

## КОНСТРУЮВАННЯ ІНГІБІТОРІВ ТРАНСКРИПЦІЇ НА ОСНОВІ N-АРИЛАМІДІВ 9-МЕТИЛ- ТА 9-МЕТОКСИФЕНАЗИН-1-КАРБОНОВИХ КИСЛОТ

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

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;  
e-mail: L.Palchykovska@imbg.org.ua

Розроблено зручний метод синтезу і одержано дві серії N-ариламідів 9-метил- та 9-метоксифеназин-1-карбонових кислот. На моделі каталітичної кишені транскрипційного комплексу РНК-полімерази бактеріофага T7 (РНКП T7) методом молекулярного докінгу показано спосіб взаємодії синтезованих сполук із мішенню (рецептором). Визначено ключові міжмолекулярні зв'язки ліганд–рецептор. Вони реалізуються за рахунок різних типів нековалентних взаємодій з низкою консервативних амінокислотних залишків, що беруть участь у впізнаванні вхідного нуклеотиду, каталітичному акті синтезу РНК, а також у стабілізації РНК:ДНК гібриду на ранніх стадіях транскрипції. *In silico* одержані дані свідчать про достатню афінність лігандів до рецептора і дозволяють спрогнозувати їхню здатність інгібувати функціонування транскрипційного комплексу РНКП T7, що узгоджується з попередніми експериментальними результатами. Первинне тестування в модельній транскрипційній системі РНКП T7 демонструє достовірне пригнічення синтезу РНК *in vitro* досліджуваними сполуками у концентрації 25 мкг/мл (~80 мкМ).

**Ключові слова:** N-ариламіди 9-метил- та 9-метоксифеназин-1-карбонових кислот, молекулярний докінг, РНК-полімераза T7, рецептор.

Як відомо, заміщення «пері-положення» феназинового гетероциклу (тобто положення сусіднього з атомом азоту) є важливим для прояву біологічної активності похідних феназин-1-карбонової кислоти (ФКК-1). Антибіотик ломофунгін – ефір полізаміщеної ФКК-1 із гідроксильною групою в положенні 9 належить до препаратів широкого спектра антимікробної дії [1]. У роботах Denny W. A. показано, що для N-алкіламідів монозаміщеної ФКК-1 природа замісника в положенні 9 суттєво відбивається на рівні їхньої протипухлинної активності [2, 3]. Наразі, для низки феніламідів незаміщеної ФКК-1, синтезованих авторами, визначено досить широкий спектр антимікробної дії по відношенню до грампозитивних бактерій [4, 5]. Спираючись на наведене вище, можна очікувати, що введення замісників у положення 9 гетероциклу ФКК-1 позначиться на біологічній активності N-ариламідів відповідних кислот.

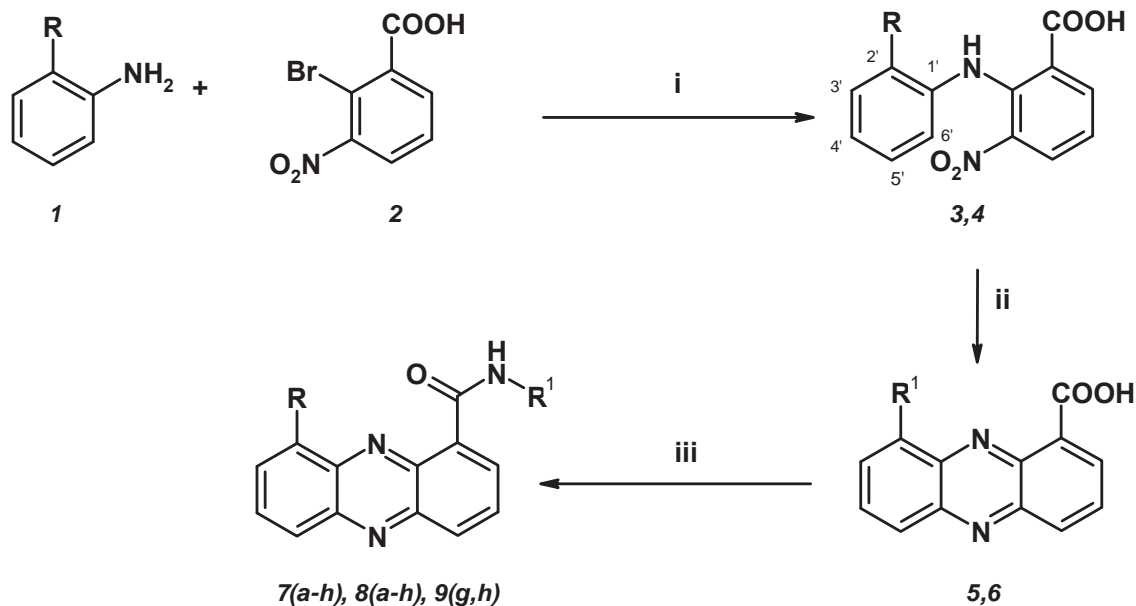
З літератури відомо, що механізм біологічної дії наведених сполук пов'язують із пригніченням функціонування ензимів системи біосинтезу нуклеїнових кислот, зокрема

ДНК-залежних РНК-полімераз та топоізомераз I/II [1–5].

