ISSN 0233–7657. Biopolymers and Cell. 2012. Vol. 28. N 6. P. 477–485 doi 10.7124/bc.00013A

UDC 547.836 + 543.422 + 577.15

Оцінка протибактерійної та противірусної активності N-ариламідів 9-заміщених феназин-1-карбонових кислот – інгібіторів модельної транскрипції фага Т7

Л. І. Пальчиковська[1], О. В. Васильченко[1], М. О. Платонов[1], В. Г. Костіна[1], М. М. Бабкіна[2], О. А. Тарасов[2], Д. Б. Старосила[3], С. П. Самійленко[1], С. Л. Рибалко[3], О. М. Дерябин[2], Д. М. Говорун[1]

[1]Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

[2]Інститут ветеринарної медицини УААН
Вул. Донецька, 30, Київ, Україна, 03151

[3]ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України»
Вул. Амосова, 5, Київ, Україна, 03038

L.Palchykovska@imbg.org.ua

Мета. *Пошук серед N-ариламідів 9-заміщених феназин-1-карбонових кислот (ФКК-1) – інгібіторів синтезу РНК – сполук з антибактерійними та антивірусними властивостями.* ***Методи***. *Вплив N-ариламідів на синтез РНК in vitro визначали із застосуванням модельної системи ДНК-залежної РНК-полімерази бактеріофага Т7; антимікробну активність N-ариламідів – методом дворазових розведень у рідкому середовищі проти бактерій Erysipelothrix rhusiopathiae VR-2 var. IVM, Klebsiella spp. та Escherichia coli ATCC25922. Антивірусну дію щодо вірусу бичачої вірусної діареї (ВБВД) і цитотоксичність N-ариламідів оцінювали на перещеплюваній лінії культури клітин нирки теляти.* ***Результати***. *Двадцять N-ариламідів виявилися ефективними інгібіторами синтезу РНК у межах концентрацій 0,48–63 мкМ. Найвищу активність продемонструвала сполука* ***16****, IC_{50} якої становить 0,48 мкМ. Антибактерійні властивості стосовно грампозитивних і грамнегативних бактерій проявили 14 N-ариламідів при концентраціях 0,1– 10 мкг/мл. Для низки N-ариламідів встановлено множинний характер антибактерійної дії: сім сполук проти двох і дві (2 і 3) – проти трьох досліджуваних бактерій. N-ариламіди* ***16*** *і* ***26*** *виявили високу інгібіторну здатність проти ВБВД з показниками IC_{50} 0,43 і 0,88 мкМ і SI > 160 і 10 відповідно.* ***Висновки***. *Отримані результати дають підставу вважати, що вірогідними мішенями для N-ариламідів 9-заміщених ФКК-1 у бактерій і вірусіможуть бути є їхні РНК-синтезувальні комплекси.*

Ключові слова: N-ариламіди 9-заміщених ФКК-1, модельна система транскрипції фага Т7, антибактерійна активність, антивірусна активність.

Вступ. Виникнення і розповсюдження на кінець XX століття збудників нових небезпечних інфекційних захворювань (ВІЛ, ротавіруси, віруси Ебола та Марбурга, Хантавіруси, SARS, вірус пташиного грипу H5N1 тощо) [1, 2], а також нових штамів відомих мікроорганізмів і вірусів, які набувають резистентності до сучасних клінічних препаратів, стали причиною пошуку нових біологічно активних сполук – потенційних терапевтичних агентів.

З цієї точки зору гетероароматичні трициклічні сполуки, особливо їхні карбонові кислоти та аміди, привертають увагу фармакологів і медичних хіміків як перспективна база для створення бібліотек біологічно активних сполук.

У попередній роботі [3] нами виявлено широкий спектр антибактерійних властивостей N-арил-

