

БАКТЕРИОЛОГИЯ*СОТРУДНИЧЕСТВО ИОС УрО РАН И УНИИФ ПО СОЗДАНИЮ НОВЫХ
ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ*

Кравченко М.А.¹, Русинов Г.Л.², Скорняков С.Н.¹, Чарушин В.Л.²

1 - Федеральное государственное бюджетное учреждение «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии», лаборатория микробиологии и ПЦР-диагностики Министерства здравоохранения Российской Федерации, Российская Федерация, 620039, Екатеринбург, ул. XXII партсъезда, 50.

2 - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, Российская Федерация, 620137, Екатеринбург, ул. С.Ковалевской/Академическая, 22/20.

**COOPERATION IOS URAL DIVISION OF RAS AND URIP IN THE
CREATION OF NEW ANTITUBERCULOSIS DRUGS**

Kravchenko M.A.¹, Rusinov G.L.², Skorniyakov S.N.¹, Charushin V.L.²

Резюме: поиск новых противотуберкулезных соединений из различных гетероциклических классов: (пиримидинов, пиразинов, дигидропиразинов, тетразинов, азолотетразинов и др.)

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза (МБТ), туберкулостатическая активность вновь синтезированных соединений.

Summary: A simple method on a basis of the hydrolysis of the corresponding 2,3-dicyanopyrazinium salts has been used for the synthesis of 5-(hetero)aryl-3-

cyano-1-ethyl-2(1*H*)-pyrazinones. Also the range of 1-ethyl-5-(hetero)aryl-1,6-dihydropyrazine-2,3-dicarbonitriles was expanded by reduction of the same pyrazinium salts with triethylsilane. All new compounds were found to be active in micromolar concentrations in vitro against H₃₇Rv, *avium*, *terrae*, rifampicin and isoniazid-resistance strains of *Mycobacterium tuberculosis*. The study and comparison of the structure-activity relationship between of pyrazinones and dihydropyrazines were performed.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculostatic activity new synthesis compounds

Распространение лекарственно устойчивого туберкулеза и рост заболеваемости населения делают актуальными поиски эффективных химиотерапевтических средств. Одним из перспективных классов являются 2,5-дизамещенные тетразолы, среди которых известны соединения с различной биологической активностью: антивирусной, противоопухолевой. Для некоторых 2,5-дизамещенных тетразолов, содержащих ацетофенонные и эфирные фрагменты, были выявлены противолучевая и туберкулостатическая активности(1,2,3).

Экспериментальная биологическая часть

Метод оценки туберкулостатической активности. Изучение туберкулостатической активности проводили методом вертикальной диффузии с использованием лабораторного штамма H₃₇Rv на плотной питательной среде “Новая”. Питательную среду разливали в пробирки по 5 мл, свертывая в наклонном положении таким образом, чтобы ½ часть дна пробирки оставалась свободной. Свернутую среду засеивали по 0.1 мл взвеси микобактерий туберкулеза штамма H₃₇Rv, разведенного по стандарту мутности 10 ед. и в наклонном положении помещали в термостат на 24 часа для выращивания микобактерий. Через сутки

пробирки ставили в вертикальное положение и по свободному краю закапывали по 0.3 мл субстанции соединений в исследуемых концентрациях: 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.75 мкг/мл. Затем пробирки помещали в термостат при температуре 37°C и инкубировали в течение 10 суток. Оценку роста микобактерий туберкулеза проводили по стандартной методике, где проявление зон задержки роста (более 10 мм) свидетельствовало о наличии туберкулостатических свойств в исследуемой концентрации соединений. Величина зоны задержки роста микобактерий (в мм) пропорциональна степени туберкулостатической активности соединений. Задержка роста 100 мм и более расценивалась как полная задержка роста МБТ.

Наша работа базируется на сотрудничестве с институтом органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского Отделения Российской Академии Наук под руководством академика В.Н.Чарушина. Сотрудники института разрабатывают и синтезируют новые соединения на основе гетероциклов. Субстанции химических соединений передаются в Институт Фтизиопульмонологии в лабораторию экспериментальных и диагностических методов исследований для изучения их туберкулостатической и противотуберкулезной активности. Скрининг туберкулостатической активности проводится в два этапа. На первом этапе туберкулостатическую активность изучаем на лабораторном штамме H37RV. Выявляем наиболее активные соединения, которые проявили высокую активность. На втором этапе изучаем туберкулостатическую активность в отношении штаммов: M.Avium, M.Terraе, штамм с МЛУ. У активных соединений, выявленных в скрининге, изучается острая токсичность на животных. Таким образом, происходит поиск новых перспективных кандидатных молекул, которые могут быть в отдаленной перспективе использованы для создания на их основе противотуберкулезных лекарственных препаратов. В последние годы

наибольший интерес представляют соединения из классов: пиримидинов, пиразинов, тетразинов и др. (рис 1).

