

На правах рукописи



САПОЖНИКОВ СЕРГЕЙ ВИТАЛЬЕВИЧ

**СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ
ПРОИЗВОДНЫХ ВИТАМИНА В₆**

02.00.16 - Медицинская химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Казань – 2020

Диссертация выполнена в Научно-образовательном центре фармацевтики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель:

Штырлин Никита Валерьевич

кандидат химических наук, старший научный сотрудник НОЦ фармацевтики ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Официальные оппоненты:

Яровая Ольга Ивановна

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» Сибирского отделения Российской академии наук

Богданов Андрей Владимирович

кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории фосфорсодержащих аналогов природных соединений Института органической и физической химии имени А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится 26 мая 2020 г. в 15 час. 30 мин. на заседании Диссертационного совета Д 002.102.02 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН) по адресу: 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, д. 1, зал Ученого совета. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИФАВ РАН по адресу: http://www.ipac.ac.ru/diss_sovet/

Автореферат разослан « ___ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 002.102.02

кандидат химических наук



С.В. Афанасьева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Профилактика и лечение инфекционных заболеваний является одной из важнейших задач современного здравоохранения. В последние годы в России и в мире растет число инфекций, вызываемых не чувствительными к антибиотикам и антисептикам штаммами бактерий. Подобный рост наблюдается как для внутрибольничных инфекций, возникающих в лечебно-профилактических учреждениях вследствие непосредственного распространения бактерий от пациента к пациенту, так и для внебольничных случаев заражения.

По данным официальной статистики ежегодно в России регистрируется от 50 до 60 тысяч случаев внутрибольничных инфекций, однако, по расчетным данным, эта цифра в 40–50 раз выше. При этом только в 2015 году от бактериальных инфекций в России умерло около 2500 человек. В Европейском союзе резистентные инфекции также приводят к значительному увеличению нагрузки на экономику и здравоохранение: число пациентов, погибших в результате резистентных бактериальных внутрибольничных инфекций, ежегодно составляет свыше 25 тысяч человек. Учитывая широкую распространенность и тяжесть последствий бактериальных инфекций, разработка безопасных высокоактивных препаратов с новыми механизмами антибактериального действия, эффективных в отношении, прежде всего, резистентных штаммов бактерий, является одной из важнейших задач медицинской химии.

Степень разработанности темы исследования. Несмотря на то, что четвертичные аммониевые соли используются в клинической практике более века, поиск новых антисептиков из этого класса соединений, обладающих низкой токсичностью и высокой противомикробной активностью в отношении, прежде всего, резистентных штаммов микроорганизмов, продолжает оставаться важнейшей задачей медицинской химии. Основываясь на результатах систематических исследований, проводимых в Казанском федеральном университете на протяжении последних двух десятилетий, можно было предположить, что введение в качестве фармакофора четвертичного аммониевого фрагмента в различные положения пиридинового кольца пиридоксина позволит приблизиться к решению этой очень актуальной для всего мирового здравоохранения задачи.

Цели и задачи работы. Целью настоящего диссертационного исследования является синтез широкого ряда четвертичных аммониевых соединений на основе производных витамина B₆, исследование их биологической активности и выявление перспективных кандидатов в антисептическое лекарственное средство. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- Осуществить направленный синтез широкого ряда четвертичных аммониевых соединений на основе производных витамина B₆ и провести первичный скрининг их антибактериальной активности *in vitro* с целью выявления наиболее активных «соединений-лидеров»;
- Провести углубленные исследования антибактериальной активности и токсичности *in vitro* «соединений-лидеров» с целью выявления среди них перспективных кандидатов в антисептическое лекарственное средство;
- Выявить взаимосвязь «структура - антибактериальная активность» в ряду синтезированных четвертичных аммониевых соединений.

Научная новизна работы. Впервые получен широкий ряд четвертичных аммониевых соединений на основе производных витамина B₆. Скрининг антибактериальной активности и токсичности синтезированных соединений *in vitro*

позволил выявить перспективного кандидата в антисептическое лекарственное средство. Разработан эффективный способ синтеза и отработана опытно-промышленная технология получения кандидата в антисептическое лекарственное средство. Установлены закономерности «структура - антибактериальная активность» для производных пиридоксина, содержащих четвертичный аммониевый фрагмент.