Метою роботи є спрямований синтез нових серій N-ариламідів 9-метил- та 9-метоксифеназин-1-карбонових кислот, моделювання методом молекулярного докінгу способу взаємодії синтезованих сполук з каталітичною кишенню транскрипційного комплексу РНКП T7 і визначення ключових зв'язків між лігандом та амінокислотними залишками рецептора. Слід зазначити, що модельна система транскрипції РНКП T7 успішно використовувалася авторами для виявлення ефективних інгібіторів транскрипції – антимікробних та/або антивірусних агентів [4, 6, 7].

### Матеріали і методи

У роботі використано реагенти та розчинники фірми Хімлаборреактив (Україна) та Sigma (США). Очищення і абсолютування розчинників проведено за стандартною методикою. 9-Заміщені ФКК-1 одержано методом [8] (схема 1). N-Ариламіди 9-заміщених ФКК-1 синтезовано способом, описаним у роботі [5].



де R = OCH<sub>3</sub> (1, 3, 5, 7); CH<sub>3</sub> (1, 4, 6, 8); H (9).

R<sup>1</sup> =

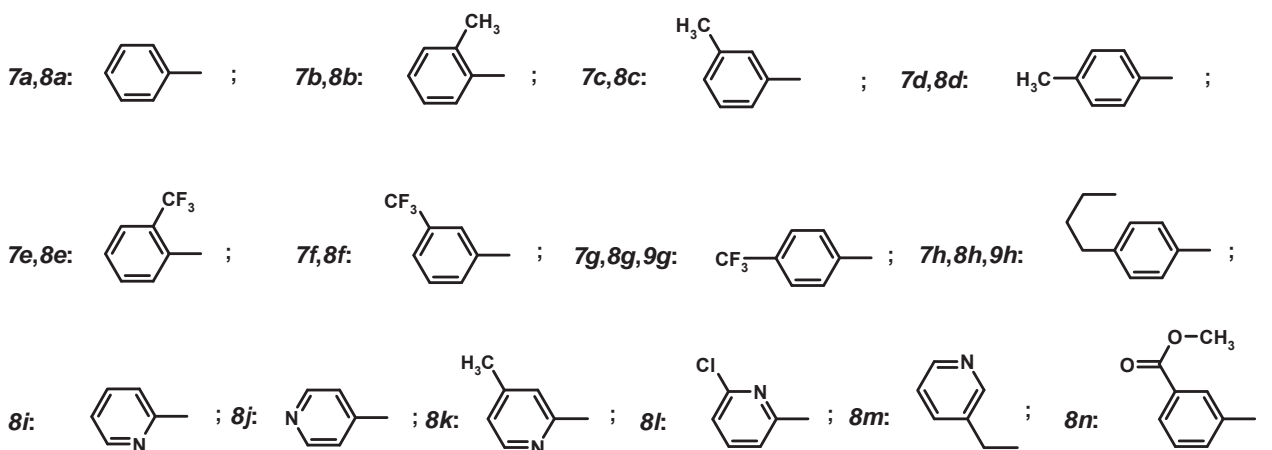


Схема 1. Реагенти та умови: i – а) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Cu, ДМФА; б) HCl; ii – а) EtOH, EtONa, NaBH<sub>4</sub>, кип; б) HCl; iii – а) PhCH<sub>3</sub>, SOCl<sub>2</sub>, Py, 40 °C, 1 год; б) амін, 60 °C, 3 год

Перебіг реакцій та чистоту синтезованих сполук контролювали тонкошаровою хроматографією (ТШХ) на платівках Merck (Німеччина) у системі розчинників хлороформ : метанол (9 : 1), (1 : 1) або н-бутанол : оцтова кислота : вода (5 : 3 : 2).

Спектри <sup>1</sup>H ЯМР синтезованих речовин реєстрували на спектрометрі «Mercury-400» (Varian, США) в DMSO-d<sub>6</sub> із використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту. Температуру плавлення сполук визначали на приладі Боетіуса (Німеччина).

