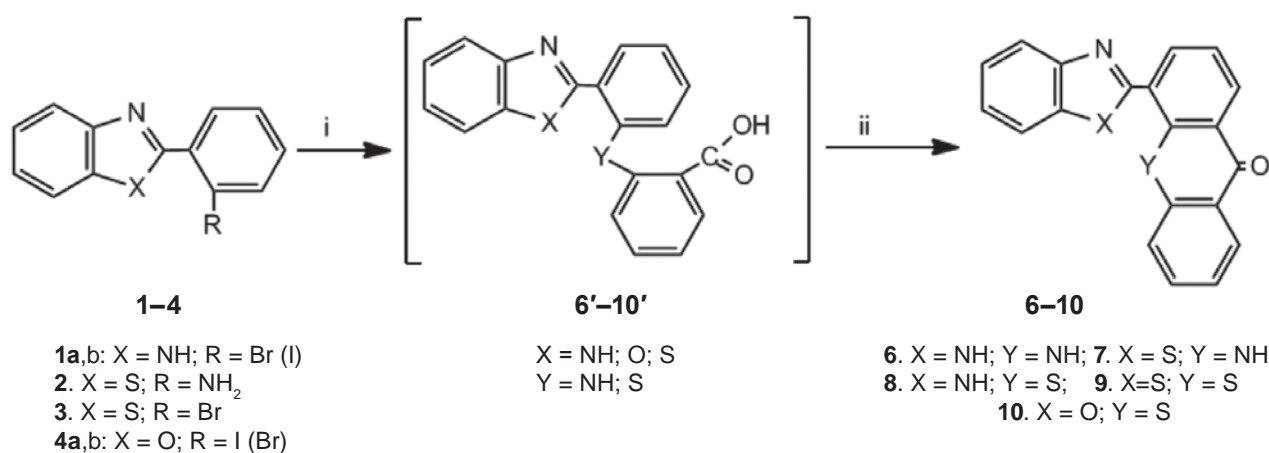
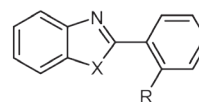


Рис. 2. Загальна схема синтезу гібридних структур. Реагенти та умови: *i:* **1a**, *o*-NH₂PhCOOH, Cu, K₂CO₃, DMF (**6'**); **2**, *o*-IPhCOOH, K₂CO₃, DMF (**7'**); **1b**, **3**, **4a**, *o*-SPhCOOH, K₂CO₃, DMF (**8'**, **9'**, **10'**), 110–140 °C (від 5 до 9 год); *ii:* PPA, 110–120 °C (від 2 до 7 год) (**6–10**)

Таблиця 1. Умови одержання вихідних сполук загальної формули:



№	X	R	Температура реакції, °C	Тривалість реакції, год	Вихід, %	Т.пл., °C, (розчинник)	Посилання
1a	NH	Br	250–260	6,0	72,0	238–241* (C ₂ H ₅ OH)	[13]
1b	NH	I	140–160	7,0	85,6	242–248* (CH ₃ COOH/H ₂ O)	[13]
2	S	NH ₂	175–180	10,5	80,7	118–121, (C ₂ H ₅ OH/H ₂ O)	[14]
3	S	Br	120–150	10,5	99,0	58–61 (C ₂ H ₅ OH/H ₂ O)	–
4a	O	I	150	13,0	66,6	119–122 (CCl ₄)	–
4b	O	Br	230	5,5	80,0	67–68 (C ₂ H ₅ OH/H ₂ O)	–

* Плавлення супроводжується розкладом сполуки

вали діарилзаміщені сульфіді бензimidазолу, бензотіазолу та бензоксазолу за реакцією сполук **1a**, **3** та **4b** (табл. 1) із тиосаліциловою кислотою у ДМФ. 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 **8–10** був трохи нижчим за такий для похідних акридонону, можливо, внаслідок лабільності проміжних діарилсульфідів.

Синтезовані сполуки – стійкі кристалічні речовини з високими температурами плавлення. Розчинність у спиртах, гліколях та інших органічних розчинниках обмежена, найкраща – в ДМФ та ДМСО.