Теоретическая и практическая значимость работы. В ходе работы был получен широкий ряд ранее неописанных в литературе четвертичных аммониевых соединений на основе производных витамина В₆. В результате скрининга их антибактериальной активности и токсичности *in vitro* выявлен перспективный доклинический кандидат, который к настоящему времени успешно прошел стадию доклинических исследований и при последующем успешном прохождении клинических исследований может быть внедрен в медицинскую практику в качестве высокоэффективного антисептического лекарственного средства. В ходе работы обобщены закономерности «структура - активность», выявлены основные факторы, влияющие на антибактериальную активность синтезированных соединений.

Методология и методы исследования. Целевые соединения получены с использованием различных методов классического органического синтеза. Состав и структура соединений доказаны с помощью методов ЯМР-спектроскопии (¹H, ¹³C) и масс-спектрометрии высокого разрешения. Исследование антибактериальной активности и токсичности синтезированных соединений *in vitro* проводилось с использованием стандартных биологических методов: метода серийных разведений, пролиферативного МТТ-теста.

Положения, выносимые на защиту:

1. Методики синтеза четвертичных аммониевых соединений на основе производных витамина В₆;
2. Данные скрининга антибактериальной активности и токсичности синтезированных соединений *in vitro*;
3. Анализ взаимосвязей «структура - антибактериальная активность» в ряду четвертичных аммониевых соединений на основе производных витамина В₆;
4. Структура и свойства перспективного кандидата в антисептическое лекарственное средство;
5. Масштабируемая опытно-промышленная технология получения кандидата в антисептическое лекарственное средство.

Степень достоверности. Достоверность положений, выносимых на защиту, а также выводов диссертации подтверждена использованием современных методов идентификации химической структуры соединений и выполнением биологических исследований в контролируемых и воспроизводимых условиях с использованием необходимого числа повторностей.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на II, IV и VI Всероссийских конференциях с международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации» (Чебоксары, 2014, 2015, 2017), VIII Всероссийской конференции с международным участием молодых ученых «Менделеев-2014» (Санкт-Петербург, 2014), Кластере конференций по органической химии «ОргХим» (Санкт-Петербург, 2016), III Российской конференции по медицинской химии «МедХим-Россия 2017» (Казань, 2017), IV Российской конференции по медицинской химии «МедХим-Россия 2019» (Екатеринбург, 2019).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 202 страницах машинописного текста, содержит 70 рисунков, 22 схемы, 11 таблиц.

Диссертация состоит из введения, трех основных глав, заключения и списка литературы, насчитывающего 127 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Синтез и исследование антибактериальной активности четвертичных аммониевых соединений на основе витамина В₆

Методология синтеза четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) на основе производных витамина В₆ (пиридоксина) включала получение разнообразных структур, в которых осуществлялось варьирование целого ряда структурных параметров: введение одного или двух четвертичных аммониевых фрагментов в различные положения пиридинового кольца пиридоксина, варьирование заместителей у ацетального атома углерода и четвертичного атома азота, а также природы противоиона (рисунок 1).