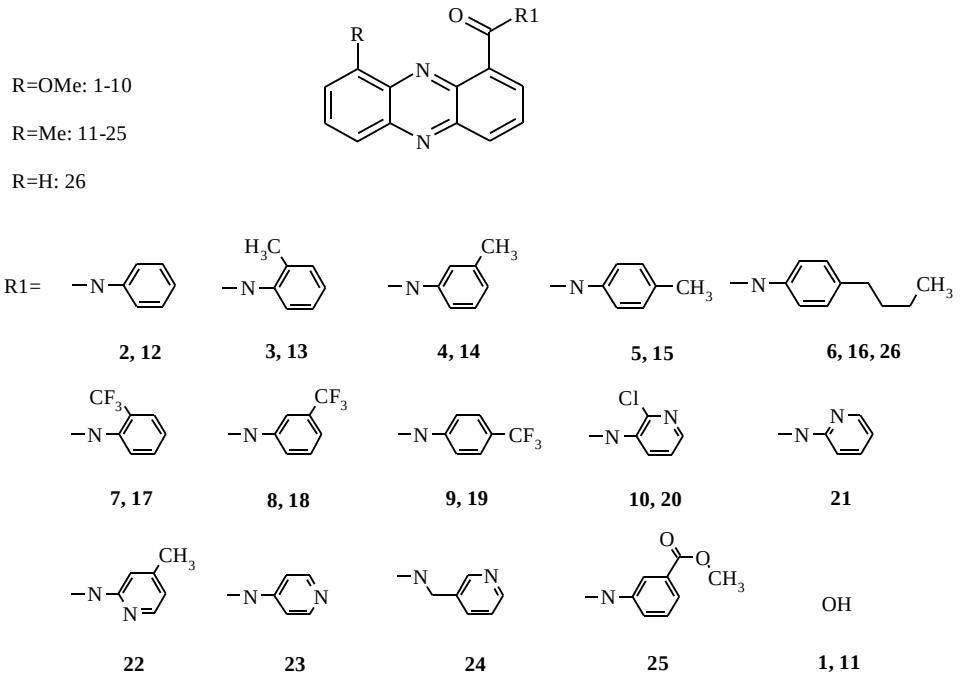


Рис. 1. Структури досліджуваних 9-заміщених амідів ФКК-1

амідів феназин-1-карбонових кислот (ФКК-1). Близько 20 сполук продемонстрували високу протитуберкульозну активність щодо музейних і клінічних штамів *Mycobacterium tuberculosis*. Серед них знайдено також ефективні інгібітори низки грампозитивних бактерій, а саме – *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus* sp. і *Erysipelothrix rhusiopathiae* (колекція Інституту ветеринарної медицини УААН) [4].

Слід зазначити, що присутність карбоксамідного фрагмента зумовлює потенційну конформаційну гнучкість N-ариламідів ФКК-1. Конформаційна мінливість таких сполук сприяє їхньому ефективному стеричному підлаштуванню для взаємодії з «гомологічними» ферментативними мішенями патогенних агентів та/або їхніх резистентних штамів. Цю структурну характеристику важливо враховувати при дизайні інгібіторів з потенційною множинною активністю або інгібіторів-збудників, які легко мутують і швидко набувають резистентності до клінічних препаратів. До речі, саме структурна гнучкість ненуклеозидних інгібіторів зворотної транскриптази HIV *Delavirdine* та *Etravirine* [5–7] є причиною збереження їхньої антивірусної активності щодо резистентних штамів HIV.

Як відомо, заміщення «*nepi*-положення» феназинового гетероциклу (тобто положення, сусіднього з атомом азоту) є важливим для біологічної активності похідних ФКК-1. Так, антибіотик ломофунгін (ефір полізаміщеної ФКК-1 з гідроксильною групою в положенні 9) належить до препаратів широкого спектра антимікробної дії [8]. У роботах [9, 10] показано, що для N-алкіламідів монозаміщеної ФКК-1 природа замісника в положенні 9 суттєво відбивається на рівні їхньої протипухлинної активності.

Беручи до уваги зазначені перспективні характеристики ариламідів ФКК-1, а також те, що заміщення у гетероциклі має вирішальне значення для біологічної активності сполук, нами синтезовано дві нові серії N-ариламідів 9-метил- та 9-метоксифеназин-1-карбонових кислот (рис. 1) [11].

Для феназинових антибіотиків характерним є множинний механізм біологічної дії. Вони легко проникають у бактерійну клітину, де долучаються до окисно-відновлювальних процесів [12, 13], перетворюючись на відносно стабільні аніони, які генерують утворення активних форм кисню (O_2, OH^- і H_2O_2). Це пригнічує функціонування супероксиддисмутази та призводить до індукування окиснювального стресу та загибелі мікроорганізму. Окрім того, планарні ароматичні похідні феназину – антибіотики іодинін, муксин і піоціанін – здатні взаємодіяти з ДНК/РНК [14]. Показано також, що феназинові антибіотики

інгібують ДНК-залежний синтез РНК не лише внаслідок блокування ДНК-матриці через інтеркаляцію, але й завдяки взаємодії з РНК-полімеразою та/або з рибонуклеозид-3'-фосфатами [15–17].

Саме тому для скринінгу синтезованих сполук і селекції інгібіторів синтезу РНК нами обрано просту у застосуванні та продуктивну модельну систему транскрипції на основі ДНК-залежної РНК-полімерази фага Т7 (РНКП Т7). Цю модельну систему нами з успіхом використано для виявлення ефективних інгібіторів транскрипції – антимікробних та/або антивірусних агентів [18–20]. Попереднє тестування ариламідів 9-заміщених ФКК-1 у зазначеній модельній системі продемонструвало достовірне пригнічення синтезу РНК низкою сполук за концентрації 25 мкг/мл (~80 мкМ) [11].

Мета представленої роботи полягала у поглибленому концентраційно залежному дослідженні впливу карбоксамідів 9-заміщених ФКК-1 на синтез РНК для виявлення ефективних інгібіторів транскрипції, вивчення їхніх протимікробних і противірусних властивостей та з'ясування взаємозв'язку структура–активність.

Матеріали і методи. Досліджувані феніламіди ФКК-1 синтезовано авторами за методиками, описаними в роботі [11]. Усі розрахунки, у тому числі і оптимізацію геометрії лігандів, здійснювали за допомогою пакета програм QXP/Flo^{+}. Докінг проводили з використанням гнучкого ліганда та фіксованої моделі рецептора [11].

Для виконання біологічних досліджень сполуки розчиняли в 100 % ДМСО до концентрації стокових розчинів 100 мкг/мл.

Реакція транскрипції in vitro. Вплив синтезованих речовин на синтез РНК перевіряли в системі РНКП Т7 за методикою [5], застосовуючи комерційні реагенти фірми «Fermentas» (Литва). Транскрипцію проводили у 20 мкл реакційної суміші, яка містила 0,5 мкг лінеаризованої плазмідної ДНК *pTZ19R*, 2 мМ рибонуклеозидтрифосфати, 20 од. акт. інгібітора РНКаз RiboLock^{TM} за присутності (у мМ): трис-HCl – 40, pH 7,9, $MgCl_2$ – 6, спермідину – 2, NaCl – 10, DTT – 10 і 12 од. акт. РНК-полімерази фага Т7. Досліджувані речовини розчиняли в ДМСО (1 мг/мл) і додавали до реакційної суміші в кількості 0,5 мкл. Концентрація ДМСО у контрольній і дослідних пробах становила 2,5 %. Реакційну суміш витримували впродовж 45 хв за температури 37 °С і реакцію зупиняли охолодженням (–20 °С).