Процедура докінгу ліганду в модельний рецептор. Усі розрахунки, у тому числі і оптимізацію геометрії лігандів, здійснювали за допомогою пакету програм QXP /Flo+, розробленого McMartin та ін. [9]. Докінг проводили з використанням гнучкого ліганду та фіксованої моделі рецептора, застосовуючи алгоритм систематичного докінгу (SDOCK+), який демонструє задовільну здатність відтворювання конформації лігандів із мінімальним показником середньо-квадратичного відхилення (RMSD) відносно кристалографічних да-

них [10]. Максимальне число кроків розрахунку комплексу ліганд–рецептор – 300. Виходячи із внутрішніх скоринг-функцій QXR, для подальшого аналізу, фільтрування та вивчення зберігалися 20 найкращих комплексів. Модель рецептора сформовано, спираючись на рентгеноструктурні дані для транскрипційного комплексу РНКП Т7–ДНК, що відображає фазу впізнавання вхідного нуклеотиду (PDB X-Ray code: 1SOV) [11]. Під час створення моделі активного сайту враховували амінокислотні залишки в радіусі 0,1 нм навколо природного субстрату. Виявлення будь-якого атома амінокислотного залишку в цій сфері дозволяло залучити останній та двох його сусідів до розрахункової моделі. До моделі активного сайту включалися амінокислотні залишки, що беруть участь як у впізнаванні та зв'язуванні субстрату, так і ті, що забезпечують функціонування полімерази.

### Результати та обговорення

Нами одержано дві серії нових N-ариламідів 9-заміщених ФКК-1. 9-Метил- та 9-метокси-ФКК-1 синтезовано найживанішим методом [8], за яким формування феназинового циклу здійснювали поетапно, як показано на схемі 1. Спочатку одержали необхідні вихідні сполуки – N-(2-метилфеніл)- та N-(2-метоксифеніл)-3-нітроантранілові кислоти (3,4) – з достатньо високими виходами – 95 та 74% відповідно. На наступному етапі проводили внутрішньомолекулярну конденсацію арилпохідних нітроантранілових кислот у спиртовому розчині етилату натрію у присутності  $\text{NaBH}_4$ . За нашими спостереженнями на задовільний перебіг циклізації, окрім відомих факторів (ефективного відновлення нітрогрупи та активування водневого атому в положенні 6'), вірогідно впливає природа замісника у 2' положенні. Тому вихід цільової 9-метокси-ФКК-1 (52%) виявився дещо вищим порівняно з 9-метил-ФКК-1 (45%).

Цільові 9-заміщені ФКК-1 одержано із задовільним виходом, що дозволило обрати застосований метод циклізації як препаративний для подальших синтезів, враховуючи доступність вихідних сполук.

N-Ариламиди 9-заміщених феназин-1-карбонових кислот (7a-h, 8a-n) синтезовано через стадію утворення відповідних хлорангідридів за описаною методикою [5].

Одержані сполуки – дрібнокристалічні, забарвлені речовини з високими температурами плавлення. Більшість із них обмежено розчинні у воді та спирті, добре розчиняються у ДМСО та ДМФА.

У спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР карбоксамідів феназинів простежується характеристична закономірність значного зсуву синглету амідного протону в слабке поле. Для N-ариламідів ФКК-1 положення відповідних сигналів NH-протону спостерігається в межах 12,03 – 13,46 м.д., для N-ариламідів 9-метил-ФКК-1 – 11,08 – 13,51 м.д., а для таких 9-метокси – ФКК-1 – 12,67 – 14,02 м.д. Такий феномен пояснюється схильністю цих сполук до утворення внутрішньомолекулярного водневого зв'язку між амідним протоном та циклічним атомом азоту феназинового ядра. Слід зауважити, що зсув сигналу амідного протону в слабке поле є результатом сукупного впливу замісників як корового гетероциклу, так і карбоксамідного фрагмента.

### Моделювання способу взаємодії N-ариламідів 9-заміщених ФКК-1 з рецептором.

Для з'ясування можливого способу взаємодії синтезованих 9-метил- та 9-метоксифеназин-1-карбоксамідів з моделлю рецептора 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.

Вибрана ділянка каталітичної кишені радіусом 0,1 нм містила 12 амінокислотних залишків: Arg423, Arg425, Tyr426, Asp537 Cys540, Ser541, Met635, Tyr639, His784, Ile810, His811 і Asp812, які можуть бути відповідальними за зв'язування ліганду з рецептором. Більшість з них належать до функціонально важливих консервативних мотивів РНКП Т7 – **A**, **B**, **C**, розташованих у субдоменах «долоня» та «пальці» [12]. У виділеному об'ємі каталітичної кишені знаходиться вхід до вузького «тунелю», утвореного  $\alpha$ -спіраллю рухливого субдомени «пальці». На межі двох доменів  $\alpha$ -спіраль містить консервативний мотив DXXGR [13], який зберігається в багатьох ДНК-залежних РНК полімераз. Його функція полягає у стабілізації РНК–ДНК гібриду на ранніх стадіях ініціації транскрипції [13].

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

Одним із цікавих своєю структурою представників синтезованих сполук виявився ліганд **8l** із серії 9-метилфеназин-1-карбоксамідів. Як видно з рис. 1 (A), циклічний атом азоту амідного фрагмента **8l**

утворює інваріантний зв'язок з іоном 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 **8l** у мішені. Це припущення підтверджується наявністю другої енергетично вигідної конформації того самого ліганду (рис. 1, **Б**), за якої зберігається конфігурація утримання амідного фрагмента, а феназинове ядро має іншу позицію відносно партнерів амінокислотного оточення.