Производные пиримидинов общие структурные формулы исследуемых гетероциклов из классов – пиримидинов, дигидропиразинов и пиразинов, тетразинов, азолотетразинов и подандов (рис.2).

Если говорить конкретно о производных пиримидина, то их биологическая активность очень разнообразна. Так, существуют лекарственные препараты, обладающие снотворной, противоопухолевой, противовирусной и антибактериальной активностями. Поскольку речь пойдет о получении 2,4,5-замещенных пиримидинов и результатах изучения их туберкулостатической активности, нами был проведен анализ литературы на предмет известности подобных структур и свойственной им биологической активности. Так, нами был найден единственный пример, описывающий противотуберкулезную активность у 4-фуранил-замещенных пиримидинов. Тогда как 2-морфолил-замещенные пиримидины обладают весьма широким спектром активностей. То есть, актуальность изучения подобных вновь синтезированных соединений из этой группы является очевидной (4,5).

Производные пиразина также обладают широким спектром биологической активности (рис.3). Однако, пожалуй, наиболее известным и ярким примером является «Пиразинамид» – противотуберкулезный лекарственный препарат. Известно, что наличие хотя бы одной циано-группы в производных пиразинов не всегда, но, как правило, придает им противотуберкулезную активность.

Кроме того, в настоящее время в мире идет активный поиск возможных модификаций производных пиразинамида, в частности, синтез *N*-(гет)арил- и *N*-бензил-карбоксамидов. Противотуберкулезная активность полученных соединений не велика, однако в ряде случаев превышает

активность самого пиразинамида, используемого в качестве препарата сравнения(6,7).

Также, одним из новых актуальных направлений поиска противотуберкулезных соединений является изучение туберкулостатической активности у 2,3-дицианопиразинов (рис.4).

Данные о результатах исследования туберкулостатической активности 2,5- и 4,5-дизамещенных, а также 2,4,5-тризамещенных пиримидинов представлены на рис.5.

Результаты исследования туберкулостатическая активность пирaziнов, замещенных 2,3-дицианопиразинов и 2(1*H*)-пирaziнонов представлены на рисунке 5. Из 22 вновь синтезируемых производных пирaziнов только три соединения проявили активность 0,75 мг/мл в отношении различных штаммов микобактерий.

Полиазотсодержащие гетероциклы обладают акцепторным характером и большим количеством гетероатомов в структуре, имеют дополнительные возможности невалентного связывания с различными биологическими мишенями. Кроме того, высокая электрофильность тетразинового цикла может обеспечить химическое связывание с патогенными микроорганизмами, приводящее к нарушению их дыхательной функции (8,9).

Исследования противотуберкулезной активности были проведены у синтезированных соединений: несимметричные 3,6-дизамещенные 1,2,4,5-тетразины, содержащие остатки эфиров аминокислот и аминов, в том числе пиридина, являющегося аналогом ряда противотуберкулезных препаратов группы гидразида изоникотиновой кислоты (изониазид, фтивазид, метаизид и др.). Данные соединения проявили антимикобактериальную активность в отношении штамма H37Rv с минимальной ингибирующей концентрацией (MIC) 0,15-12,5 мкг/мл (рис.6).

Перспективным направлением поиска новых лекарственных средств является синтез и биоскрининг полиазотсодержащих азолоазинов, в частности, азолоаннелированных тетразинов (10).