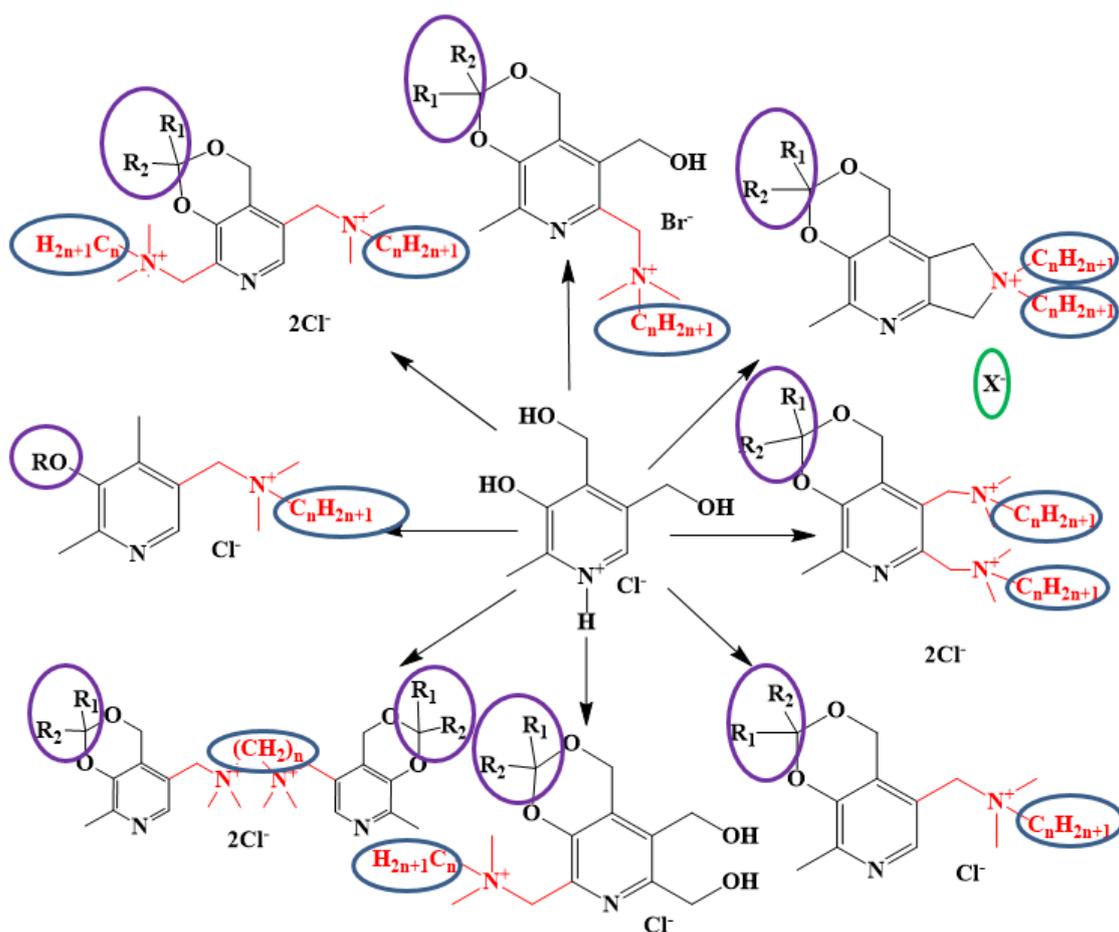


Рисунок 1. Методология синтеза четвертичных аммониевых соединений на основе производных пиридоксина.

Комбинация в одном соединении структурных фрагментов витамина В₆ и четвертичных аммониевых фрагментов с высокой вероятностью должна приводить к получению соединений, обладающих высокими показателями противомикробной активности, наряду с низкими токсическими эффектами. Мы полагаем, что наличие распознаваемого фрагмента витамина В₆ в структуре ЧАС не позволит бактериям задействовать все потенциально имеющиеся в их распоряжении механизмы выработки резистентности, включая системы обратного транспорта ксенобиотиков.

В рамках синтеза четвертичных аммониевых соединений на основе витамина В₆ на первом этапе исследования из гидрохлорида пиридоксина **1** в 4-6 стадий были получены соединения, содержащие четвертичные аммониевые фрагменты в 5-м или 6-м положениях пиридинового кольца пиридоксина.

Взаимодействием хлорпроизводного пиридоксина **3** с эквимольным количеством различных третичных аминов (N,N-диметилоктиламина, N,N-диметилдодециламина и N,N-диметилоктадециламина) по реакции Меншуткина в этаноле при 70 °С были получены моно-аммониевые соли **4а-в**, содержащие четвертичные аммониевые фрагменты в 5-м положении пиридинового кольца пиридоксина (схема 1). На последнем этапе синтеза осуществлялось снятие кетальной защиты у полученных аммониевых солей **4а-в** в кислой среде с использованием водного или водно-спиртового раствора соляной кислоты.