Лише в одному із 10 енергетично найвигідніших комплексів реалізується водневий зв'язок між іміногрупою Gly542 та атомом кисню амідного ланцюжка ліганду O...HN, при цьому амідний фрагмент додатково фіксується Cys540 поблизу описаного вище «тунелю». Зважаючи на конформаційну мінливість ФКК-ариламідів, існує можливість утворення так званих «складених структур» [16], у яких для найвірогідніших комплексів 9-метилзамісник наближений до атома хлору піридинового ядра, компактизуючи молекулу. В обох представлених конформаціях ліганду **8l** реалізуються водневі зв'язки ендочиклічного атома азоту феназину N5...HN гуанідинової групи Arg425 та/або N5...HN1 His784. При цьому Н-зв'язок з Arg425 утворюється незалежно від положення корового гетероциклу в кишені. Феназинове ядро утримується також  $\pi$ -стекин

взаємодією із другим іоном Mg<sup>2+</sup>, який контролюється Tyr639. Таким чином, ліганд **8l** взаємодіє з вісьмома залишками амінокислот вибраної ділянки каталітичної кишені, що може істотно гальмувати конформаційну рухливість транскрипційного комплексу, порушуючи тим самим синтез РНК.

Одержані теоретичні дані дають підстави прогнозувати пригнічення лігандом **8l** транскрипції *in vitro*, яка здійснюється РНКП Т7.

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 *para*-трифторметилфеніламіди обох 9-заміснених та незаміщеної за ядром ФКК-1 (**7g**, **8g** та **9g**), друга – *para*-бутилфеніламіди тих самих кислот (**7h**, **8h** та **9h**).

Із рис. 2 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.

Логічним є заповнення 9-замісником об'єму гідрофобної кишені поблизу Cys540, 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 His784 та  $\pi$ -стекин-взаємодією з іоном Mg<sup>2+</sup>, який контролюється Tyr639. Іншим зв'язком,

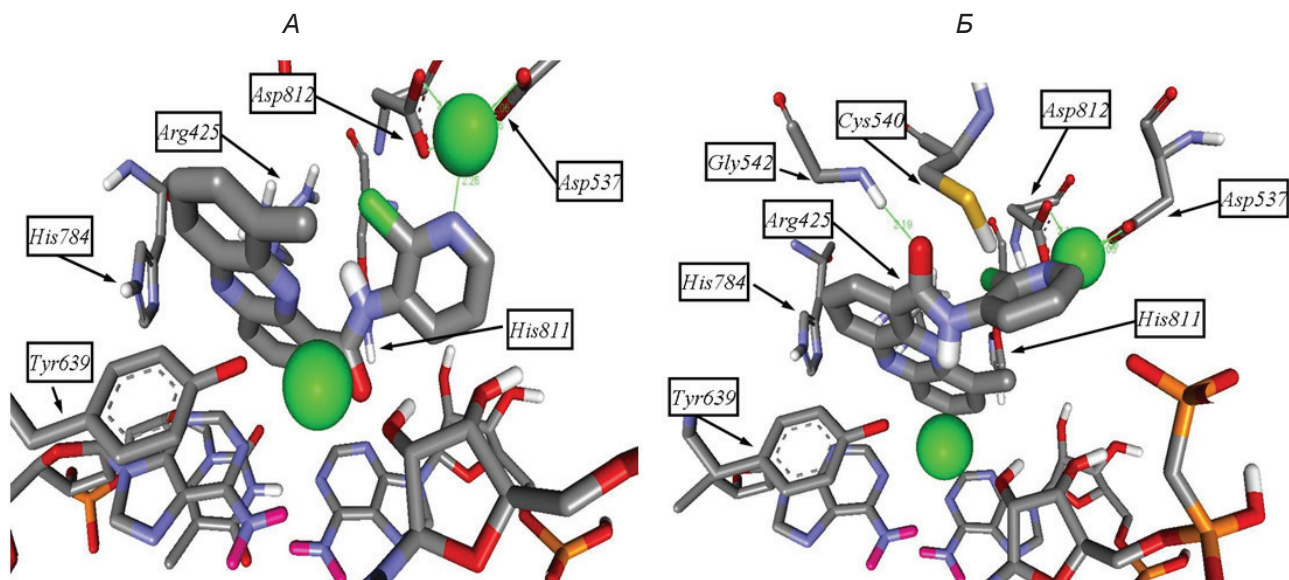


Рис. 1 Розміщення сполуки **8l** у моделі активного сайту РНКП Т7 для конформацій А і Б (дані одержано методом молекулярного докінгу)