У ¹H-ЯМР спектрах сполук **5–8** положення N-H протонів спостерігається в області 12,93–14,22 м. ч., що, ймовірно, спричинено утворенням внутрішньомолекулярних (хелатного типу) і/або міжмолекулярних водневих зв'язків. Так, у сполуках **6** і **7** до внутрішньомолекулярного зв'язку спонукає сама електронна будова гібридної молекули на основі акридонону. Підтвердженням цього припущення є найбільший зсув N-1 протону бензimidазольного фрагмента в сполуці **6** (відносно такого у сполуках **5** та **8**), що можна пояснити появою додаткового позитивного заряду на атомі N-3 внаслідок утворення водневого зв'язку хелатного типу. Сполука **7** також потенційно здатна на такий зв'язок, тоді як сполуки **5** та **8** більш схильні до утворення міжмолекулярних H-зв'язків. У ¹H-ЯМР спектрах сполуки **5** в області 13,2

м.ч. спостерігається розширений сигнал протону N-1, який знаходиться в обміні (0,4 Н), у сполуці **8** сама геометрія гібридної молекули на основі тіоксантону унеможливає утворення внутрішньомолекулярного H-зв'язку.

Для з'ясування способу взаємодії синтезованих сполук з рецептором та виявлення ключових взаємодій «ензим–ліганд» проведено їх молекулярний докінг у модель каталітичної кишені транскрипційного комплексу РНКП Т7, що відповідає фазі впізнавання вхідного нуклеотиду в послідовних актах синтезу РНК (рис. 3).

Вибрана ділянка каталітичної кишені радіусом 1,0 нм містила амінокислотні залишки Arg425, Ser541, Gly542, Tyr639, His784 і Asp812, що відповідають за зв'язування ліганду з рецептором. Більшість з них належать до функціонально важливих консервативних мотивів РНКП Т7 [12].

Докінг проводили з використанням гнучкого ліганду та фіксованої моделі рецептора. За одержаними даними трициклічний фрагмент усіх досліджуваних сполук орієнтується в об'ємі каталітичної кишені майже подібним чином і утримується, незалежно від його розташування, взаємодією атома кисню O9 з гуанідиною групою Arg425 і HN1 His784 та π-взаємодією з іоном Mg²⁺, який контролюється гідроксилом Tyr639 і 2'-ОН-групою цукрового залишку вхідного нуклеозидтрифосфату або останнього нуклеозиду РНК ланцюга, що утворюється.

В обох сполуках акридонону – **6** і **7** – утворюється внутрішньомолекулярний зв'язок між N10H акридонового фрагмента

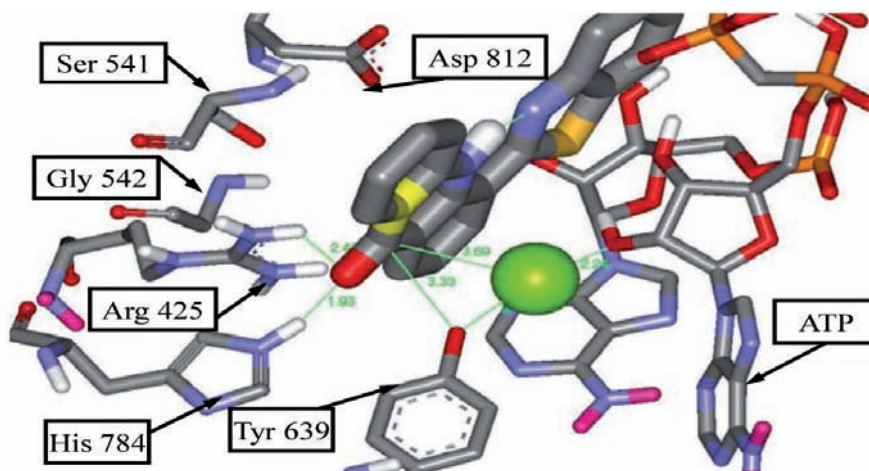


Рис. 3. Модель зв'язування досліджуваних похідних із каталітичною кишенню транскрипційного комплексу РНКП Т7 на прикладі сполуки **7**

та N3 бензimidазолу і аналогічно HN10...N3 бензотіазолу (довжина зв'язку 0,196 та 0,193 нм відповідно). У таких конформаціях – **6a** та **7a** (табл. 2) обидва гетероциклічні фрагменти лежать в одній площині. Для сполуки **6** існує альтернативна непланарна конформація **6b**, коли кут (торсійний кут) між акридоновим і бензimidазольним фрагментами стає близьким до 90° і внутрішньомолекулярний Н-зв'язок розривається. Натомість виникає водневий зв'язок між ендотіциклічним атомом азоту бензimidазольного фрагмента та карбоксильною групою Asp812.