Проведено исследование противотуберкулезной активности ряда синтезированных соединений. Выявлено 2 вещества, активность которых сравнима с данными для используемого препарата рифампицина. Показано, что данные соединения являются ингибиторами протеинкиназ *Mycobacterium tuberculosis* и могут рассматриваться как перспективные противотуберкулезные средства с новым механизмом действия (рис.7). Известны методы получения мембраноактивных противотуберкулезных препаратов путем сочетания фармакофорного и транспортного фрагментов. В качестве фармакофоров использовали гетероциклические молекулы известных противотуберкулезных или антибактериальных препаратов (11,12). В 1997 году были изучены некоторые соединения, полученные по технологии мембраноактивных противотуберкулезных препаратов (подандов). Проведенные исследования нескольких подандов позволили выявить активное соединение, которое проявляет бактериостатическую активность в отношении микобактерий и других микроорганизмов (рис.8)

Полученные соединения обладают высокой активностью и специфичностью в отношении микобактерий туберкулеза при низкой токсичности.

В настоящее время разработаны методы получения ингибиторов ферментов МБТ путем имитации природного субстрата фермента МБТ (рис. 9). Были выбраны два фермента, ответственные за синтез основных компонентов оболочки МБТ – миколовых кислот и полисахаридов (арабинана, галактана) (12,13)

Расчетными методами показано, что замещенные дигидропиримидины (в том числе, поданды) являются потенциальными

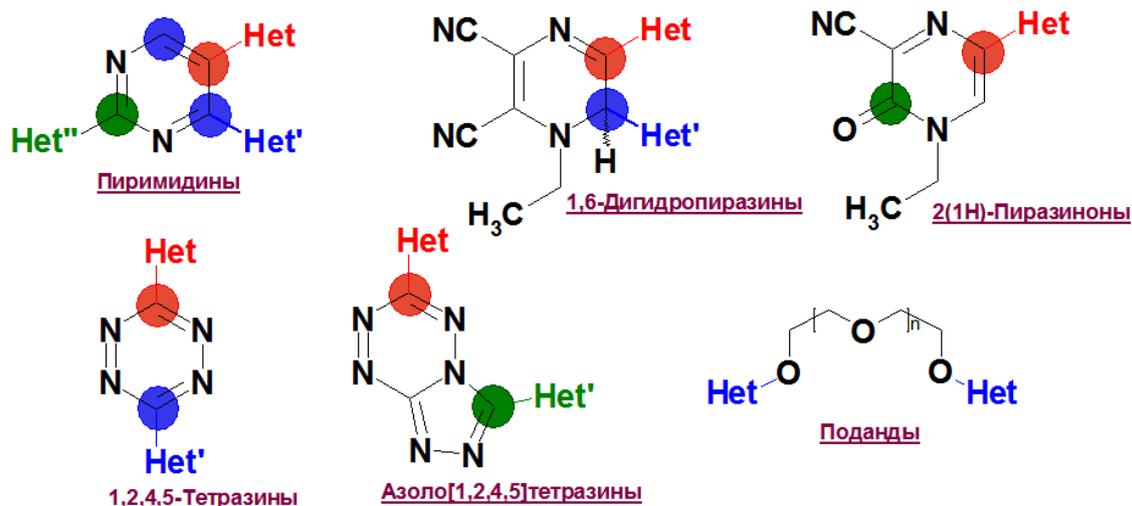
ингибиторами DHFR микобактерии туберкулеза и хорошо размещаются в ее кармане. При этом дигидропиримидиновый фрагмент является фармакофорным, а подандный – транспортным. Хорошее соответствие наблюдаемой и расчетной величины минимальной ингибирующей концентрации МИК свидетельствует о правильности созданной «рецепторной модели», и о возможности ее использования для молекулярного дизайна мембранотропных противотуберкулезных препаратов. Эта технология позволяет моделировать и создавать активные соединения, отвечающие за блокирование и ингибирование транскрипционных и транспортных молекул микобактерий (14,15,16).

Полученные результаты (табл.1) согласуются с экспериментальными данными по туберкулостатической активности новых соединений, которые отличаются высокой активностью и специфичностью в отношении микобактерий туберкулеза при низкой токсичности. Некоторые из соединений проявили положительный терапевтический эффект.