Продукти реакції детектували гель-електрофорезом в 1,2 %-й агарозі з додаванням бромистого етидію. РНК-транскрипти візуалізували на трансілюмінаторі в УФ-світлі з наступним фотографуванням електрофореграм цифровою фотокамерою.

Інгібіторну активність тест-агентів визначали, порівнюючи кількість одержаного РНК-продукту з контролем (кількість РНК-продукту без додавання інгібітора). Значення IC_{50} (концентрація інгібітора, необхідна для пригнічення ферментативної активності на 50 %) визначили денситометрично, оцінюючи інтенсивність електрофоретичних смуг за допомогою програми Scion Image for Windows, Release Beta 4.0.3.

Мікробіологічні дослідження. У роботі використано штами мікроорганізмів з колекції Інституту ветеринарної медицини УААН *E. rhusiopathiae* VR-2 var. IVM, *Klebsiella* spp. і *Escherichia coli* ATCC 25922. Чисті тест-культури бактерій отримували, висіваючи їх на тверде поживне середовище та надалі інкубуючи протягом 24 год. Колонії мікроорганізмів після мікроскопічного контролю суспендували у фізіологічному розчині до рівня каламутності, що відповідає 0,5 за стандартом McFarland.

Антимікробну активність феніламідів 9-заміщених ФКК-1 вивчали методом дворазових серійних розведень у рідкому поживному середовищі Мюллера-Хінтона та бульйоні ВНІ («BioMeriex», Франція), які готували відповідно до рекомендацій виробника в 96-лункових планшетах [21–23].

У підготовлені стерильні планшети («Sarstedt», ФРН) за асептичних умов вносили 140 мкл середовища, додавали 50 мкл суспензії тест-мікроорганізму у кінцевій концентрації 1 10^7 колонієутворювальних одиниць (КУО) в 1 $см^3$ і 10 мкл тестових речовин (розчинник ДМСО) у відповідних концентраціях та інкубували упродовж 18–24 год за температури 36,7 ± 0,3 °С. Контролем слугували лунки з відповідним рідким середовищем і культурою мікроорганізму, але без тест-агента.

Для контролю токсичності в окремі лунки замість розчину тест-речовин додавали лише ДМСО. Для кожної концентрації окремого зразка і контро-

лю використано по дві лунки. Результати реєстрували візуально за наявністю видимого росту бактерійної культури.

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

Тест на цитотоксичність. Цитотоксичність (CC_{50}) досліджували на моношаровій лінії перещеплюваної культури клітин МДВК (культура клітин нирки теляти), яку попередньо перевіряли методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на наявність контамінації мікоплазмою. Культуру клітин вирощували на поживному середовищі RPMI-1640 «Sigma-Aldrich» (США) з 10 % інактивованої ембріональної сироватки («Fetal Bovine Serum, Heat Inactivated», «Sigma-Aldrich») та антибіотиками пеніциліном і стрептоміцином (по 100 МО/мл) або канаміцином (50 МО/мл) у 96-лункових планшетах фірми «Nunc» (Данія) в атмосфері з 5 % CO_2. Сформований через 24 год моношар клітин у лунках промивали і вносили до них підтримуюче середовище без сироватки, яке містило відповідну концентрацію досліджуваної сполуки. До контрольних лунок додавали підтримуюче середовище з розчинником (ДМСО).

Облік результатів проводили щоденно протягом 120 год (мікроскоп «Leica DMIL», ФРН), спостерігаючи за моношаром культури клітин МДВК – появою або відсутністю дегенерації або ж зміною їхньої морфології. Цитотоксичною концентрацією вважали таку, за якої кількість живих клітин зменшувалася на 50 %.

Противірусну активність препаратів вивчали з використанням вірусу бичачої вірусної діареї (ВБВД), який є типовою сурогатною моделлю для вірусу гепатиту С (ВГС) при дослідженні впливу антивірусних препаратів, оскільки він має подібні до ВГС структурні гени і його можна відтворити *in vitro* [24]. Для визначення ефективної інгібувальної концентрації EC_{50} (найменша концентрація препарату, за якої у 50 % зразків інфікованих клітин знижується інфекційний титр вірусу на 1,75–2,0 $lgID_{50}$) тест-вірус у дозі 100 $ТЦД_{50}$ /0,1 мл вносили в культуру клітин МДВК та інкубували протягом 1 год за температури 37 °С. Після адсорбції вірусу на клітинах через 1 год його видаляли і клітини відмивали поживним середовищем. Надалі у підтримуюче середовище (RPMS-1640 + 2 % фетальної сироватки) вносили препарати в різних концентраціях. Репродукцію вірусу визначали за спеціальною цитопатогенною дією та інфекційним титром для кожної концентрації препарату.

Результати і обговорення. У нашій попередній роботі докладно описано одержання двох серій нових N-ариламідів 9-метил- та 9-метокси-ФКК-1 [11]. Загалом синтезовано 26 сполук, які підлягали біологічному тестуванню. Арильні фрагменти обох серій сполук представлені ароматичними системами з різними екзоциклічними групами (CH_3, CF_3, $(CH_2)_3CH_3$, Cl та інші замісники) у певних положеннях кільця.