Похідні тіоксантону з бензimidазолом та бензотіазолом не утворюють внутрішньомолекулярний Н-зв'язок і набувають непласкої конформації в ензиматичній мішені. Для гібриду тіоксантону з бензimidазолом **8** можливі два конформаційні варіанти. В першому утворюється Н-зв'язок бензimidазольного фрагмента з карбоксильною групою Asp812 – конформація **8a**. У другому – бензimidазольний фрагмент зорієнтований таким чином, що утворює водневий зв'язок з 2'-ОН групою цукрового залишку останнього нуклеозиду РНК ланцюга – конформація **8b**.

Гібридна структура тіоксантону **9** представлена тільки однією непласкою конформацією, за якої N1 атом азоту бензотіазолу взаємодіє з 2'-ОН групою цукрового залишку вхідного нуклеотиду.

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. 2 відображено основні параметри, які ха-

рактеризують спорідненість (binding affinity) сполук до мішені.

За розрахованими показниками pI, вільної енергії (FreE) зв'язування, енергії водневих зв'язків (Hbnd) та гідрофобних взаємодій (contact energy – Cntc) всі досліджувані сполуки мають достатню афінність до рецептора – каталітичної кишені РНКП Т7.

Беручи до уваги одержані дані, можна запропонувати модель способу взаємодії досліджуваних гібридних сполук з ензиматичною мішенню. Згідно з цією моделлю трициклічні фрагменти сполук утримуються Н-зв'язками з гуанідиною групою Arg425 і HN1 His784 та π-стекінг-взаємодією з іоном Mg²⁺. За даними докінгу для реалізації інгібіторних властивостей гібридів необхідним є утворення копланарної структури молекули або взаємодія її біциклічного фрагмента з амінокислотним залишком каталітично важливої Asp812.

Транскрипція є ключовим процесом функціонування та репродукції клітин. Управління цими процесами, а саме регуляція їхньої швидкості та продуктивності, є предметом досліджень у біології та медичній хімії. Органічні сполуки, які здатні впливати на процес транскрипції використовують, з одного боку, як інструменти для поглибленого розуміння біологічного явища, з другого, – як потенційні лікарські засоби – інгібітори репродукції вірусів, бактерій тощо [15].

Відомо, що 3D-структури різних ДНК-та РНК-полімераз мають високу ступінь подібності, містять одні й ті самі структурні домени і консервативні мотиви, необхідні для елонгації ланцюга нуклеїнової кислоти [16, 17]. Тому для скринінгу синтезованих

Таблиця 2. Енергетичні параметри комплексів ліганд–рецептор, одержані з використанням програми QXP/FLO+

Ліганд	Енергія, кДж/моль			
	pI*	FreE	Cntc	Hbnd
5a	3,7	-21,1	-57,4	-4,2
6a	3,6	-20,3	-58,8	-3,7
6b	2,6	-15,1	-55,7	-2,9
7a	3,6	-20,6	-62,2	-1,9
8a	4,1	-23,3	-58,9	-5,7
8b	2,4	-13,7	-61,8	-2,0
9a	3,3	-18,9	-59,6	-2,6

* pI (-log K_i) – зворотний логарифм константи інгібування

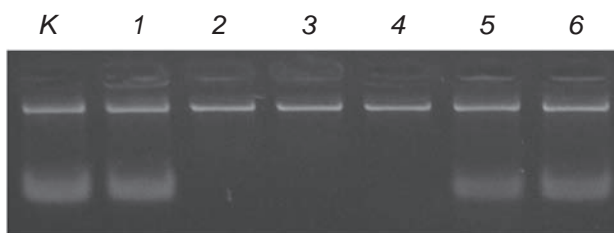


Рис. 4. Вплив гібридних сполук на синтез РНК *in vitro* (транскрипція РНКП Т7). Типова електрофореграма РНК-транскриптів із трьох незалежних експериментів. Повне інгібування виявляється відсутністю РНК-продукту в агарозному гелі. К – позитивний контроль; доріжки 1–6 – РНК-продукти, одержані за дії сполук 5–10 (концентрація речовин 25 мкг/мл)

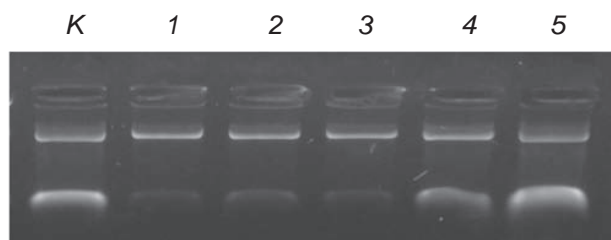


Рис. 5. Вплив сполуки 7 на синтез РНК *in vitro* (транскрипція РНКП Т7). Типова електрофореграма РНК-транскриптів із трьох незалежних експериментів. К – позитивний контроль; доріжки 1 – 12,5 мкг/мл; 2 – 6 мкг/мл; 3 – 3 мкг/мл; 4 – 1,5 мкг/мл; 5 – 0,75 мкг/мл

сполук та селекції інгібіторів синтезу РНК ми використали просту у застосуванні, продуктивну модельну систему транскрипції на основі ДНК-залежної РНК-полімерази фага Т7 (РНКП Т7) [18]. Модельна система транскрипції РНКП Т7 з успіхом використовувалася авторами для виявлення ефективних інгібіторів транскрипції – антимікробних та/або антивірусних агентів [5, 12, 19, 20].