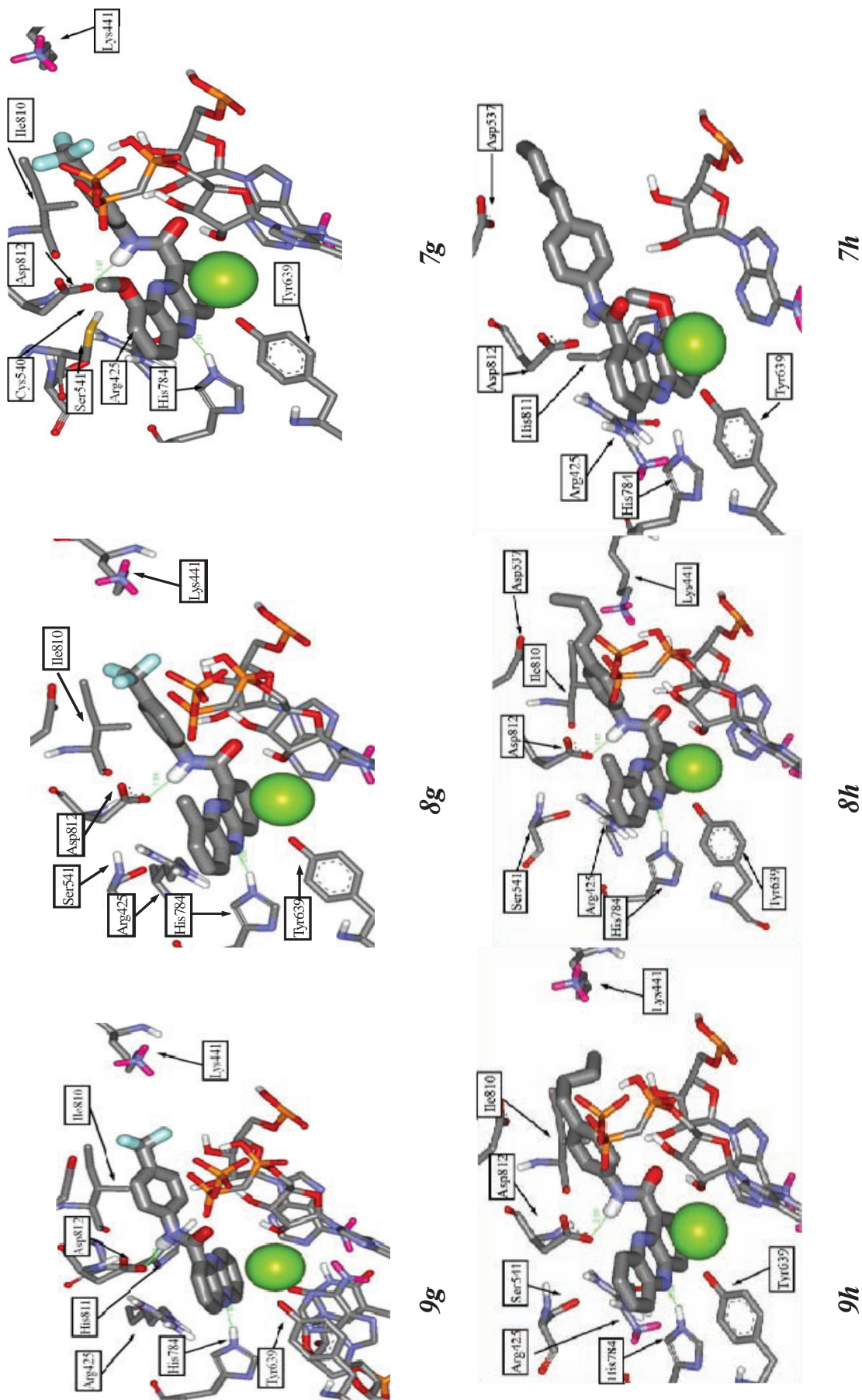


Рис. 2. Розташування енергетично найвідповідніших конформацій лігандів у моделі транскрипційного комплексу РНКП Т7 та їхні ключеві кон-  
такти, одержані за розрахунками

присутнім у всіх шістьох структурах, є водневий зв'язок амідного протону з карбонільною групою Asp812. Ліганди з низки N-(4-трифторметилфеніл)амідів (*7g*, *8g*) та низки N-(4-бутилфеніл)амідів (*7h*, *8h*) 9-заміщених ФКК-1 додатково стабілізують комплекс, заповнюючи залишковий об'єм каталітичної кишені, обмежений залишками полярного Lys441 та неполярного Ile810. Крім того, всі без винятку описані структури взаємодіють за рахунок  $\pi$ -стекингу з останнім, приєднаним до РНК, нуклеотидом.

Загалом, усі досліджені сполуки мають подібний тип взаємодії з мішенню. Ліганди заповнюють простір, необхідний для впізнання 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. 1 представлено основні параметри, які характеризують 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. Найслабшим інгібітором, з-поміж представлених має бути сполука *8l*. Всі інші сполуки за вищезазначеними показниками можуть характе-

ризуватися дещо вищою та близькою за значенням інгібіторною дією. За результатами попереднього тестування у модельній системі транскрипції (РНКП Т7) усі сім сполук у концентрації 25 мкг/мл (~ 80 мкМ) виявили достовірне пригнічення синтезу РНК.