Як відомо, ДМСО має виразні антимікробні властивості [25]. Враховуючи цей факт, ми визначили концентраційну залежність інгібіторної дії ДМСО щодо бактерійних тест-культур для подальшої об'єктивної оцінки антибактерійної дії досліджуваних сполук. З'ясовано, що ДМСО у межах концентрацій 5–10 % виявляє токсичну дію на всі тест-культури, тоді як за концентрації 2,5 % не чинить помітного впливу на ріст досліджуваних бактерій у порівнянні із контролем росту культур.

У табл. 1 наведено результати ферментативного та антимікробного скринінгу синтезованих сполук. Видно, що 20 сполук ефективно інгібують синтез РНК у модельній транскрипційній системі РНКП Т7 у межах концентрацій 0,48–63 мкМ. Найефективнішим виявився *n*-бутилфеніламід 9-метил-ФКК-1 (**16**) з IC_{50} = 0,48 мкМ. Високу активність продемонстрували також піридин (4-іл)амід (**23**) та *м*-карбометоксифеніламід (**25**) 9-метил-заміщеної ФКК-1 зі значенням IC_{50} 9,6 і 16,2 мкМ відповідно.

Вплив замісника у 9-му положенні феназинового гетероциклу на здатність інгібувати синтез РНК можна прослідкувати, порівнюючи активність сполук з однаковими ариламідними фрагментами. Так, з'ясувалося, що 9-метил-феназини з метильними та трифторметильними замісниками у різних положеннях феніламідів виявилися помітно активнішими за аналогічні 9-метокси похідні. Сполуки із замісниками в *орто*-положенні феніламідного фрагмента незалежно від природи замісника проявили здатність інгібувати синтез РНК. Натомість, активність *мета*- і *пара*-заміщених сполук значно залежала як

Таблиця 1
Результати ферментативного та антимікробного скринінгу феніламідів ФКК-1

№ сполуки	*E. rhusiopathiae* VR-2 var. IVM		*Klebsiella spp.*		*E. coli* ATCC25922		РНКП Т7
	100 мкг/мл	MIC, мкг/мл	100 мкг/мл	MIC, мкг/мл	100 мкг/мл	MIC, мкг/мл	IC_{50}, мкМ (мкг/мл)
1	+	0,1	–	–	–	–	>100 (>25)
2	+	1	+	10	+	10	30,4 (10)
3	+	0,1	+	1	+	10	45 (15)
4	+	–	–	–	–	–	> 80 (> 25)
5	+	1	+	1	–	–	> 80 (> 25)
6	–	–	+	10	+	10	31,2 (12)
7	+	1	–	–	+	0,1	63 (25)
8	–	–	+	1	–	–	25,2 (10)
9	–	–	–	–	+	–	> 80 (> 25)
10	–	–	–	–	–	–	55 (20)
11	+	1	+	1	+	100	37,8 (9)
12	+	100	+	1	–	–	38,3 (12)
13	+	1	+	1	–	–	32,1 (10,5)
14	+	1	+	100	–	–	26 (8,5)
15	–	–	–	–	–	–	> 80 (> 25)
16	–	–	–	–	–	–	0,48 (0,17)
17	–	–	–	–	–	–	36,7 (14)
18	–	–	–	–	–	–	28,9 (11)
19	–	–	–	–	–	–	32,8 (12,5)
20	–	–	+	1	+	10	57,4 (20)
21	–	–	–	–	–	–	28,7 (9)
22	+	100	+	10	+	1	61 (20)
23	–	–	–	–	+	100	9,6 (3)
24	–	–	–	–	+	100	> 80 (> 25)
25	–	–	+	100	+	–	16,2 (6)
26	–	–	–	–	–	100	33,8 (12)

від природи замісника в ариламідному фрагменті, так і замісника в 9-му положенні феназину.

Первинний скринінг антибактерійної активності проводили за концентрації 100 мкг/мл. Виявлені активні сполуки тестували в межах концентрацій 100–0,1 мкг/мл з послідовним розведенням у 10 разів.

Грампозитивна бактерія *E. rhusiopathiae* VR-2 var. IVM виявилася чутливою до 12 досліджуваних сполук за концентрації 100 мкг/мл. Найвищу активність проти бактерій даного штаму продемонстрували 9-метокси-ФКК-1 (**1**) та її *орто*-толіламід (**3**). За концентрації 0,1 мкг/мл вони практично повні-

Таблиця 2
Результати досліджень антивірусної активності пара-бутилфеніламідів ФКК-1

№ сполуки	ВБВД/культура клітин МДВК		*SI*	РНКП Т7
	IC_{50}, мкМ	CC_{50}, мкМ		EC_{50}, мкМ
6	64,9	–	–	31,2
16	67,2	0,42	160	0,48
26	8,8	0,88	10	33,8

стю гальмували ріст мікроорганізму. Сім сполук, а саме – феніламід (**2**), *пара*-толіламід (**5**) і *орто*-трифторметилфеніламід (**7**) із серії 9-метокси-заміщеної ФКК-1 та вихідна кислота (**11**) і три толіламіди (**13–15**) із серії 9-метил-ФКК-1 виявилися активними за концентрації 1 мкг/мл (табл. 1).

Значна кількість досліджуваних тест-агентів проявила осебе як ефективні інгібітори грамнегативних бактерій. Так, у межах зазначених вище концентрацій 10 феніламідів 9-заміщених ФКК-1 ефективно гальмували ріст бактерій *Klebsiella* spp. та шість феніламідів – ріст бактерій *E. coli* ATCC25922. Причому феніламід (**2**), *орто*-толіламід (**3**) та *пара*-бутилфеніламід (**6**) 9-метокси-ФКК-1 гальмували ріст обох грамнегативних бактерій. Згідно з отриманими результатами, найперспективнішими серед досліджуваних сполук є феніламід (**2**) та *орто*-толіламід (**3**) 9-метокси-ФКК-1, які ефективно блокують ріст усіх використаних нами тест-культур.