Первинне тестування проводили за концентрації синтезованих сполук 25 мкг/мл (70–80 мкМ залежно від структури). Гібридні сполуки 6, 7 і 8 повністю блокують функціонування транскрипційної системи,

натомість, РНКП Т7 нечутлива до сполук 5, 9 і 10 (рис. 4).

Для детальнішого дослідження інгібіторної дії активних сполук застосовували метод подвійних розведень. Найкращим інгібітором синтезу РНК виявилася сполука 7 (рис. 5).

Показники ефективності сполук (IC_{50}) визначали із графіка активності відповідних сполук (рис. 6) та інтерпретували в молярній концентрації.

Розраховані значення IC_{50} для тест-агентів 7, 6 і 8 становлять 5,7; 8,9 і 19,8 мкМ відповідно.

За даними біологічного тестування, похідна акридону та бензотіазолу 7 є найефективнішим інгібітором транскрип-

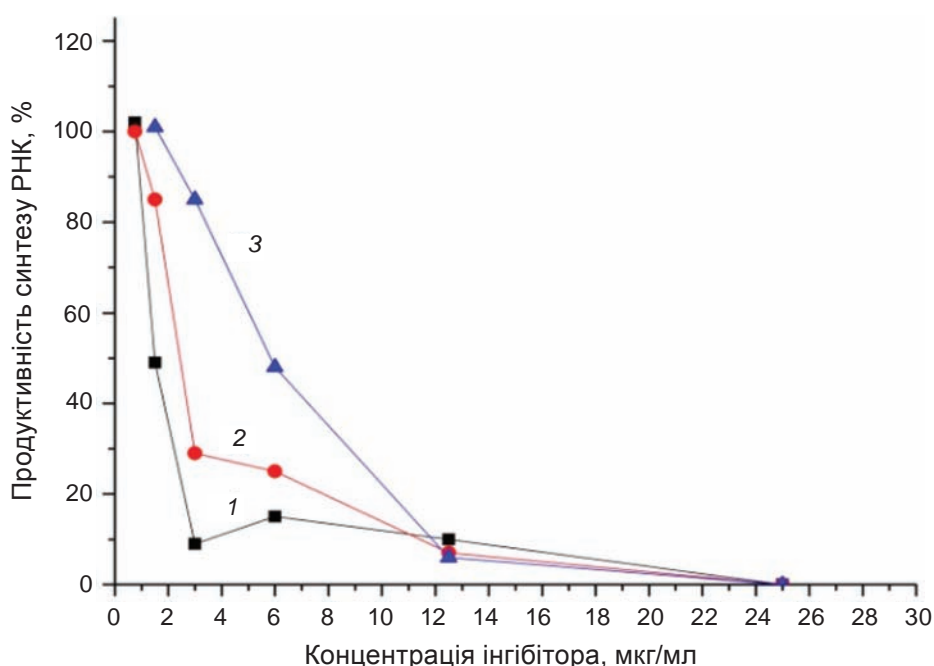


Рис. 6. Вплив концентрації гібридних сполук на ефективність синтезу РНК *in vitro*: 1 – сполука 7; 2 – сполука 6; 3 – сполука 8

ційного комплексу РНКП Т7, тоді як аналогічна похідна тіоксантону **9** – неактивна сполука. 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 часом призводить до появи так званих «помилково позитивних хітів».

Таким чином, серед синтезованих нами сполук виявлено ефективні інгібітори синтезу РНК, які характеризуються подібним типом взаємодії з ензиматичною 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 елонгації.

Результати біологічних експериментів на бактеріальних і вірусних моделях будуть представлені в наступній публікації.