Результати біологічних експериментів у модельному транскрипційному комплексі РНКП Т7 на бактеріальних і вірусних моделях будуть докладно представлені в наступній публікації.

**Загальна методика одержання N-арил-3-нітроантранілових кислот (3,4).** До розчину 2,47 г (10 ммоль) 2-бром-3-нітробензойної кислоти (*2*) [15] у 10 мл ДМФА додають по чергово 2,76 г свіжопрокаленого поташу, а після виділення CO<sub>2</sub> – 64 мг дрібнодисперсної міді та 12,5 ммоль відповідного аміну (*1*). Реакційну суміш гріють з перемішуванням протягом декількох годин (від однієї до трьох), оцінюючи перебіг процесу за інтенсивністю газоутворення. Після завершення виділення CO<sub>2</sub> розчин виливають у воду (150 мл) і фільтрують. Фільтрат підкислюють 10%-й HCl до рН 2, осад, що утворюється, фільтрують та промивають водою (3 x 50 мл). Одержані сполуки (*3,4*) кристалізують з етанолу.

**2-(2-Метоксифеніламіно)-3-нітробензойна кислота (3).** Вихід 2,73 г (95%), T<sub>пл</sub> = 228–229 °С, (літ. 227–228 °С [3]), <sup>1</sup>H ЯМР: 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, COOH).

**2-(2-Метилфеніламіно)-3-нітробензойна кислота (4).** Вихід 2,07 г (76%), T<sub>пл</sub> = 197–200 °С, (літ. 196–199 °С [3]), <sup>1</sup>H ЯМР: 2,35 с (3H), 6,72 т (1H), 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, COOH).

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

Ліганд	Енергія, кДж/моль			
	pI*	FreE	Cntc	Hbnd
<i>8l</i> (A)	2,5	-14,5	-69,5	-1,3
<i>8l</i> (B)	1,6	-9,0	-69,0	-1,2
<i>7g</i>	4,4	-24,9	-69,4	-3,8
<i>8g</i>	4,4	-25,0	-66,4	-3,9
<i>9g</i>	4,2	-24,2	-69,5	-4,1
<i>7h</i>	3,9	-22,5	-70,2	-4,2
<i>8h</i>	4,1	-23,2	-68,0	-4,1
<i>9h</i>	4,1	-23,4	-69,2	-3,8

Примітка. \* pI (-log K<sub>i</sub>) – зворотний логарифм константи інгібування

**Загальна методика синтезу 9-заміщених феназин-1-карбонових кислот (5,6).** 0,01 моль N-арил-3-нітроантранілової кислоти (3,4) суспендують у розчині етилату натрію (5 г Na/50 мл абсолютного етанолу), додають 1,52 г боргідриду натрію і кип'яють за енергійного перемішування (зі зворотним холодильником та хлоркальцієвою трубкою) протягом 8 год. Реакційну суміш охолоджують, виливають у 250 мл води та обережно підкислюють 10%-ою соляною кислотою до рН 2. Осад, що утворився, фільтрують, на фільтрі тричі промивають водою, сушать та кристалізують з ДМФА.

**9-Метоксифеназин-1-карбонова кислота (5).** Вихід 1,32 г (52%),  $T_{пл} = 265-267\text{ }^{\circ}\text{C}$  (літ.  $262-265\text{ }^{\circ}\text{C}$  [3]),  $^1\text{H ЯМР}$ : 4,18 с (3H), 7,41 д (1H), 7,84 д (1H), 7,96 т (1H), 8,14 т (1H), 8,49 д (1H), 8,77 д (1H), 15,0 с (1H, COOH).

**9-Метилфеназин-1-карбонова кислота (6).** Вихід 1,07 г (45%),  $T_{пл} = 239-241\text{ }^{\circ}\text{C}$  (літ.  $237-238\text{ }^{\circ}\text{C}$  [3]),  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**Загальна методика одержання N-ариламідів 9-метил- та 9-метоксифеназин-1-карбонових кислот (7a-h та 8a-n).** Суспендують 1,0 ммоль 9-заміщеної ФКК-1 (5,6) у 30 мл толуолу, додають 1,5 ммоль (0,11 мл) хлористого тіонілу та 1,5 ммоль піридину і гріють при температурі  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 1 год. Після чого розчин охолоджують до кімнатної температури та додають 1,1 ммоль відповідного аміну і нагрівають суміш при температурі  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 3 год. Толуол відганяють під зниженим тиском, залишок заливають 50 мл води, осад, що утворився, відфільтровують та кристалізують із суміші n-бутанол – ДМСО (19 : 1).