Факт інгібування росту різних мікробних агентів однією і тією ж речовиною можна пояснити ураженням їхніх функціонально ідентичних клітинних мішеней. Це припущення базується на тому, що 3D-структури різних ДНК- та РНК-полімераз мають високий ступінь подібності, містять одні й ті самі структурні домени і консервативні мотиви, необхідні для елонгації ланцюга нуклеїнової кислоти [26, 27]. Тож можна спрогнозувати, що речовина, яка зв'язується з консервативними елементами відповідного ферментного комплексу, блокуючи його функціональну активність, здатна гальмувати роботу і інших представників цієї суперродини ферментів, але, скоріш за все, різною мірою.

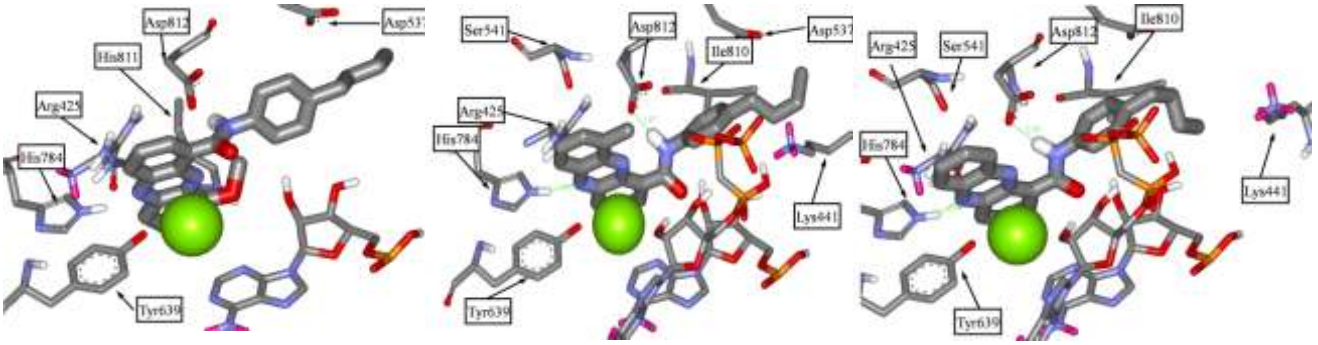
Хоча не існує спостережень прямої кореляції між активністю сполук у модельній ферментній та бактерійних системах (через індивідуальні особливості бактерійних транскрипційних комплексів поряд з іншими факторами), встановлене нами достовірне пригнічення синтезу РНК у модельній системі РНКП Т7 сполуками, що активно гальмують ріст бактерій, дає підстави вважати РНК-синтезувальний комплекс їхньою вірогідною клітинною мішенню.

Прогнозувати антивірусну дію сполук цієї серії можливо, принаймні, з огляду на їхню здатність інгібувати вірусний фермент – РНК-полімеразу фага Т7, оскільки бактеріофаги є вірусами бактерій [28], а власне фаг Т7 вважають сурогатною моделлю ДНК-вірусів, які не мають суперкапсиду [29].

Модель ВБВД нами обрано для тестування антивірусної активності феніламідів з двох причин. По-перше, ВБВД є однією з провідних ветеринарних інфекцій, яка спричиняє серйозні проблеми із здоров'ям у тварин і призводить до значних економічних витрат [30]. По-друге, він належить до пестивірусів родини *Flaviviridae* і його клітинну модель застосовують як сурогатну модель ВГС [31] для селекції сполук, що пригнічують його репродукцію.

Для оцінки антивірусних властивостей та з'ясування взаємозв'язку між функціональною активністю і структурою феніламідів до тестування залучено три *пара*-бутилфеніламіди – сполуки **6**, **16** і **26**, оскільки в роботі [19] показано, що введення бутильного замісника у бензольний фрагмент молекули 3-оксо-1,2,4-[5,6-*b*][1,4]-бензотіазину достовірно підвищує здатність цієї сполуки пригнічувати синтез РНК у модельній системі транскрипції РНКП Т7 порівняно з трифторметил-заміщеною похідною.

Антивірусні властивості феніламідів **6**, **16** і **26** оцінювали, аналізуючи рівень їхньої токсичної дії на еукаріотні клітин у культурі МДВК. Результати досліджень представлено в табл. 2. З'ясувалося, що природа 9-замісника значно впливає як на токсичність, так і на противірусні властивості згаданих сполук. Так, *пара*-бутилфеніламід **26** показав високу активність із значенням EC_{50} = 0,88 мкМ. Введення у 9-те положення феназинового гетероциклу гідро-



6 **16** **26**

Рис. 2. Розміщення сполук **6**, **16** і **26** у моделі активного сайта РНКП Т7 (дані одержано методом молекулярного докінгу [11])

фобної метильної групи спричинило підвищення активності *пара*-бутилфеніламіду **16**, який продемонстрував найвищу активність із значенням EC_{50} = = 0,42 мкМ. Натомість, заміна метильної групи на метокси-групу у положенні 9 призводить до практично повної втрати антивірусної активності відповідного *пара*-бутилфеніламіду **6**.

Для оцінки цитотоксичності і противірусної активності сполук використовують показник хіміотерапевтичного індексу, або індексу селективності (*XTI = SI*), який розраховують як відношення CC_{50} до EC_{50}. Сполуки, для яких *XTI* (*SI*) = 4 або більше, вважають активними. Зауважимо, що чим вищий *SI*, тим безпечнішим і ефективнішим є досліджуваний тест-агент.

