

УДК 547.583.5: 615.281

DOI 10.18413/2075-4728-2018-41-3-495-501

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ «СТРУКТУРА – ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА В РЯДУ ЗАМЕЩЕННЫХ АМИДОВ И ГИДРАЗИДОВ N-АРОИЛ-5-БРОМ (5-ХЛОР) АНТРАНИЛОВЫХ КИСЛОТ

INVESTIGATION OF THE «STRUCTURE – ANTIMICROBIAL ACTIVITY» RELATIONSHIP USING MOLECULAR DOCKING IN THE SERIES OF SUBSTITUTED AMIDES AND HYDRAZIDES OF N-AROYL-5-BROMO (5-CHLORO) ANTHRANILIC ACIDS

**К.В. Андрюков, Л.М. Коркодинова
K.V. Andryukov, L.M. Korkodinova**

Пермская государственная фармацевтическая академия,
Россия, 614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2

Perm state pharmaceutical Academy,
2 Polevaya St., Perm, 614990, Russia

E-mail: k_andrukov@mail.ru

Аннотация

Целью исследования является изучение связи «структура – противомикробная активность» в отношении кишечной палочки (*E. Coli*) с использованием молекулярного докинга в ряду замещенных амидов и гидразидов N-ароил 5-бром (5-хлор) антралиловых кислот. Построены структуры 15 исследуемых соединений и теоретически найдены значения констант ионизации и липофильности. Проведен молекулярный докинг по ферменту MurB (*E. Coli*). Исследована зависимость противомикробной активности от теоретически рассчитанных физико-химических свойств и скоринговых функций: энергия связывания Be ($\min Be$), межмолекулярная энергия (Ime ($\min Be$)), константа ингибирования (Ki ($\min \Delta A$)). Получено 2 корреляционных уравнения, связывающих противомикробную активность с рассчитанными параметрами.

Abstract

The aim of the study is to study the relationship «structure-antimicrobial activity» with *Escherichia coli* (*E. Coli*) using molecular docking in the series of substituted amides and hydrazides of N-aroyl 5-bromo (5-chloro) anthranilic acids. The structures of 15 investigated compounds were constructed and their values of the ionization and lipophilicity constants were theoretically found. Molecular docking of the MurB enzyme (*E. Coli*) was performed. The dependence of antimicrobial activity on theoretically calculated physico-chemical properties and scoring functions (binding energy (Be ($\min Be$)), intermolecular energy (Ime ($\min Be$)), inhibition constant (Ki ($\min \Delta A$))) was studied. Two correlation equations were obtained, linking antimicrobial activity with the calculated parameters.

Ключевые слова: антралиловая кислота, противомикробная активность, структура-активность, молекулярный докинг.

Keywords: anthranilic acid, antimicrobial activity, structure-activity, molecular docking.

Введение

Антралиловая кислота принимает участие в биохимических процессах на различных уровнях организации живой материи, начиная с вирусов и бактерий, обеспечивает широкий спектр биохимических реакций, является одним из ключевых

реагентов в полусинтетическом методе получения ряда антибиотиков, например, кальцимицина, проявляющего противомикробную активность [Prudhomme et al., 1984].

N-Ацилантранилиамиды обладают широким спектром фармакологического действия: противовоспалительным [Amal et al., 2012.; Maher et al., 2016], анальгетическим [Khaled et al., 2013] и противомикробным действием [Rama et al., 2010.; Khaldoon AL-Rahawi et al., 2013; Meenu et al., 2015]. Создание моделей «структура – противомикробная активность» для производных антраниловой кислоты является актуальным при проведении целенаправленного поиска веществ с выраженной противомикробной активностью [Shahzad et al., 2015; Kuldeep et al., 2012.]. Молекулярный докинг позволяет повысить качество и достоверность проводимых исследований, как, например, модель «структура – противовоспалительная активность» [Андрюков и др., 2018].