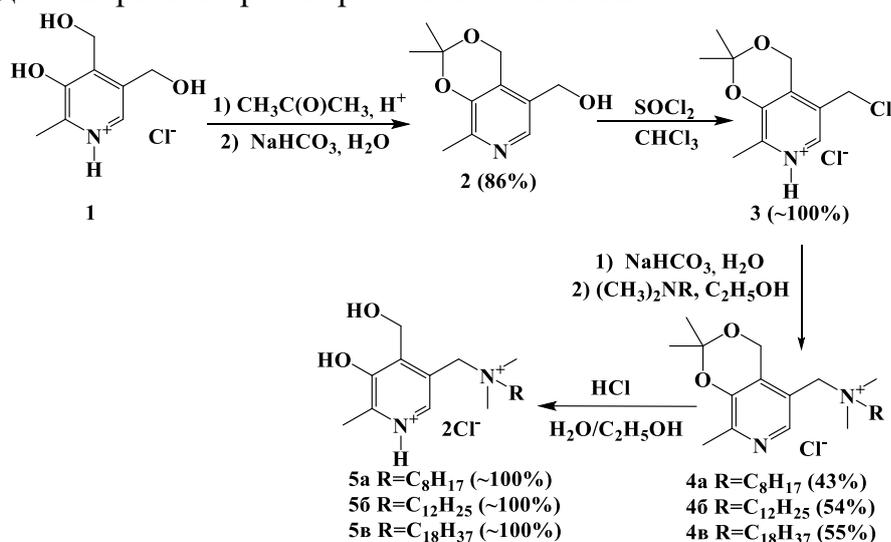


Схема 1

Синтез производных **10а-г** и **11а-г**, содержащих четвертичный аммониевый фрагмент в 6-м положении пиридинового кольца пиридоксина, осуществлялся на основе бромпроизводного **9** по схожей методике (схема 2).