**9-Метоксифеназин-1-карбоної кислоти феніламід (7a).** Вихід (53%),  $T_{пл} = 222-223\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метоксифеназин-1-карбоної кислоти о-толіламід (7b).** Вихід (63%),  $T_{пл} = 178-179\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метоксифеназин-1-карбоної кислоти м-толіламід (7c).** Вихід (87%),  $T_{пл} = 201-202\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метоксифеназин-1-карбоної кислоти п-толіламід (7d).** Вихід (69%),  $T_{пл} = 213-215\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 2,41 с (3H), 4,26 с (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).

**9-Метоксифеназин-1-карбоної кислоти (2-трифторметилфеніл)амід (7e).** Вихід (60%),  $T_{пл} = 239-241\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метоксифеназин-1-карбоної кислоти (3-трифторметилфеніл)амід (7f).** Вихід (68%),  $T_{пл} = 232-234\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метоксифеназин-1-карбоної кислоти (4-трифторметилфеніл)амід (7g).** Вихід (61%),  $T_{пл} = 258-261\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метоксифеназин-1-карбоної кислоти (4-бутилфеніл)амід (7h).** Вихід (74%),  $T_{пл} = 185-187\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метилфеназин-1-карбоної кислоти феніламід (8a).** Вихід (50%),  $T_{пл} = 203-205\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метилфеназин-1-карбоної кислоти о-толіламід (8b).** Вихід (55%),  $T_{пл} = 223-225\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метилфеназин-1-карбоної кислоти м-толіламід (8c).** Вихід (65%),  $T_{пл} = 169-171\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метилфеназин-1-карбоної кислоти п-толіламід (8d).** Вихід (58%),  $T_{пл} = 216-219\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метилфеназин-1-карбоної кислоти (2-трифторметилфеніл)амід (8e).** Вихід (20%),  $T_{пл} = 174-176\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метилфеназин-1-карбоної кислоти (3-трифторметилфеніл)амід (8f).** Вихід (34%),  $T_{пл} = 195-198\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метилфеназин-1-карбоної кислоти (4-трифторметилфеніл)амід (8g).** Вихід (57%),  $T_{пл} = 230-231\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H ЯМР}$ : 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).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти (4-бутилфеніл)амід (8h).** Вихід (68%),  $T_{пл} = 140-141$  °С.  $^1H$  ЯМР: 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).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти піридин-2-іламід (8i).** Вихід (15%),  $T_{пл} = 186-188$  °С.  $^1H$  ЯМР: 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).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти піридин-4-іламід (8j).** Вихід (18%),  $T_{пл} = 228-231$  °С.  $^1H$  ЯМР: 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).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти (4-метилпіридин-2-іл)амід (8k).** Вихід (29%),  $T_{пл} = 189-191$  °С.  $^1H$  ЯМР: 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).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти (2-хлорпіридин-3-іл)амід (8l).** Вихід (48%),  $T_{пл} = 264-266$  °С.  $^1H$  ЯМР: 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).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти (піридин-3-іл-метил)амід (8m).** Вихід (14%),  $T_{пл} = 211-214$  °С.  $^1H$  ЯМР: 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).

**9-Метилфеназин-1-карбонової кислоти (3-метилкарбоксифеніл)амід (8n).** Вихід (19%),  $T_{пл} = 167-169$  °С.  $^1H$  ЯМР: 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).

**Феназин-1-карбонової кислоти (4-трифторметилфеніл)амід (9g).** Одержано за вищенаведеною методикою з ФКК-1 та *para*-трифторметиланіліном. Вихід (64%),  $T_{пл} = 222-223$  °С.  $^1H$  ЯМР: 7,76 с (1H), 8,01 м (3H), 8,11 м (3H), 8,29 д (2H), 8,42 д (1H), 8,63 д (1H), 12,55 с (1H, NH).

**Феназин-1-карбонової кислоти (4-бутилфеніл)амід (9h).** Одержано за вищезазначеною методикою з ФКК-1 та *para*-

бутиланіліном. Вихід (60%),  $T_{пл} = 167-168$  °С.  $^1H$  ЯМР: 0,95 т (3H), 1,37 м (2H), 1,62 м (2H), 2,61 т (2H), 7,19 д (2H), 7,81 д (2H), 8,01 м (2H), 8,27 д (2H), 8,40 т (1H), 8,83 д (1H), 12,80 с (1H, NH).