Целью исследования является изучение связи «структура – противомикробная активность» в отношении кишечной палочки (E.Coli) с использованием молекулярного докинга в ряду замещенных амидов и гидразидов N-ароил 5-бром (5-хлор) антраниловых кислот.

Объекты и методы исследования

Объект исследования: замещенные амиды и гидразиды N-ароил 5-бром (5-хлор) антраниловых кислот (рис. 1). Бактериостатическая активность изучена методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде [Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, 2000]. Для всех исследуемых 15 соединений были определены минимальные подавляющие концентрации (МПК) (табл. 1) [Подчерзцева, 2004.; Андрюков, 2006.; Андрюков и др., 2007] в отношении фармакопейного штамма Escherichia coli ATCC 25922.

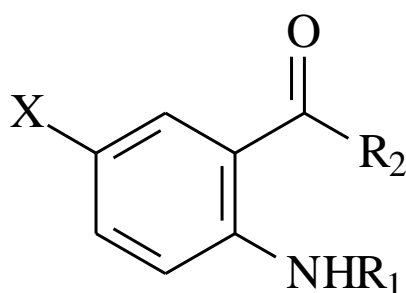


Рис. 1. Строение замещенных амидов и гидразидов
Rice. 1. Structure of substituted amides and hydrazides

Таблица 1
Table 1

МПК (E.Coli) замещенных амидов и гидразидов N-ароил 5-бром (5-хлор) антраниловых кислот
MIC (E.Coli) of substituted amides and hydrazides of N-aroil 5-bromo (5-chloro) anthranilic acids

№	X	R ₁	R ₂	МПК, мкг/мл (E.Coli)
I	Br	H	NH ₂	1000
II	Br	CO (2-COOH) C ₆ Cl ₄	NH ₂	15.6
III	Br	CO (3-NO ₂)C ₆ H ₄	NH ₂	1500
IV	Br	CO (4-CH ₃)C ₆ H ₄	NH ₂	1000
V	Cl	CO (4-Cl) C ₆ H ₄	NHCH ₂ C ₆ H ₅	500
VI	Br	CO (2-COOH) C ₆ H ₄	NHC ₆ H ₅	500
VII	Br	CO C ₆ H ₅	NHC ₆ H ₅	1000
VIII	Br	CO (4-Cl) C ₆ H ₄	NHC ₆ H ₅	1000
IX	Br	CO 2-фурил	NHNHCO (2-фурил)	1000

Окончание табл. 1
The end of the table 1

№	X	R ₁	R ₂	МПК, мкг/мл (E.Coli)
X	Br	CO C ₆ H ₅	NHCH ₂ CH ₂ OH	1000
XI	Br	CO (2-COOH) C ₆ H ₄	NH ₂	1000
XII	Br	CO (4-Cl) C ₆ H ₄	NH ₂	1500
XIII	Cl	CO (4-Cl) C ₆ H ₄	NH(2-CH ₃)C ₆ H ₄	1000
XIV	Br	CO (4-NO ₂)C ₆ H ₄	NHC ₆ H ₅	1000
XV	Br	CO 2-фурил	NHNHCOCH ₂ Cl	500

Молекулярный докинг проводили по ферменту MurB E.Coli. Множественный регрессионный анализ зависимости структура-противомикробная активность программой Statistica 6.

Результаты и их обсуждение

Построены структуры и проведены квантово-химические расчёты 15 соединений из ряда замещенных амидов и гидразидов N-ароил 5-бром (5-хлор) антралиловых кислот с использованием программы Gaussian 03 полуэмпирическим методом PM3. В результате получены квантово-химические дескрипторы: суммарные значения напряженности электрического поля $\Sigma(E)$, потенциала $\Sigma(\phi)$ и заряда $\Sigma(|q|)$ на атомах углерода, кислорода, азота и водорода (табл. 2). Перед проведением исследований структура-активность необходимо провести теоретический расчёт физико-химических свойств исследуемых соединений с использованием найденных квантово-химических дескрипторов и составленных уравнений множественной регрессии, а именно константы липофильности ($\log P_{\text{рассч}}$) [Андрюков и др., 2013], константы кислотности ($pK_{a\text{рассч}}$) [Андрюков и др., 2016] и основности ($pK_{b\text{рассч}}$) [Андрюков и др., 2016].