Список литературы

1. Р.И. Ишметова, Г.Л. Русинов, М.А. Кравченко, Д.Г. Береснев, В.Г. Китаева, Е.И. Толстых, В.А. Соколов, О.Н. Чупахин, Хим-фарм. журн., 2000, 34(8), 23.
2. Патент РФ 2153878, 2000
3. Dye, C. *Nature Reviews Microbiology* **2009**, 7, 81.
4. Ginsberg, A. M. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* **2008**, 29, 552.
5. Showalter, H. D. H.; Denny, W. A. *Tuberculosis* **2008**, 88, supplement 1, S3.
6. WHO Global Tuberculosis Report, **2014**.
http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

7. Goldman, R. C.; Plumley, K. V.; Laughon, B. E. *Infectious Disorders* **2007**, 7, 73.
8. Nguyen, L.; Thompson, C. J. *Trends in Microbiology*, **2006**, 14, 304.
9. Dolezal, M.; Zitko, M. *Expert Opin. Ther. Patents* **2015**, 25, 33.
10. Kaval, N.; Appukkuttan, P.; Van der Eycken, E. *Topics in Heterocyclic Chemistry*; Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg, **2006**, Vol. 1, pp. 267-304.
11. Jansen, R.; Sood, S.; Mohr, K. I.; Kunze, B.; Irschik, H.; Stadler, M.; Müller, R. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 2545.
12. Couturier, C.; Silve, S.; Morales, R.; Pessegue, B.; Llopart, S.; Nair, A.; Bauer, A.; Scheiper, B.; Pöverlein, C.; Ganzhorn, A.; Lagrange, S.; Bacqué. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 1455.
13. Verbitskiy, E. V.; Toporova, M. S.; Kodess, M. I.; Ezhikova, M. A.; Isenov, M. L.; Pervova, M. G.; Kravchenko, M. A.; Medvinskiy, I. D.; Skornyakov, S. N.; Rusinov, G. L.; Charushin, V. N. *ARKIVOC* **2014**, V, 274.
14. Verbitskiy, E. V.; Slepukhin, P. A.; Kravchenko, M. A.; Skornyakov, S. N.; Evstigneeva, N. P.; Kungurov, N. V.; Zil'berberg, N. V.; Rusinov, G. L.; Chupakhin, O. N.; Charushin, V. N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 524.
15. Verbitskiy, E. V.; Berezin, M. V.; Slepukhin, P. A.; Zabelina, O. N.; Rusinov, G. L.; Charushin, V. N. *Russ. Chem. Bull.* **2011**, 60, 906.
16. Handbook of Anti-Tuberculosis Agents. *Tuberculosis.* **2008**, 88, 85.



Het - гетроциклический заместитель

Рисунок 1. Объекты исследования



M. L. Read et al. / *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 3885–3897

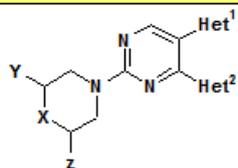
Антиоцицептивная и противовоспалительная активности;
 Лечение нарушения обмена веществ, атеросклеротической болезни,
 избыточной пролиферации клеток, сосудистой адгезии,
 воспалительных заболеваний дыхательных путей;
 Регуляция работы ряда рецепторов центральной нервной системы
 и рецепторы эпидермального фактора роста.

Виды активностей:

- Снотворная;
- Противоопухолевая;
- Противовирусная;
- Антибактериальная

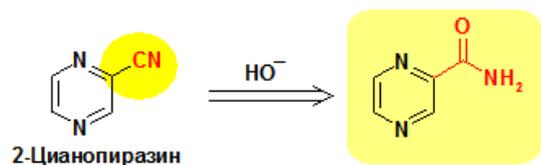
Comprehensive Heterocyclic Chemistry I, 1996.
 Vol. 3. Chapter 2.13

Основы органической химии лекарственных веществ,
 Химия, Москва, 2001. 192 с.



US Pat. 0032485; *Chem. Abstrs.*, 2007, **146**, 229322.
 WO Pat. 095395; *Chem. Abstrs.*, 2005, **143**, 387010.
 WO Pat. 012747; *Chem. Abstrs.*, 2010, **152**, 238772.
 WO Pat. 145360; *Chem. Abstrs.*, 2009, **152**, 121351.
 WO Pat. 002246; *Chem. Abstrs.*, 2008, **148**, 128248.
 WO Pat. 061491; *Chem. Abstrs.*, 2005, **143**, 115570.
 WO Pat. 003264; *Chem. Abstrs.*, 2012, **156**, 122350.
 WO Pat. 034600; *Chem. Abstrs.*, 2008, **148**, 403072.
 WO Pat. 101546; *Chem. Abstrs.*, 2004, **142**, 23307.
 WO Pat. 055942; *Chem. Abstrs.*, 2012, **156**, 613424
 WO Pat. 109605; *Chem. Abstrs.*, 2009, **151**, 328872.