Висока антивірусна дія амідів **16** і **26** корелює з результатами [11], де показано, що конформаційно лабільний бутильний «хвіст» цих сполук здатний стабілізувати транскрипційний комплекс РНКП Т7 [11], заповнюючи залишковий об'єм каталітичної кишені, обмежений залишками амінокислот Lys441 та Ile810 (рис. 2), а 9-метильна група феніламіду **16** фіксується у вузький гідрофобній кишені, характерній для багатьох ДНК-залежних РНК-полімераз [32].

Взаємодія ліганда з амінокислотним оточенням цієї кишені може суттєво впливати на функціонування ферменту та визначати рівень інгібіторних властивостей ліганда. Для *пара*-бутилфеніламіду **6** реалізується конфігурація його розміщення у транскрипційному комплексі РНКП Т7, «перевернута» відносно конфігурації феніламідів **16** і **26** (рис. 2), що може бути пов'язане з надлишковим об'ємом і полярністю 9-метокси-групи сполуки **6**. При цьому для реалізації важливого водневого зв'язку амідного протона з карбонільною групою Asp812 відбувається помітний вихід з площини базового феназинового гетероциклу амідного зв'язку сполуки **6** у порівнянні зі сполуками **16** і **26**, що супроводжується зменшенням спряження у структурі. Вірогідно, зазначені відмінності у структурі модельних комплексів каталітичної кишені РНКП Т7 із сполуками **6**, **16** і **26** зумовлюють різницю у їхніх антивірусних властивостях.

Таким чином, враховуючи вищевикладене, феніламіди **16** і **26**, у яких значення *XTI* становлять 160 і 10 відповідно, видаються вельми перспективними інгібіторами БВДВ.

Варто зазначити, що сполука **16** продемонструвала найефективнішу інгібіторну дію як щодо синтезу РНК у модельній системі транскрипції РНКП Т7, так і в моделі ВБВД.

Спираючись на ці результати, доцільно продовжити вивчення активності досліджуваних сполук проти інших вірусних інфекцій, у тому числі проти ВГС, як на клітинних, так і тваринних моделях.

Висновки. Показано, що N-ариламіди 9-заміщених ФКК-1 є перспективним класом для розробки ефективних антимікробних препаратів.

Дослідження їхньої біологічної дії *in vitro* виявило низку антибактерійних сполук з достатньо високою активністю щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій із значеннями МІК у межах 0,1–10 мкг/мл. Для деяких сполук встановлено множинну активність проти бактерійних тест-систем. Два ариламіди **(16** і **26)** продемонстрували ефективну

дію проти БВДВ (IC_{50} = 0,42 і 0,88 мкМ) за високих значень *XTI* (160 та 10 відповідно). Слід підкреслити, що всі ариламіди з антибактерійними та антивірусними властивостями достовірно блокують синтез РНК у модельній системі транскрипції РНКП Т7, яка загалом виявилася чутливішою до ариламідів 9-метил ФКК-1. Активність сполук залежить також від природи і положення замісника в ариламідному фрагменті.

Здобуті дані іще раз підтверджують слушність використання зазначеної модельної системи для первинної селекції інгібіторів синтезу РНК – потенційних протибактерійних та противірусних агентів.

Автори висловлюють щиру подяку І. В. Алексєвій і Н. А. Лисенко за участь у проведенні синтезу досліджуваних сполук.

L. G. Palchykovska[1], O. V. Vasylchenko[1], M. O. Platonov[1], V. G. Kostina[1], M. M. Babkina[2], O. A. Tarasov[2], D. B. Starosyla[3], S. P. Samijlenko[1], S. L. Rybalko[3], O. M. Deriabin[2], D. M. Hovorun[1]

Evaluation of antibacterial and antiviral activity of N-arylamides of 9-methyl- and 9-methoxyphenazine-1-carboxylic acids – inhibitors of the phage T7 model transctiption

[1]Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

[2]The Institute of veterinary medicine, NAAS of Ukraine
30, Donetska Str., Kyiv, Ukraine, 03151

[3]State Institution «The L.V. Gromashevsky Institute of epidemiology and infectious diseases of AMS of Ukraine»
5, Amosova Str., Kyiv, Ukraine, 03038

Summary

Aim. *Search for compounds with antibacterial and antiviral properties among N-arylamides of 9-substituted phenazine-1-carboxylic acids (PCA), inhibitors of the RNA synthesis.* ***Methods***. *Influence of N-arylamides on the RNA synthesis was tested in vitro in the model system of the DNA-dependent RNA polymerase of phage T7 (T7 RNAP). Antimicrobial activities of the N-arylamides against bacteria Erysipelothrix rhusiopathiae VR-2 var. IVM, Klebsiella spp. and Escherichia coli ATCC25922 were investigated by the method of two-fold dilution in a liquid medium. Antiviral effects against Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and cytotoxicity of the N-arylamides were evaluated using Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells.* ***Results***. *Twenty N-arylamides appeared to be efficacious inhibitors of the RNA synthesis at concentrations of 0.48–61 μM. The compound 16 proved to be the most effective inhibitor of T7 RNAP with the IC50 value being 0.48 μM. Fourteen N-arylamides demonstrated antibacterial properties against gram positive and gram negative bacteria at the 0.1–10 μg/ml concentrations. A number of the N-arylamides revealed a multiplicity of their antimicrobial actions: 7 compounds against two bacteria and two compounds, 2 and 3, against three bacteria investigated. N-arylamides 16 and 26 showed high inhibitory activity as to BVDV with the IC_{50} values 0.43 and 0.88 μg/ml and SI values 160 and 10 correspondingly.* ***Conclusions***. *The obtained data evidence that the most likely targets of the N-arylamides 9-substituted PCA in bacteria and viruses are their RNA synthesizing complexes.*

Keywords: N-arylamides 9-substituted PCA, model system of the DNA-dependent RNA-polymerase of phage T7, antibacterial activity, antiviral activity.