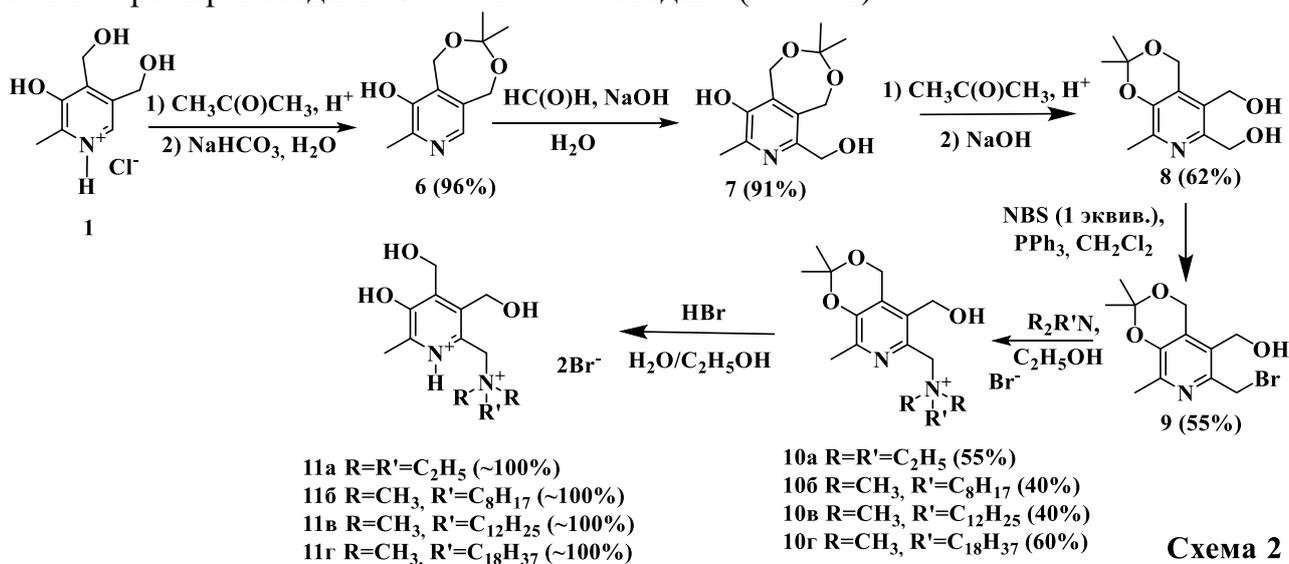


Схема 2

Исходным веществом для синтеза бис-аммониевых соединений, содержащих аммониевые фрагменты в 5-м и 6-м положениях пиридинового кольца пиридоксина, послужило дихлорпроизводное **12**. Бис-аммониевые соли **13а-в** были получены путем взаимодействия дихлорпроизводного **12** с двукратным мольным избытком

соответствующих аминов. На последнем этапе синтеза осуществлялось снятие кетальной защиты в кислой среде с образованием производных **14а-в** (схема 3).

Для получения аммониевых соединений **15а-ж** использовалась схожая синтетическая методика, заключающаяся в реакции алкилирования различных вторичных аминов (диметиламина, диэтиламина, *n*-дибутиламина, *n*-диоктиламина, дибензиламина, морфолина и пиперидина) эквимольным количеством дихлопроизводного **12** в присутствии карбоната калия (схема 3). Далее осуществлялось снятие кетальной защиты у аммониевых солей **15а-ж** в кислой среде с образованием производных **16а-ж**.