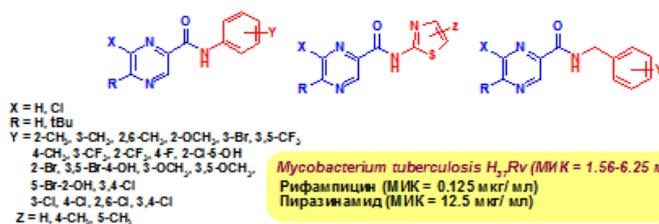
Рисунок 2. Производные пиразинамидов – биологически активные вещества и лекарственные препараты



Пиразинамид (Pyrazinamide)



Производные *N*-(Гет)арил- и *N*-бензил-пиразин-2-карбоксамида



M. Dolezal, et al.

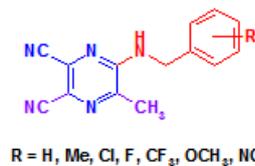
// *Molecules*, 2002, Vol. 7, P. 363-373.

// *Molecules*, 2006, Vol. 11, P. 242-256.

// *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, Vol. 7, P. 1105-1113.

Molecules, 2010, Vol. 15, P. 8567-8581.

Производные 2,3-дицианопиразина



Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv (МИК = 6.25-100 мкг/мл)

Изониазид (МИК = 1.56 мкг/мл)

Пиразинамид (МИК = 12.5 мкг/мл)

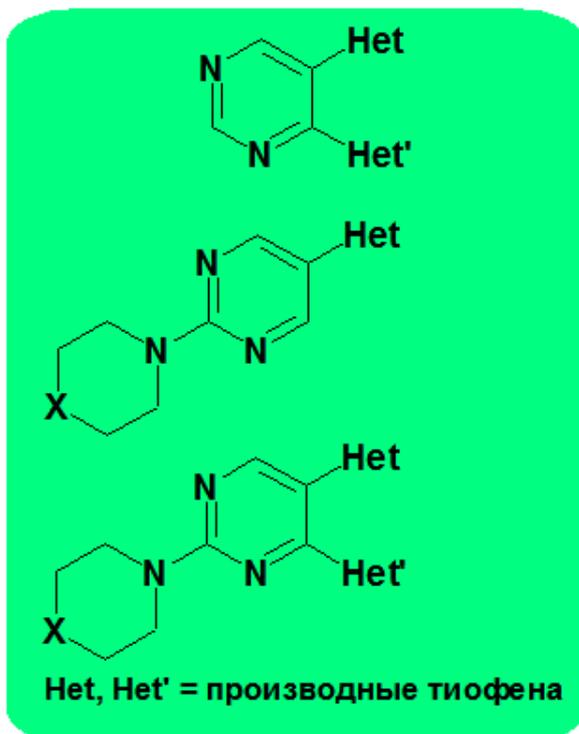
O. Jandourek, M. Dolezal, et al. // *Molecules*, 2014, Vol. 19, P. 651-671.

Рисунок 3. Производные пиразина

Туберкулостатическая активность в отношении

Mycobacterium tuberculosis H37Rv

(Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии)

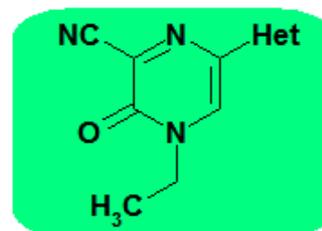


Entry	Compound	MIC (µg/mL)
1	VEV-919	12.5
2	HEM-72	12.5
3	VEV-977	12.5
4	VEV-963	12.5
5	VEV-1031	12.5
6	VEV-1011	12.5
7	HEM-120	12.5
8	VEV-1089	12.5
9	VEV-1091	12.5
10	VEV-1092	12.5
11	VEV-1093	12.5
12	VEV-1095	12.5
13	HEM-163	12.5
14	HEM-169	12.5
15	HEM-170	12.5
16	HEM-172	12.5
17	HEM-173	12.5
18	VEV-959b1	6.25
19	VEV-1028	6.25
20	VEV-1126	6.25
21	VEV-1127	6.25
22	HEM-45	6.25
23	HEM-142	6.25
24	HEM-117	6.25
25	HEM-118	6.25
26	VEV-976	3.1
27	HEM-121	3.1
28	VEV-981	1.5
29	VEV-1124	1.5
30	VEV-990	0.75
	Pyrazinamide	12.5
	Isoniazid	0.1