Л. И. Пальчиковская, О. В. Васильченко, М. О. Платонов, В. Г. Костина, М. М. Бабкина, О. А. Тарасов, Д. Б. Старосила, С. П. Самойленко, С. Л. Рибалко, О. М. Дерябин, Д. Н. Говорун

Оценка антибактериальной и антивирусной активности N-ариламидов 9-замещенных ФКК-1 – ингибиторов модельной транскрипции фага Т7

Резюме

Цель. *Поиск среди 9-замещенных N-ариламидов феназин-1-карбоновой кислоты (ФКК-1) – ингибиторов синтеза РНК – соединений с антибактериальными и антивирусными свойствами.* ***Методы***. *Влияние N-ариламидов на синтез РНК in vitro определяли с использованием модельной системы ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага Т7; антимикробную активность N-ариламидов – методом двукратных розведений в жидкой среде против бактерий Erysipelothrix rhusiopathiae VR-2 var. IVM, Klebsiella spp. и Escherichia coli ATCC25922. Антивирусное действие по отношению к вирусу бычьей вирусной диареи (ВБВД) и цитотоксичность N-ариламидов оценивали на перевиваемой линии культуры клеток почки теленка.* ***Результаты***. *Двадцать N-ариламидов оказались эффективными ингибиторами синтеза РНК в диапазоне концентраций 0,48–63 мкМ. Наивысшую активность продемонстрировало соединение* ***16****, IC_{50} которого составляет 0,48 мкМ. Антибактериальные свойства относительно грампозитивных и грамнегативных бактерий проявили 14 N-ариламидов в концентрациях 0,1–10 мкг/мл. Для ряда N-ариламидов установлен множественный характер антибактериального действия: семь соединений против двух, а два (****2*** *и* ***3****) – против трех исследуемых бак- терий. N-ариламиды* ***16*** *и* ***26*** *выявили высокий ингибиторный потенциал против ВБВД с показателями IC_{50} 0,43 и 0,88 мкМ и SI > 160 и 10 соответственно.* ***Выводы***. *Полученные результаты да- ют основание полагать, что возможными мишенями для N-арил- амидов 9-замещенных ФКК-1 у бактерий и вирусов могут быть их РНК-синтезирующие комплексы.*

Ключевые слова: N-ариламиды 9-замещенных ФКК-1, модельная система транскрипции фага Т7, антибактериальная активность, антивирусная активность.

REFERENCES

1 *Maratz H. R.* The origin of new diseases // The World Book Health and Medical Annual.–Portland: World Book, Inc., 1995.–P. 45–59.

2. *Arias C. A., Murray B. E.* Antibiotic-resistant bugs in the 21st century – a clinical super-challenge // N. Engl. J. Med.–2009.–**360**, N 5.–P. 439–443.

3. *De Logu A., Palchykovska L. H., Kostina V. H., Sanna A., Meleddu R., Chisu L., Alexeeva I. V., Shved A. D.* Novel N-aryl- and N-heteryl phenazine-1-carboxamides as potential agents for the treatment of infections sustained by drug-resistant and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // Int. J. Antimicrob. Agents.–2009.–**33**, N 3.–P. 223–229.