Таблица 2
Table 2

Квантово-химические параметры, $\log P_{\text{рассч}}$, $pK_{a\text{рассч}}$ и $pK_{b\text{рассч}}$ замещенных амидов и гидразидов N-ароил-5-бром (5-хлор) антралиловых кислот
Quantum-chemical parameters, $\log P_{\text{calc}}$, $pK_{a\text{calc}}$ and $pK_{b\text{calc}}$ of substituted amides and hydrazides N-aroil-5-bromo (5-chloro) anthranilic acids

№	C(E)	N(E)	C(φ)	O(φ)	N(φ)	O(q)	$\log P_{\text{рассч}}$	$pK_{a\text{рассч}}$	$pK_{b\text{рассч}}$
I	3.67	1.08	73.31	12.21	21.86	0.38	2.32	7.28	11.85
II	9.46	1.17	190.66	57.53	27.42	1.36	2.63	6.18	13.01
III	8.64	1.67	179.38	55.68	39.76	1.89	1.56	7.82	12.25
IV	8.71	1.11	191.69	28.34	26.98	0.70	2.46	7.45	12.09
V	12.75	0.2	287.14	31.44	31.20	0.70	2.61	6.98	13.32
VI	12.96	0.91	293.78	62.33	31.96	1.35	2.86	7.30	12.99
VII	12.44	0.88	273.17	31.24	31.28	0.67	2.65	6.59	13.54
VIII	12.54	0.88	272.32	31.19	31.23	0.67	2.65	6.35	13.72
IX	9.21	1.09	214.60	74.41	42.94	1.09	3.92	8.28	13.26
X	9.20	0.81	206.89	42.93	28.97	0.99	2.61	7.13	13.07
XI	9.13	1.17	193.51	57.92	27.62	1.40	2.58	6.99	12.40
XII	8.42	1.08	173.41	27.80	26.43	0.70	2.44	6.53	12.80
XIII	13.10	0.89	293.78	31.93	32.08	0.67	2.68	7.03	13.24
XIV	11.8	1.29	274.02	59.16	43.68	1.85	1.80	8.51	12.73
XV	7.8	1.19	170.84	56.86	40.61	1.02	3.22	8.20	12.93

Значения констант липофильности лежат в интервале от 1.56 у соединения III до 3.92 (соединение IX). Рассчитанные значения констант кислотности, характеризующих ионизацию, находятся в пределах от 6.18 (соединение II) до 8.51 для соединения XIV. Константы основности находятся в пределах от 11.85 у соединения I до 13.72, для соединения VIII.

В проводимых исследованиях в качестве рецептора использовали фермент, участвующий в образовании клеточной стенки бактерий, – уридиндифосфат-*N*-ацетилпирувилглюкозамин редуктаза (MurB). Структура рецептора – молекула MurB (*E. Coli*) была взята из базы данных Brookhaven Protein Data Bank (PDB ID code: 2MBR [Benson et al., 1997]).

Структуры всех лигандов были построены и оптимизированы полуэмпирическим методом РМЗ с использованием программы Gaussian 03 и затем были конвертированы в 3D-формат (.pdb) с помощью программы ChemBio3D Ultra 12.0.

Докинг исследования выполнены с использованием программы AutoDock 4.0. При проведении докинга использовали Ламарковский генетический алгоритм, который позволяет воспроизводить строение комплексов более точно [Morris et al., 2008].