Рисунок 4. Туберкулостатическая активность замещенных пиразинов

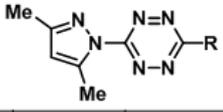
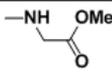
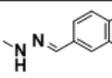
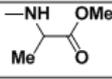
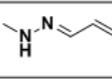
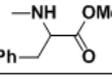
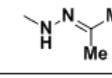
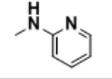
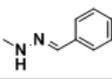
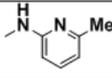
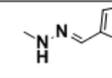
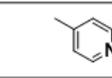


Entry	Compound	MIC (µg/mL)
1	VEV-918	12.5
2	VEV-981	12.5
3	VEV-892b	6.25
4	VEV-1075	6.25
5	VEV-1076	6.25
6	VEV-1077	6.25
7	VEV-1078	6.25
8	VEV-1079	6.25
9	VEV-1080	6.25
10	VEV-912	1.5
11	VEV-911b	0.75
12	VEV-919	0.75
	Pyrazinamide	12.5
	Isoniazid	0.1



Entry	Compound	MIC (µg/mL)
1	VEV-973	12.5
2	VEV-618	6.25
3	VEV-802	6.25
4	VEV-824	6.25
5	VEV-e92i	6.25
6	VEV-e98b	6.25
7	VEV-823b	6.25
8	VEV-480	3.1
9	VEV-796	3.1
10	VEV-738	0.75
	Pyrazinamide	12.5
	Isoniazid	0.1

Рисунок 5. Туберкулостатическая активность замещенных пиразинов

			
R	МИС, мкг/мл	R	МИС, мкг/мл
	12,5		0,15
	1,25		0,31
	12,5		0,15
	12,5		0,15
	12,5		1,5
-NHNH ₂	1,25		6,25

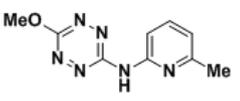
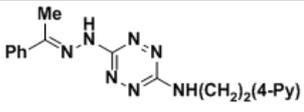
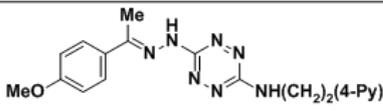
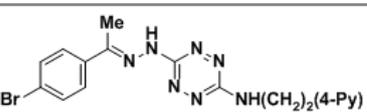
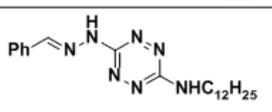
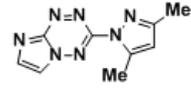
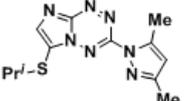
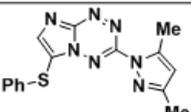
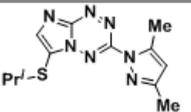
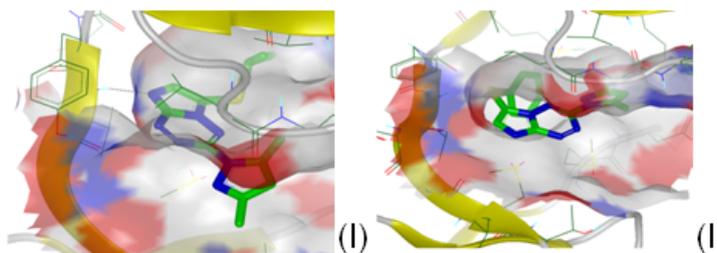
Формула	МИС, мкг/мл
	6,25
	6,25
	12,5
	6,25
	3,12

Рисунок 6. 1,2,4,5-тетразины, обладающие противотуберкулезными свойствами в отношении штамма H37RV

Активность в отношении штамма <i>M. Tuberculosis</i> H37Rv		
№	Формула	МИС, мкг/мл
1		12.5
2		1
3		1
	рифампицин	1
Активность в отношении штамма <i>M. Tuberculosis</i> MS-115 с MJTV		
2		1
	рифампицин	200



Молекулярный докинг для соединений 2 (I) и 3 (II) с протеинкиназой PknB *M. tuberculosis*