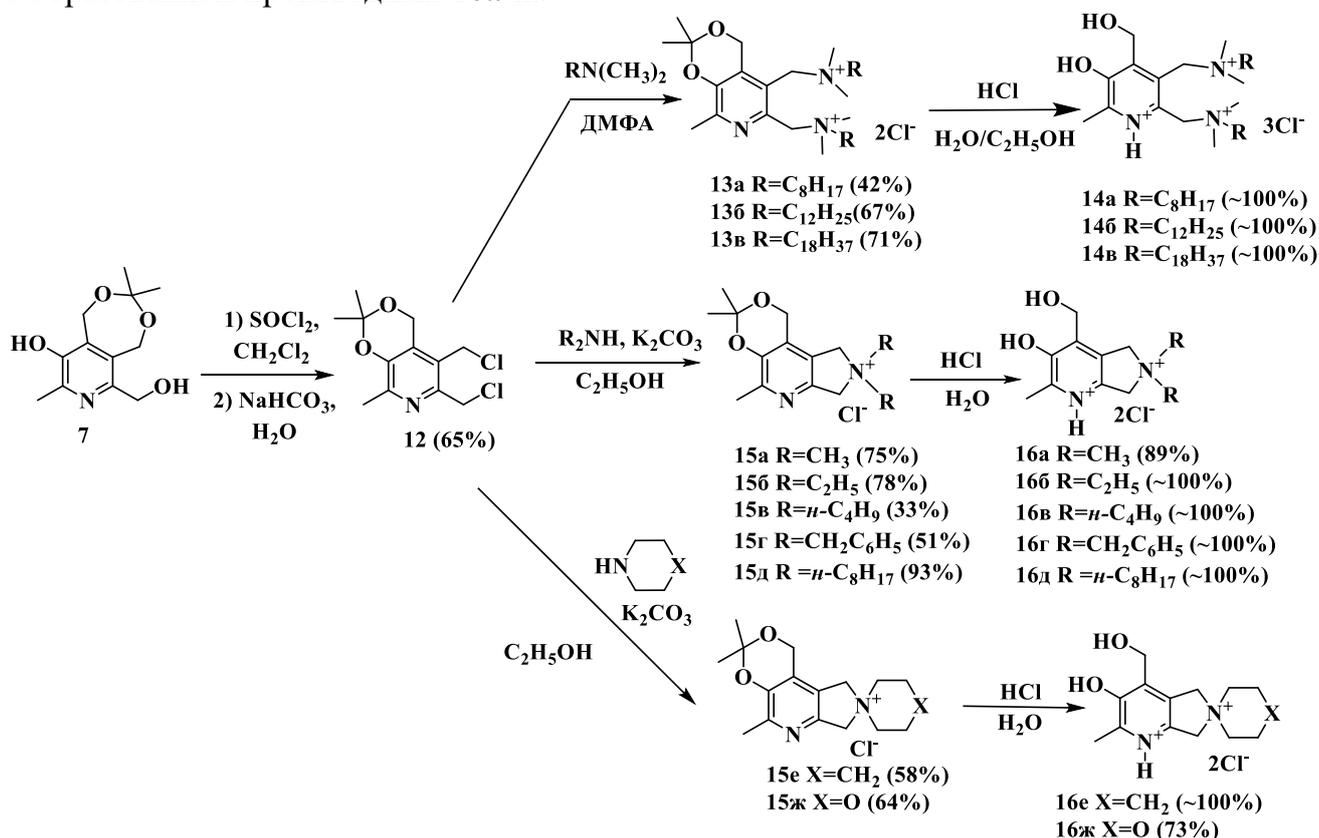


Схема 3

Первичный скрининг антибактериальной активности 34 синтезированных соединений был проведен на 6 бактериальных штаммах. В качестве препаратов сравнения выступали широко используемые в клинической практике антисептики мирамистин, бензалкония хлорид и хлоргексидин. Исследования были проведены в институте фундаментальной медицины и биологии КФУ под руководством д.б.н. Каюмова А.Р. В таблице 1 приведены величины МИК (минимальной ингибирующей концентрации) синтезированных соединений (зеленым выделены наиболее активные соединения).

Таблица 1. Антибактериальная активность *in vitro* четвертичных аммониевых соединений на основе пиридоксина **4а-в**, **5а-в**, **10а-г**, **11а-г**, **13-16**.

Соединение	МИК (мкг/мл)					
	Грамположительные бактерии			Грамотрицательные бактерии		
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. epidermidis</i> (клинич.)	<i>M. luteus</i> (клинич.)	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. typhimurium</i> TA100	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
4а	>64	>64	>64	>64	>64	>64
4б	8	4	8	32	8	>64

4в	4	16	16	>64	>64	>64
5а	>64	>64	>64	>64	>64	>64
5б	32	16	32	>64	16	>64
5в	64	16	64	>64	>64	>64
10а	>64	>64	>64	>64	>64	>64
10б	64	64	64	64	64	500
10в	64	4	2	8	8	>64
10г	64	32	32	>64	>64	>64
11а	>64	>64	>64	>64	>64	>64
11б	>64	>64	>64	>64	>64	>64
11в	>64	>64	>64	>64	>64	>64
11г	>64	64	64	>64	32	>64
13а	4	4	4	16	16	64
13б	4	64	4	>64	4	32
13в	>64	>64	>64	>64	>64	>64
14а	64	64	64	>64	>64	>64
14б	>64	16	32	32	32	>64
14в	>64	>64	>64	>64	>64	>64
15а	>64	>64	>64	>64	>64	>64
15б	>64	>64	>64	>64	>64	>64
15в	>64	>64	>64	>64	>64	>64
15г	>64	>64	>64	>64	>64	>64
15д	4	4	4	>64	32	>64
15е	>64	>64	>64	>64	>64	>64
15ж	>64	>64	>64	>64	>64	>64
16а	>64	>64	>64	>64	>64	>64
16б	>64	>64	>64	>64	>64	>64
16в	>64	>64	>64	>64	>64	>64
16г	>64	>64	>64	>64	>64	>64
16д	8	16	16	>64	64	>64
16е	>64	>64	>64	>64	>64	>64
16ж	>64	>64	>64	>64	>64	>64
Бензалкония хлорид	1	2	0.5	8	0.5	64
Мирамистин	2	2	4	64	16	64
Хлоргексидин	2	1	0.5	1	4	64

Среди моно-аммониевых соединений, содержащих аммониевые фрагменты в пятом или шестом положениях пиридинового цикла, наиболее активным оказалось соединение **4б**, содержащее четвертичный аммониевый фрагмент в пятом положении пиридинового кольца пиридоксина и додецильный заместитель у четвертичного атома азота. В целом, соединения **4а-в**, содержащие четвертичный аммониевый фрагмент в пятом положении пиридоксина, обладают более высокой антибактериальной активностью по сравнению с производными **10а-г**, содержащими четвертичный аммониевый фрагмент в шестом положении.