Результаты докинга с ферментом MurB (*E. Coli*) замещенных амидов и гидразидов *N*-ароил-5-бром (5-хлор) антралиловых кислот (I – XV) в виде скоринговых функций представлены в таблице 3: Be (minBe) – энергия связывания, взятая по конформации с минимальной энергией связывания (minBe); Ime (minBe) – межмолекулярная энергия, взятая из конформации с минимальной энергией связывания (minBe); Ki (minΔ A) – константа ингибирования по конформации с минимальным среднеквадратичным отклонением от структурного аналога 5-нитрофурилен гидразида 5-бром-*N*-ацетилантралиловой кислоты (A) (minΔ A) [Чернобровин и др., 1987].

Таблица 3

Table 3

Результаты докинга с ферментом MurB (*E. Coli*) программой AutoDock 4 соединений (I – XV) замещенных амидов и гидразидов *N*-ароил-5-бром (5-хлор) антралиловых кислот
Results of docking with the enzyme MurB (*E. Coli*) by the AutoDock 4 program compounds (I-XV) of substituted amides and hydrazides of *N*-aroyl-5-bromo (5-chloro) anthranilic acids

№	Be (minBe)	Ime (minBe)	Ki (minΔ A)
I	-4.78	-5.38	213.46
II	-4.72	-6.21	173.50
III	-5.57	-6.77	22.60
IV	-5.00	-6.19	41.85
V	-5.88	-7.37	33.18
VI	-5.82	-7.61	21.99
VII	-5.99	-7.19	40.53
VIII	-6.25	-7.44	21.38
IX	-4.71	-6.2	76.36
X	-4.40	-6.19	59.92
XI	-4.78	-6.27	178.12
XII	-5.66	-6.56	9.48
XIII	-6.06	-7.26	3.83
XIV	-6.20	-7.69	887.2
XV	-4.39	-5.88	209.69

Для соединения II с противомикробной активностью (ПМА), равной 15.6 мкг/мл, приведена диаграмма взаимодействия, включающая водородные связи и гидрофобные взаимодействия по аминокислотам (рис. 2) (по конформации с минимальной Be). По

атому брома и бензольному кольцу антралиновой кислоты происходит гидрофобное взаимодействие с активным участком фермента FAD 401. Так же образуются межмолекулярные водородные связи с аминокислотами – аспарагин (ASN88), лейцин (LEU109), гистамин (HIS90) и аргинин (ARG91).

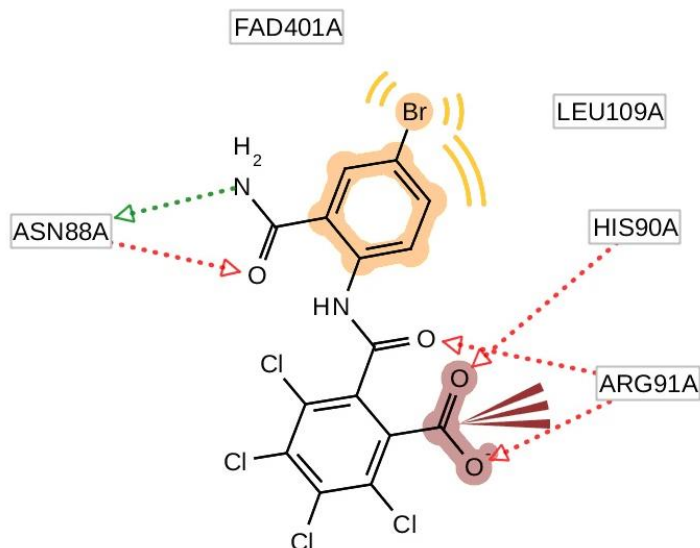


Рис.2. Комплекс соединения II с активным участком MurB E. Coli. Изображение получено с использованием программы LigandScout.

Fig. 2. Complex of compound II with active site E. Coli MurB. The image was obtained using the LigandScout program.

Проведен множественный линейный регрессионный анализ с использованием программы Statistica 6 зависимости МПК_{E.Coli} от Be (minBe), Ime (minBe), Ki (minΔ A), logP_{рассч}, рКа_{рассч} и рКв_{рассч}. В результате было составлено 12 уравнений, из которых наиболее значимыми оказались два уравнения (табл. 4).