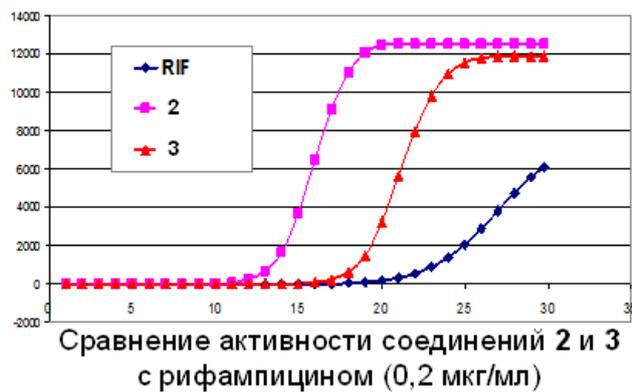


Рисунок 7. Ингибиторы протеинкиназ *Mycobacterium tuberculosis*

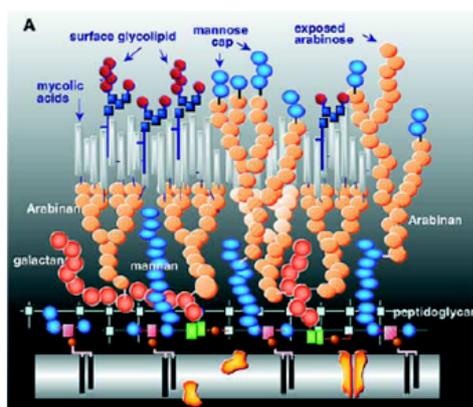


Рис. Структура оболочки микобактерии

Разработан подход
повышающий
туберкулостатическую
активность и специфичность
антибактериальных
препаратов при снижении
токсичности

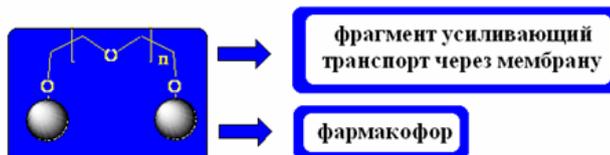


Рисунок 8. Создание мембраноактивных противотуберкулезных препаратов

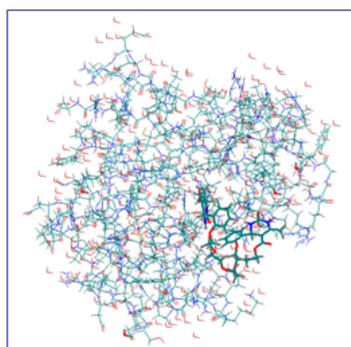


Рис. Размещение ингибитора в активном центре DHFR

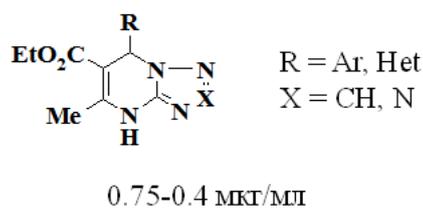
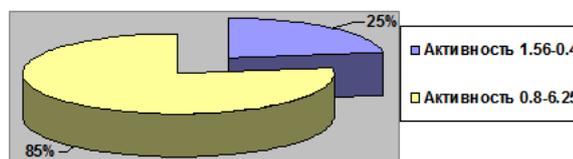
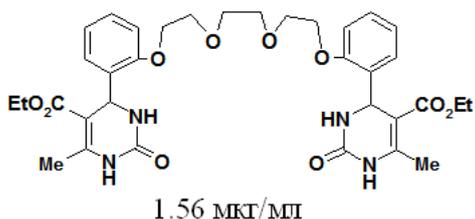


Рисунок 9. Дигидро(азоло)пиримидины и их поданды – потенциальные ингибиторы DHFR *Mycobacterium tuberculosis*

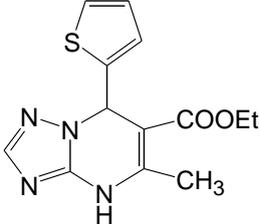
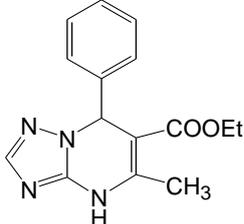
Соединения	Туберкулостатическая активность, мкг/мл	Острая токсичность, мг/кг	Терапевтический эффект
	0.75	>4000	Положительный (мышь)
	1.56	>5000	Положительный (мышь)
Изониазид	0.1	363	Положительный (мышь, м. свинки)

Таблица 1. Фармакологические свойства некоторых азолодигидропиримидинов