4. *Palchykovska L. G., Alexeeva I. V., Kostina V. G., Platonov M. O., Negrutska V. V., Deriabin O. M., Tarasov O. A., Shved A. D.* New amides of phenazine-1-carboxylic acid: antimicrobial activity and structure-activity relationship // Ukr. Biochem. J.–2008.–**80**, N 3.–P. 142–146.
5. *Das K., Lewi P. J., Hughes S. H, Arnold E.* Crystallography and the design of anti-AIDS drugs: conformational flexibility and positional adaptability are important in the design of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors // Prog. Biophys. Mol. Biol.–2005.–**88**, N 2–P. 209–231.
6. *Das K., Clark A. D. Jr., Lewi P. J., Heeres J., De Jonge M. R., Koymans L. M., Vinkers H. M., Daeyaert F., Ludovici D. W., Kukla M. J., De Corte B., Kavash R. W., Ho C. Y., Ye H., Lichtenstein M. A., Andries K., Pauwels R., De Bethune M. P., Boyer P. L., Clark P., Hughes S. H., Janssen P. A., Arnold E.* Roles of conformational and positional adaptability in structure-based design of TMC125-R165335 (etravirine) and related non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors that are highly potent and effective against wild-type and drug-resistant HIV-1 variants // J. Med. Chem.–2004.–**47**, N 10.–P. 2550–2560.
7. *Sahlberg C., Xiao-Xiong Z.* Development of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors for anti-HIV therapy // Antiinfect. Agents Med. Chem.–2008.–**7**, N 2.–P. 101–117.
8. *Cano F. R., Kuo S. C., Lampen J. O.* Lomofungin, an inhibitor of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerases // Antimicrobial. Agents Chemother.–1973.–**3**, N 6.–P. 723–728.
9. *Rewcastle G. W., Denny W. A., Baguley B. C.* Potential antitumor agents. 51. Synthesis and antitumor activity of substituted phenazine-1-carboxamides // J. Med. Chem.–1987.–**30**, N 5.–P. 843–851.
10. *Gamage S. A., Rewcastle G. W., Baguley B. C., Charlton P. A., Denny W. A.* Phenazine-1-carboxamides: structure-cytotoxicity relationships for 9-substituents and changes in the H-bonding pattern of the cationic side chain // Bioorg. Med. Chem.–2006.–**14**, N 4.–P. 1160–1168.
11. *Palchykovska L. G., Vasylchenko O. V., Platonov M. O., Kostina V. G., Lysenko N. A., Alexeeva I. V., Hovorun D. M., Shved A. D.* Design of transcription inhibitors on the basis of N-arylamides of 9-methyl- and 9-methoxyphenazine-1-carboxylic acids // Ukr. Biochem. J.–2011.–**83**, N 2.–P. 65–72.
12. *Rao Y.M., Sureshkumar G. K.* Oxidative-stress-induced production of pyocyanin by *Xanthomonas campestris* and its effect on the indicator target organism, *Escherichia coli* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol.–2000.–**25**, N 5.–P. 266–272.
13. *Price-Whelan A., Dietrich L. E., Newman D. K.* Rethinking «secondary» metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics // Nat. Chem. Biol.–2006.–**2**.–N 2.–P. 71–78.
14. *Hollstein U., Van Gemert R. J. Jr.* Interaction of phenazines with polydeoxyribonucleotides // Biochemistry.–1971.–**10**, N 3.–P. 497–504.
15. *Hollstein U., Butler P. L.* Inhibition of ribonucleic acid synthesis by myxin // Biochemistry.–1972.–**11**, N 8.–P. 1345–1350.
16. *Turner J. M., Messenger A. J.* Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production // Adv. Microb. Physiol.–1986.–**27**.–P. 211–275.
17. *Kerr J. R.* Phenazine pigments: antibiotics and virulence factors // Infect. Dis. Rev.–2000.–**29**.–P. 184–194.
18. *Stankiewicz-Drogon A., Palchykovska L. G., Kostina V. G., Alexeeva I. V., Shved A. D., Boguszewska-Chachulska A. M.* New acridone-4-carboxylic acid derivatives as potential inhibitors of hepatitis C virus infection // Bioorg. Med. Chem.– 2008.–**16**, N 19.–P. 8846–8852.
19. *Palchykovska L. G., Alexeeva I. V., Platonov M. O., Kostenko O. M., Usenko L. S., Negrutska V. V., Shved A. D.* New 1,2,4-triazine bearing compounds: molecular modeling, synthesis and biotesting // Biopolym. Cell.–2009.–**25**, N 6.–P. 491–499.
20. *Palchykovska L. G., Alexeeva I. V., Negrutska V. V., Kostyuk Yu. K., Indychenko T. M., Kostenko O. M., Kryvorotenko D. V., Shved A. D., Dubey I. Ya.* Inhibition of *in vitro* transcription by 2-arylidene derivatives of thiazolo[3,2-α]benzimidazol-3(2H)-one // Biopolym. Cell.–2010.–**26**, N 6.–P. 508–511.
21. *National* Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically / Third ed. // Approved Standard NCCLS Document M7-A3.1993.–13, No. 25, NCCLS, Villanova, PA, December 1993.
21. *Methods* for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically / 3rd ed. // Approved standard M7-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards.–Villanova, 1993.
22. *Luber P., Bartelt E., Genschow E., Wagner J., Hahn H.* Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* // J. Clin. Microbiol.–2003.–**41**, N 3.–P. 1062–1068.
23. *Jorgensen J. H., Turnidge J. D., Washington J. A.* Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods // Manual of clinical microbiology / Eds P. R. Murray et. al., 9th ed.–Washington: Am. Soc. Microbiol. publ., 2007.–P. 1152–1172.
24. *Shimizu Y. K., Yoshikura H.* Cell culture systems for the detection of HCV infection // Methods Mol. Med.–1999.–**19**.–P. 483–488.
25. *Basch H., Gadebusch H. H. In vitro* antimicrobial activity of dimethylsulfoxide // Appl. Microbiol.–1968.–**16**, N 12.–P. 1953–1954.
26. *Delarue M., Poch O., Tordo N., Moras D., Argos P.* An attempt to unify the structure of polymerases // Protein Eng.–1990.–**3**, N 6.–P. 461–467.
27. *Tunitskaya V. L., Kochetkov S. N.* Structural-functional analysis of bacteriophage T7 RNA polymerase // Biochemistry (Mosc).–2002.–**67**, N 10.–P. 1124–1135.
28. *Dennehy J. J.* Bacteriophages as model organisms for virus emergence research // Trends Microbiol.–2009.–**17**. N 10.–P. 450–457.
29. *Egyeki M., Turoczy G., Majer Z., Toth K., Fekete A., Maillard P., Csik G.* Photosensitised inactivation of T7 Phage as surrogate of non-enveloped DNA viruses: efficiency and mechanism of action // Biochim. Biophys. Acta.–2003.–**1624**, N 1–3.–P. 115–124.
30. *Goens S. D.* The evolution of bovine viral diarrhea // Can. Vet. J.–2002.–**43**, N 12.–P. 946–954.
31. *Buckwold V. E., Beer B. E., Donis R. O.* Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents // Antiviral Res.–2003.–**60**, N 1.–P. 1–15.
32. *Sousa R.* Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases // Trends Biochem. Sci.–1996.–**21**, N 5.–P. 186–190.

Received 30.09.12