Таблица 4
Table 4

Уравнения регрессии зависимости МПК_{E.Coli} от дескрипторов (log P_{рассч}, рКа_{рассч}, рКв_{рассч}, Be (minBe), Ime (minBe), Ki(minΔ A))
The equations of regression of the MIC_{E.Coli} dependence from descriptors (log P_{calc}, рКа_{calc}, рКв_{calc}, Be (minBe), Ime (minBe), Ki (minΔA))

№	Уравнение регрессии	R	F	S	N	Q ² _{LOO}
1	$\begin{aligned} \text{МПК}_{E.Coli} = & 2358.936 - 657.235 \times \text{Be (minBe)} + \\ & + 1347.676 \times \text{Ime (minBe)} - \\ & - 8.829 \times \text{Ki (min}\Delta \text{ A)} + 248.479 \times \text{pKv}_{\text{рассч}} - \\ & - 229.716 \times \log P_{\text{рассч}} + 276.032 \times \text{pKa}_{\text{рассч}} \end{aligned}$	0.928	8.37	188.58	15	0.61
2	$\begin{aligned} \text{МПК}_{E.Coli} = & 5924.684 - 488.946 \times \text{Be (minBe)} + \\ & + 1026.087 \times \text{Ime (minBe)} - \\ & - 7.844 \times \text{Ki (min}\Delta \text{ A)} - 106.227 \times \log P_{\text{рассч}} \end{aligned}$	0.831	5.61	252.63	15	0.20

Проведена оценка составленных уравнений методом перекрестного контроля с выбором по одному (Leave-one-out Cross-validation, LOO) (Q²_{LOO}) [Sipl et al., 2001] с использованием программы Statographics. Определен коэффициент детерминации предсказаний Q²_{LOO}, значения которого равны 0.61 и 0.20 для уравнений 1 и 2 соответственно.

По результатам проверки можно сделать вывод, что составленная предсказательная модель на основе уравнения 1 является значимой, так как значение Q^2 по LOO для надежных предсказательных моделей должно быть не менее 0.5 [Sippl et al., 2001].

Заключение

По результатам выполненного анализа множественной регрессии составлено уравнение зависимости МПК_{E.Coli} от скоринговых функций и физико-химических параметров: $\log P_{\text{рассч}}$, $rK_{\text{арассч}}$ и $rK_{\text{Врассч}}$.

В результате проведенных исследований предложено корреляционное уравнение №1 для проведения дальнейших исследований «структура – противомикробная активность», которые позволяют производить достоверный и экономически выгодный прогноз уровня ПМА, выявляя соединения с высокой противомикробной активностью до проведения их синтеза и биологических испытаний.

Список литературы

References

1. Андрюков К.В., Коркодинова Л.М. 2016. Квантово-химические параметры в исследовании зависимости структура – ионизация N-замещенных моно (ди) галоген (н) антралиловых кислот, их амидов и гидразидов. Химико–фармацевтический журнал, 50 (3): 23 – 27.

Andryukov K.V., Korkodinova L.M. 2016. Kvantovo-himicheskie parametry v issledovanii zavisimosti struktura - ionizaciya N-zameshchennyh mono (di)galogen(n) antranilovyh kislot, ih amidov i gidrazidov [Quantum and chemical parameters in a dependence research structure - ionization of the anthranilic acids N-replaced mono halogen (H), their amides and hydrazides]. Himiko–farmaceuticheskij zhurnal, 50 (3): 23 – 27. (in Russian).

2. Андрюков К.В., Коркодинова Л.М. 2018. Молекулярный докинг в изучении взаимодействия амидов и гидразидов N-ароилзамещенных алоген(Н)антралиловых кислот с циклооксигеназой 1, проявляющих противовоспалительную активность. Химико–фармацевтический журнал, 52 (5): 29 -32.