Додаток

Загальний метод синтезу 2-(*o*-галогенфеніл)бензimidазолу, 2-(*o*-галогенфеніл)бензотіазолу, 2-(*o*-галогенфеніл)бензоксазолу (1a**, **1b**, **3**, **4a**, **4b**).** До еквімолярної кількості *o*-бром(йод)бензойної кислоти або *o*-аміно-бензойної кислоти та відповідного ариламіну (*o*-ФДА, *o*-амінофенолу, *o*-амінотіофенолу) додають надлишок ПФК (до утворення пасти) і суміш витримують на пісочній бані протягом декількох годин при температурі, наведеній в табл. 1. Процес контролюють ТШХ в системі $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ (9 : 1). Реакційну масу охолоджують, додають воду, нейтралізують 25%-им розчином аміаку до рН 7. Відділяють осад, промивають на фільтрі декілька разів водою, сушать, кристалізують. Таким чином отримують продукти **1a** та **1b**. Сполуки **3**, **4a** і **4b** спочатку екстрагують із водного розчину CHCl_3 або CH_2Cl_2 , екстракт випаровують і залишок кристалізують. Смолоподібний технічний продукт **4a** повторно екстрагують гарячим гептаном, розчинник випаровують і залишок кристалізують. Характеристики сполук наведено в табл. 1.

Синтез 2-(*o*-амінофеніл)бензотіазолу (**2**) проводять в аналогічних умовах, конденсуючи 516 мг (3,8 ммоль) антранілової кислоти з 470 мг (3,8 ммоль) *o*-амінотіофенолу.

Синтез гібридних похідних

1-(1Н-Бензimidазол-2-іл)феназин (5**).** Метод А. До поліфосфорної кислоти (ПФК),

одержаної з 2,3 г фосфору (V)-оксиду та 1,57 мл ортофосфорної кислоти ($d = 1,69$), додають 196 мг (0,87 ммоль) ФКК та 140 мг (1,3 ммоль) *o*-ФДА, перемішують до утворення однорідної суспензії та нагрівають в інтервалі температур 150–160 °С протягом 6 год. Перебіг реакції контролюють ТШХ. Смолоподібну суміш обробляють водою та 25%-им розчином аміаку; осад, що утворюється, відділяють, розчиняють за нагрівання в 10 мл хлороформу та фільтрують. Хлороформ випаровують у вакуумі, одержану суміш продуктів хроматографічно розділяють на колонці з силікагелем. Елюент – хлороформ. Першу фракцію елюату випаровують, залишок кристалізують із гептану і отримують 39,5 мг (25%) феназину з т. пл. 173–178 °С. $R_f = 0,35$ (CHCl_3). ¹Н-ЯМР, δ : 8,299 (s, 1H, H-Ar); 8,287 (s, 1H, H-Ar); 8,276 (s, 1H, H-Ar); 8,265 (s, 1H, H-Ar); 8,006 (s, 1H, H-Ar); 7,994 (s, 1H, H-Ar), 7,983 (s, 1H, H-Ar), 7,972 (s, 1H, H-Ar). Із другої фракції елюату виділяють 48,4 мг (18,7%) цільового продукту **5**. Т.пл. 232–235 °С (з етанолу). $R_f = 0,71$ ($\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$, 95 : 5). ¹Н- ЯМР, δ : 13,2 (bs, 0,4H, NH); 9,14 (d, 1H, J=7,2, H-Ar); 8,81 (d, 1H, J=8,4, H-Ar); 8,34 (d, 1H, J=8,8, H-Ar); 8,28 (d, 1H, J=8,4, H-Ar); 8,12 – 8,00 (m, 3H, H-Ar); 7,79-7,77 (m, 2H, H-Ar); 7,26-7,23 (m, 2H, H-Ar). LC-MS m/z [M+H]⁺ 297,1.

Метод Б. Суміш 110 мг (0,5 ммоль) амідю ФКК, 75 мг (0,7 ммоль) *o*-ФДА та 1,2 мл ПФК нагрівають при 130–140 °С протягом 14 год, контролюючи процес ТШХ на відсутність амідю ФКК-1. Після обробки смолоподібної маси (методом А) і хроматографією продуктів реакції на силікагелі отримують 32 мг (21%) кристалічної речовини, ідентичної сполуці **5** за фізико-хімічними характеристиками (Т.пл., R_f , ¹Н-ЯМР спектр) та 20 мг (22%) незаміщеного феназину.