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ НА ОСНОВЕ N-АРИЛАМИДОВ 9-МЕТИЛ- И 9-МЕТОКСИФЕНАЗИН-1-КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

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

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев; e-mail: L.Palchykovska@imbg.org.ua

Разработан удобный метод синтеза и получены две серии N-ариламидов 9-метил- и 9-метоксифеназин-1-карбоновых кислот. На модели каталитического кармана транскрипционного комплекса РНК-полимеразы Т7 методом молекулярного докинга показан способ взаимодействия синтезированных соединений с мишенью (рецептором). Определены ключевые межмолекулярные связи лиганд – рецептор. Они осуществляются различными типами нековалентных взаимодействий с рядом остатков консервативных аминокислот, участвующих в узнавании входящего нуклеотида, каталитическом акте синтеза РНК, а также стабилизации гибрида РНК–ДНК на ранних стадиях транскрипции. *In silico* полученные данные свидетельствуют о достаточной аффинности лигандов к рецептору и позволяют прогнозировать их способность ингибировать функционирование транскрипционного комплекса РНКП Т7, что согласуется с предварительными экспериментальными результатами. Первичное тестирование в модельной транскрипционной системе РНКП Т7 демонстрирует достоверное ингибирование синтеза РНК *in vitro* исследуемыми соединениями в концентрации 25 мкг/мл (~80 мкМ).

**Ключевые слова:** N-ариламиды 9-метил- и 9-метоксифеназин-1-карбоновых кислот, молекулярный докинг, РНК полимеразы-Т7, рецептор.



**DESIGN OF TRANSCRIPTION  
INHIBITORS ON THE BASIS OF  
N-ARYLAMIDES OF 9-METHYL-  
AND 9-METHOXYPHENAZINE-1-  
CARBOXYLIC ACIDS**

*L. G. Palchykovska, O. V. Vasylychenko,  
M. O. Platonov, V. G. Kostina, N. A. Lysenko,  
I. V. Alexeeva, D. M. Hovorun, A. D. Shved*

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

**S u m m a r y**

A convenient method of synthesis was developed and two series of N-arylamides of 9-methyl- and 9-methoxyphenazine-1-carboxylic acids were obtained. By the molecular docking method the mode of the synthesized compounds interaction with catalytic pocket of the RNA polymerase T7 transcription complex was simulated. Key ligand-receptor intermolecular contacts were identified. They are realized by various types of non-covalent interactions with line of conservative amino acid residues involved in recognition of incoming nucleotide, catalytic act of RNA synthesis as well as in stabilizing the RNA–DNA hybrid at early steps of transcription. *In silico* data indicate sufficient affinity of ligands for the receptor and allow to predict their ability to inhibit the functioning of RNA polymerase T7 transcription complex that is consistent with preliminary experimental results. Initial testing in a model RNA polymerase T7 transcription system demonstrates significant inhibition of *in vitro* RNA synthesis by investigated compounds at a concentration of 25 µg/ml (~80 µM).

**Key words:** N-arylamides of 9-methyl- and 9-methoxyphenazine-1- carboxylic acids, molecular docking, RNA polymerase T7, receptor.

1. *Cano F. R., Kuo S. C., Lampen J. O. // Antimicrobial. Agents Chemother. – 1973. – 3, N 6. – P. 723–728.*

2. *Rewcastle G. W., Denny W. A., Baguley B. C. // J. Med. Chem. – 1987. – 30, N 5. – P. 843–851.*
3. *Gamage S. A., Rewcastle G. W., Baguley B. C. et al. // Bioorg. Med. Chem. – 2006. – 14, N 4. – P. 1160–1168.*
4. *Пальчиковська Л. Г., Алексєєва І. В., Костина В. Г. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2008. – 80, № 3. – P. 140–147.*
5. *De Logu A., Palchykovska L. G., Kostina V. G. et al. // Antimicrob. Agents. – 2009. – 33, N 3. – P. 223–229.*
6. *Пальчиковська Л. Г., Рибалко С. Л., Румар С. Ю. та ін. // Лаб. діагностика. – 2010. – № 3(53). – С. 31–36.*
7. *Palchykovska L. G., Alexeeva I. V., Negruttska V. V. et al. // Biopolim. Cell. – 2010. – 26, N 6. – P. 508–511.*
8. *Challand S. R., Herbert R. B., Holliman F. G. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. – 1970. – P. 1423–1425.*
9. *McMartin C., Bohacek R. J. // Comput.-Aided Mol. Des. – 1997. – 11. – P. 333–344.*
10. *Warren G. L., Andrews C. W., Capelli A. M. et al. // J. Med. Chem. – 2006. – 49, N 20. – P. 5912–5931.*
11. *Temiaikov D., Patlan V., Anikin. et al. // Cell. – 2004. – 116, N 3. – P. 381–391.*
12. *Osumi-Davis P. A., de Aguilera M. C., Woody R. W., Woody A. Y. // J. Mol. Biol. – 1992. – 226. – P. 37–45.*
13. *Sousa R. // Trends Biochem. Sci. – 1996. – 21. – P. 186–190.*
14. *Imburgio D., Anikin M., McAllister W. T. // J. Mol. Biol. – 2002. – 319, N 1. – P. 37–51.*
15. *Culhane P. J. Organic Syntheses. – Wiley: New York, 1944. – Collect. 1, P. 125.*
16. *Пальчиковська Л. Г., Платонов М. О., Алексєєва І. В., Швед А. Д. // Біополімери і клітина. – 2003. – 19, № 3. – С. 281–286.*

Отримано 29.10.2010