Andryukov K.V., Korkodinova L.M. 2018. Molekulyarnyj doking v izuchenii vzaimodejstviya amidov i gidrazidov N-aroilzameshchennyh alogen(N)antranilovyh kislot s ciklooksigenazoj 1, proyavlyayushchih protivovospalitel'nyu aktivnost' [Molecular docking study of the interaction of cyclooxygenase 1 with N-aryl-substituted halogen(H)anthranilic acid amides and hydrazides exhibiting anti-inflammatory activity]. Himiko-farmaceuticheskij zhurnal, 52 (5): 29 -32. (in Russian).

3. Андрюков К.В., Коркодинова Л.М. 2013. Прогнозирование коэффициента распределения октанол – вода производных N- арилзамещенных антралиловых кислот. Химико–фармацевтический журнал, 47 (12): 38 – 41.

Andryukov K.V., Korkodinova L.M. 2013. Prognozirovaniye koehfficienta raspredeleniya oktanol – voda proizvodnyh N- arilzameshchennyh antranilovyh kislot [Prediction of the octanol-water partition coefficients of N-aryl-substituted anthranilic acid derivatives]. Himiko–farmaceuticheskij zhurnal, 47 (12): 38 – 41. (in Russian).

4. Андрюков К.В. 2006. Синтез, свойства и биологическая активность моно(ди)бромзамещенных производных антралиловой кислоты, изучение связи строения с действием с использованием констант ионизации и квантово-химических расчётов: Дис. ...канд. фармац. наук. Пермь, 166.

Andryukov K.V. 2006. Sintez, svojstva i biologicheskaya aktivnost' mono(di)bromzameshchennyh proizvodnyh antranilovoj kisloty, izuchenie svyazi stroeniya s dejstviem s ispol'zovaniem konstant ionizacii i kvantovo-himicheskikh raschyotov [Synthesis, properties and biological activity of mono(di)bromosubstituted anthranilic acid derivatives, study of structure-activity relationship using ionization constants and quantum chemical calculations]: Dis. ...kand. farmac. nauk. Perm', 166. (in Russian).

5. Андрюков К.В., Томилов М.В., Коркодинова Л.М., Одегова Т.Ф. 2007. Синтез и противомикробная активность замещенных амидов и гидразидов N–ацил–5– бромантралиловых кислот. Химико–фармацевтический журнал, 41 (9): 29 – 31.

Andryukov K.V., Tomilov M.V., Korkodinova L.M., Odegova T.F. 2007. Sintez i protivomikrobnaya aktivnost' zameshchennyh amidov i gidrazidov N–acil–5– bromantranilovyh kislot

[Synthesis and antimicrobial activity of substituted amides and hydrazides of N-acyl-5-bromanthranilic acids]. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal*, 41 (9): 29 – 31. (in Russian)

6. Подчерзецева А.В. 2004. Синтез, биологическая активность и установление количественных соотношений «структура-противовоспалительная активность» в ряду N-ацилантраниловых кислот и их амидов. Дис. ...канд. фармац. наук. Пермь, 142.

Podcherezceva A.V. 2004. Sintez, biologicheskaya aktivnost' i ustanovlenie kolichestvennyh sootnoshenij «struktura- protivovospalitel'naya aktivnost'» v ryadu N-acilantranilovyh kislot i ih amidov [Synthesis, biological activity and the establishment of quantitative correlations "structure - anti-inflammatory activity" in the row N-acylanthranilic acids and their amides]. Dis. ...kand. farmac. nauk. Perm', 142. (in Russian)

7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2000. М., Бионт, 540.

Rukovodstvo po ehksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novyh farmakologicheskikh veshchestv [Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances]. 2000. M., Biont, 540. (in Russian)

8. Чернобровин Н.И., Кожевников Ю.В., Пупкова О.В., Скворцов В.А., Семенова З.Н., Назметдинов Ф.Я., Сыропятов Б.Я. 1987. 5-Нитрофурфуриленгидразид 5-бром-N-ацетилантраниловой кислоты, проявляющий анальгетическую и противостафилококковую активности. А.С. 1499890 СССР. № 4348599/04. Бюл. 16.