4-(1Н-Бензimidазол-2-іл)-10Н-акридин-9-он (6**)**

I етап. Одержання N-арилзаміщеного амідину. До суміші 273 мг (1 ммоль) сполуки **1a**, 275 мг (2 ммоль) антранілової кислоти, 325 мг поташу (K_2CO_3) та 26,5 мг (0,41 ммоль) порошку міді, додають 3 мл сухого диметилформамідю і витримують на пісочній бані при температурі 120–130 °С протягом 5–7 год, періодично взбуваючи. Контроль процесу – ТШХ в системі хлороформ – метанол (9 : 1). До охолодженої суміші додають 5 мл води, нейтралізують крижаною оцтовою кислотою до рН 7. Осад на фільтрі промивають гарячою H_2O та сушать. Одержують 320 мг інтермедіату, який без

додаткової очистки використовують у реакції внутрішньомолекулярної циклізації.

II етап. Циклізація: 320 мг амідину змішують з 0,7 г ПФК і утворену масу витримують 3 год при температурі 110–120 °С, контролюючи процес ТШХ. Далі реакційну суміш охолоджують і розбавляють водою. Осад відфільтровують та промивають водою до нейтральної реакції. Цільовий продукт 6 очищають за допомогою хроматографії на силікагелі. Елюцію проводять лінійним градієнтом концентрацій ДМФ (2–10%) у хлороформі. Одержують 91 мг (30%) сполуки 6 з Т.пл. 353–357 °С. $R_f = 0,60$ (CHCl₃ - MeOH, 95 : 5). ¹H-ЯМР, δ: 14,22 (s, 1H, NH); 13,20 (с, 1H, NH); 8,55 (d, 1H, J=6,4, H-Ar); 8,42 (d, 1H, J=8,4, H-Ar); 8,29 (d, 1H, J=6,4, H-Ar); 8,83 (d, 1H, J=4,4, H-Ar); 7,75-7,69 (m, 2H, H-Ar); 7,60-7,59 (m, 1H, H-Ar); 7,42-7,39 (t, 1H, H-Ar); 7,286 (s, 1H, H-Ar). LC-MS m/z [M+H]⁺ 312,1.

4-(1H-Бензотіазол-2-іл)-10H-акридин-9-он (7). До 170 мг (0,7 ммоль) 2-(*o*-амінофеніл)-бензотіазолу (2) в 3 мл ДМФ додають 205 мг (0,8 ммоль) 2-йодбензойної кислоти, 220 мг поташу та 19 мг міді і масу нагрівають 5 год при 120–130 °С (контроль – ТШХ). Після стандартної обробки реакційної суміші осад відфільтровують, ретельно промивають і сушать. Вихід інтермедіату 151 мг. Без попередньої кристалізації його змішують з ПФК до пастоподібного стану та нагрівають при 120 °С протягом 5 год. Реакційну суміш обробляють за методом, описаним для сполуки 6. Після кристалізації з етиленгліколю отримують 102 мг (42%) сполуки 7. Т.пл. 233–237 °С. $R_f = 0,85$ (CHCl₃ - MeOH, 95 : 5). ¹H-ЯМР, δ: 13,235 (с, 1H, NH); 8,43 (d, 1H, J=7,6, H-Ar); 8,36 (d, 2H, J=7,6, H-Ar); 8,25 (d, 1H, J=8,0, H-Ar); 8,19 (d, 1H, J=7,6, H-Ar); 7,87-7,79 (m, 2H, H-Ar); 7,65-7,61 (t, 1H, H-Ar); 7,56-7,52 (t, 1H, H-Ar); 7,42-7,33 (m, 2H, H-Ar). LC-MS m/z [M+H]⁺ 329,1.

4-(1H-Бензimidазол-2-іл)-10-тіоксантенон (8). До 206 мг (0,65 ммоль) сполуки 1b у 3 мл ДМФ додають 100 мг (0,65 ммоль) тіосаліцилової кислоти та 194 мг (1,4 ммоль) поташу, суміш витримують при температурі 110–120 °С протягом 5,5 год, охолоджують, розбавляють водою до об'єму 5 мл та розчин нейтралізують оцтовою кислотою до рН 7. Осад відділяють, промивають H₂O та вису-

шують. Отримують 170 мг S-арилзаміщеного сульфідну, котрий використовують в реакції гетероциклізації у ПФК (110–120 °С, 2 год). Після стандартної обробки реакційної суміші продукт відфільтровують та кристалізують із суміші розчинників: ацетон – ДМФ. Отримують 48 мг (23%) сполуки 7 з т. пл. 353–357 °С. $R_f = 0,82$ (CHCl₃ - MeOH, 95 : 5). ¹H-ЯМР, δ: 12,93 (с, 1H, NH); 8,68 (d, 1H, J=8,0, H-Ar); 8,46 (d, 1H, J=8,0, H-Ar); 8,285 (d, 1H, J=7,6, H-Ar); 7,82–7,70 (m, 4H, H-Ar); 7,57-7,55 (t, 2H, H-Ar); 7,27-7,25 (m, 2H, H-Ar). LC-MS m/z [M+H]⁺ 329,1.

4-(1H-Бензотіазол-2-іл)-10-тіоксантенон

(9). Діарилсульфідну проміжну сполуку (314 мг), одержану реакцією 248 мг (0,85 ммоль) 2-(*o*-бромфеніл)бензотіазолу (3) із 132 мг (0,86 ммоль) тіосаліцилової кислоти в аналогічних вищезазначених умовах, змішують з ПФК і нагрівають 5,5 год при 120 °С. Після стандартної обробки реакційної суміші відділяють осад, який додатково очищують флеш-хроматографією, а потім кристалізують із *n*-бутанолу (з додаванням ДМФ). Вихід цільового продукту 94 мг (30%). Т.пл. 226–229 °С. $R_f = 0,86$ (CHCl₃ - MeOH, 95 : 5). ¹H-ЯМР, δ: 8,73 (d, 1H, J=8,4, H-Ar); 8,47-8,45 (dd, 1H, J=8,0; 8,4, H-Ar); 8,35 (d, 1H, J=8,0, H-Ar); 8,28–8,23 (dd, 2H, J=8,0; 8,4, H-Ar); 7,89 (d, 1H, J=8,0, H-Ar); 7,79-7,76 (m, 2H, H-Ar); 7,68-7,57 (m, 3H, H-Ar).

4-(1H-Бензоксазол-2-іл)-10-тіоксантенон

(10). Гібридну сполуку 10 отримано аналогічно сполуці 8; вихідні реагенти: 2-(*o*-йодфеніл)бензоксазол (4a) (210 мг, 0,65 ммоль) та тіосаліцилова кислота (110 мг, 0,71 ммоль). Циклізація діарилсульфідну відбувається за 7–8 год при 110–120 °С. Отримують 170 мг (79%) технічного продукту. Після кристалізації із етанолу з додаванням ДМФ одержано 65 мг (31%) жовтих кристалів з Т.пл. 224–226 °С. $R_f = 0,90$ (CHCl₃ - MeOH, 95 : 5). ¹H-ЯМР, δ: 8,74 (d, 1H, J=8,0, H-Ar); 8,63 (d, 1H, J=7,6, H-Ar); 8,44 (d, 1H, J=8,0, H-Ar); 7,97-7,93 (t, 2H, H-Ar); 7,85 (d, 1H, J=7,6, H-Ar); 7,79-7,77 (m, 2H, H-Ar); 7,63-7,59 (t, 1H, H-Ar); 7,53-7,47 (m, 2H, H-Ar).

Автори щиро вдячні доктору хімічних наук І. Я. Дубею за консультації та плідне обговорення проведення синтезу сполук.

**НОВЫЕ ГИБРИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ФАГА Т7:
СИНТЕЗ, ДОКИНГ И СКРИНИНГ *IN
VITRO***

*В. Г. Костина, Л. И. Пальчиковская,
М. О. Платонов, А. В. Васильченко,
Н. А. Лысенко, И. В. Алексеева*

Институт молекулярной биологии и
генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: L.Palchykovska@ukr.net

Разработанным нами методом химического синтеза получен ряд новых гибридных соединений, трициклические фрагменты которых представлены акридоном, тиоксантоном и феназином, а бициклические – такими азолами, как бензимидазол, бензотиазол и бензоксазол. Скрининг полученных соединений в модельной системе транскрипции ДНК-зависимой РНК полимеразы фага Т7 (РНКП Т7) выявил три эффективных ингибитора синтеза РНК с показателем IC_{50} 8,9; 5,7 и 19,8 мкМ соответственно. Методом молекулярного докинга на модели каталитического кармана транскрипционного комплекса РНКП Т7 установлен способ взаимодействия синтезированных соединений с мишенью. Сеть связей лиганда с консервативными аминокислотными остатками рецептора образуется за счет Н-связей и π -взаимодействия с ионом Mg^{2+} . Важной структурной характеристикой, необходимой для проявления высокой активности, является планарная геометрия гибридных молекул, которая реализуется благодаря внутримолекулярным Н-связям.

Ключевые слова: гибридные соединения, феназин, акридон, тиоксантон, бициклические азолы, синтез, докинг, ингибиторы РНК-полимеразы фага Т7.