Chernobrovin N.I., Kozhevnikov Yu.V., Pupkova O. V., Skvortsov V. A., Semenova Z. N., Nazmutdinov F.Ya., Syropyatov B. Ya. 1987. 5-Nitrofurfurilidengidrazid 5-brom-N-acetilantranilovoj kisloty, proyavlyayushchij anal'geticheskuyu i protivostafilokokkovuyu aktivnosti [5-Nitrofurfurylidenehydrazide 5-bromo-N-acetylanthranilic acid, which exhibits analgesic and antistaphylococcal activity]. A.S. 1499890 SSSR. № 4348599/04. Byul. 16. (in Russian)

9. Amal Abdel Haleem Mohamed Eissa, Gamal Abd El-Hakeem Soliman, Moayad H. K. 2012. Design, Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Structurally Simple Anthranilic Acid Congeners Devoid of Ulcerogenic Side Effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 60 (10) : 1290-1300.

10. Khaldoon AL-Rahawi, Ali AL-Kaf, Shada Y., Sameh EL-Nabtity, Kotb EL-Sayed and Napila AL-Shoba. 2013. Synthesis and biological activities of 2-carboxyphenyloxamoylamino acids, their salts with 2-ethoxy-6.9-Diaminoacridine and D-glucosamine. *Adv. Pharmacoeconom. Drug Safety*, 2 (2): 2-6.

11. Benson T.E., Walsh C.T., and Hogle J. M.. 1997. X-ray crystal structures of the S229A mutant and wild-type MurB in the presence of the substrate enolpyruvyl-UDP-N-acetylglucosamine at 1.8-Å resolution. *Journal Biochemistry*, 36: 806-811.

12. Khaled A. M., Nadia A. K., Eman M.A., Sawsan Abo-Bakr Z.. 2013. Synthesis and Biological Evaluation of New Heteroaryl Carboxylic Acid Derivatives as Anti-inflammatory-Analgesic Agents. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 61 (2): 222-228.

13. Kuldeep M., Pradeep K., Balasubramanian N.. 2012. Synthesis, antimicrobial evaluation, ot-QSAR and mt-QSAR studies of 2-amino benzoic acid derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 21 (3): 293-307.

14. Meenu Beniwal, Viney Lather, Vikramjeet Judge, Neelam Jain, Amit Beniwal. 2015. Anti-inflammatory, antimicrobial activity and qsar studies of anthranilic acid derivatives. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 4(09): 1443-1451.

15. Morris G.M., Huey R., Olson A.J. 2008. Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Curr.Protoc.Bioinformatics*, 11(13): 34–37.

16. Maher Abd El-Aziz El-Hashash, Mohammad E. A., Rasha Abd El-Aziz Faty, Abd El-Galil Elsyed Amr. 2016. Synthesis, Antimicrobial and Anti-inflammatory Activity of Some New Benzoxazinone and Quinazolinone Candidates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 64 (3): 263-271.

17. Prudhomme M., Dauphin G., Guyot J., Jeminet G. 1984. Semisynthesis of A23187 (Calcimycin) analogs II. Introduction of a methyl group on the benzoxazole ring. *The Journal of antibiotics*, 37 (6): 627-634.

18. Rama Rao Nadendla, Mukkanti K., Sudhakar G. Rao. 2010. Microwave Synthesis of some new Quinazolinone Formazans for their Antimicrobial and Antihelminthic Activities. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 4 (1): 545-550.

19. Shahzad M., Jamshaid A. 2015. Synthesis, Antioxidant and Antimicrobial activity of 4-aminophenol and 2-aminobenzoic acid based novel azo compounds. *Asian J. Chem.*, 27 (10): 3551-3554.

20. Sippl W., Contreras J. M., Parrot I., Rival Y. M., Wermuth C. G. 2001. Structure-based 3D QSAR and design of novel acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 15: 395 – 410.