**NOVEL HYBRID INHIBITORS OF
THE PHAGE T7 RNA POLYMERASE:
SYNTHESIS, DOCKING AND
SCREENING *IN VITRO***

*V. G. Kostina, L. G. Palchykovska,
M. O. Platonov, O. V. Vasylchenko,
N. A. Lysenko, I. V. Alexeeva*

Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv,
e-mail: L. Palchykovska@ukr.net

S u m m a r y

A number of new hybrid heteroaromatic compounds, consisting of tricyclic fragments (acridone, thioxanthone and phenazine) and bicyclic fragments (benzimidazole, benzothiazole and benzoxazole) were synthesized using the method, developed by the authors. As a result of screening against the transcription model system of the phage T7 DNA-dependent RNA polymerase three effective inhibitors of the RNA syntheses with the IC_{50} value of 8.9, 5.7 and 19.8 μM were detected. To cast light on the mode of interaction between the synthesized compounds and the target, the molecular docking was applied to the model pocket of the phage T7 RNA polymerase transcription complex. It was established that these ligands form networks of H-bonds with residues of the pocket conservative amino acids and π -interaction with the Mg^{2+} ion. A planar geometry of the hybrid molecules, realized due to the intramolecular H-bonds, proved to be an important structural feature, which correlates with an efficacious inhibitory activity.

Key words: hybrid compounds, phenazine, acridone, thioxanthone, bicyclic azoles, synthesis, docking, phage T7 RNA polymerase inhibitors.

1. *Demeunynck M., Charmantray F., Martelli A.* // *Curr. Pharm. Des.* – 2001. – **7**, N 17. – P. 1703–1724.
2. *Goodell J. R., Madhok A. A., Hiasa H. et al.* // *Bioorg. Med. Chem.* – 2006. – **14**, N 16. – P. 5467–5480.
3. *Bretner M., Baier A., Kopanska K. et al.* // *Antivir. Chem. Chemother.* – 2005. – **16**, N 5. – P. 315–326.
4. *Cholody W. M., Hernandez L., Hassner L. et al.* // *J. Med. Chem.* – 1995 – **38**, N 16. – P. 3043–3052.
5. *Stankiewicz-Drogoń A., Palchykovska L. G., Kostina V. G. et al.* // *Bioorg. Med. Chem.* – 2008. – **16**, N 19. – P. 8846–8852.
6. Пальчиковська Л. Г., Рибалко С. Л., Римар С. Ю. та ін. // *Лабор. діагностика.* – 2010. – **3**, № 53. – С. 31–36.
7. Загородня С. Д., Нестерова Н. В., Головань А. В. и др. // *Мікробіол. журн.* – 2011. – **73**, № 6. – С. 47–54.
8. Пальчиковська Л. Г., Платонов М. О., Алексеева І. В., Швед А. Д. // *Біополімери і клітина.* – 2003. – **19**, № 3. – С. 281–286.
9. Пальчиковська Л. Г., Васильченко О. В., Платонов М. О. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2011. – **83**, № 2. – С. 65–72.
10. *McMartin C., Bohacek R. J.* // *Comput.-Aided Mol. Des.* – 1997. – **11**, N 4. – P. 333–344.
11. *Temiaikov D., Patlan V., Anikin M.* // *Cell.* – 2004. – **116**, N 3. – P. 381–391.
12. Пальчиковська Л. Г., Алексеева І. В., Костіна В. Г. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – **80**, № 3. – С. 142–146.
13. *Rope M., Isensee R. W., Joseph L.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 1952. – **74**, N 4 – P. 1095–1096.
14. *Hein D. W., Alheim R. J., Leavitt J. J.* // *Ibid.* – 1957. – **79**, N 2. – P. 427–429.
15. *Uesugi M.* // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* – 2004. – **7**, N 7. – P. 653–659 .
16. *Delarue M., Poch O., Tordo N. et al.* // *Protein Eng.* – 1990. – **3**, N 6. – P. 461–467.
17. *Tunitskaya V. L., Kochetkov S. N.* // *Biochemistry (Mosc).* – 2002. – **67**, № 10. – P. 1124–1135.
18. *Русакова Е. Е., Туницкая В. Л., Кочетков С. Н.* // *Мол. биология.* – 1999. – **33**, № 3. – С. 353–367.
19. Пальчиковська Л. Г., Алексеева І. В., Платонов М. О. та ін. // *Біополімери і клітина.* – 2009. – **25**, № 6. – С. 491–499
20. *De Logu A., Palchykovska L. G., Kostina V. G. et al.* // *Antimicrob. Agents.* – 2009. – **33**, N 3. – P. 223–229.

Отримано 12.04. 2012