Среди моно-аммониевых солей, содержащих пирролидиновый цикл, антибактериальная активность проявляется только для соединений **15д** и **16д**, содержащих при четвертичном атоме азота два октильных заместителя.

Среди бис-аммониевых соединений наиболее активными оказались соединения, содержащие октильный и додецильный заместители при четвертичных атомах азота **13а** и **13б**, проявившие хорошую активность как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. Антибактериальная активность бис-аммониевых соединений, в целом, была сопоставима с активностью моно-аммониевых соединений **4а-в**.

Стоит также отметить общую закономерность, заключающуюся в практически полном отсутствии антибактериальной активности у соединений без кетальной защиты ароматической гидроксильной группы. При этом все полученные соединения уступали по своей активности препаратам сравнения.

Таким образом, по результатам первичного скрининга антибактериальной активности 34 четвертичных аммониевых соединений на основе производных пиридоксина были отобраны 4 «соединения-лидера» (**4б**, **13а**, **13б** и **15д**).

Далее проводилось варьирование заместителей при ацетальном атоме углерода для соединений, содержащих аммониевый фрагмент в пятом положении пиридоксина. Для этого первоначально проводилось получение шестичленных ацеталей **18а-и** с их последующим хлорированием хлористым тионилом. На последней стадии взаимодействием хлорпроизводных **19а-з** с третичными аминами были получены четвертичные аммониевые производные **20а-з** и **21а-б**. Стоит отметить, что низкий выход продукта **18а** обусловлен образованием различных продуктов олигомерной природы, в частности, димера **17** (схема 4).

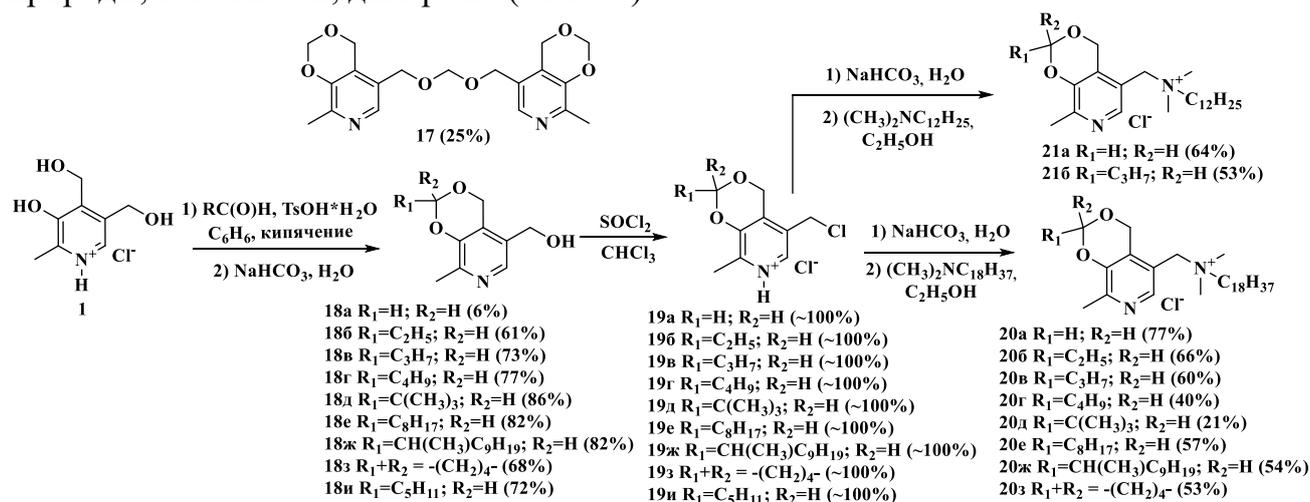


Схема 4

Получение моно-аммониевых соединений, в которых гидроксиметильная группа в 4-м положении пиридинового кольца замещалась на метильную, осуществлялось в 6 стадий (схема 5).

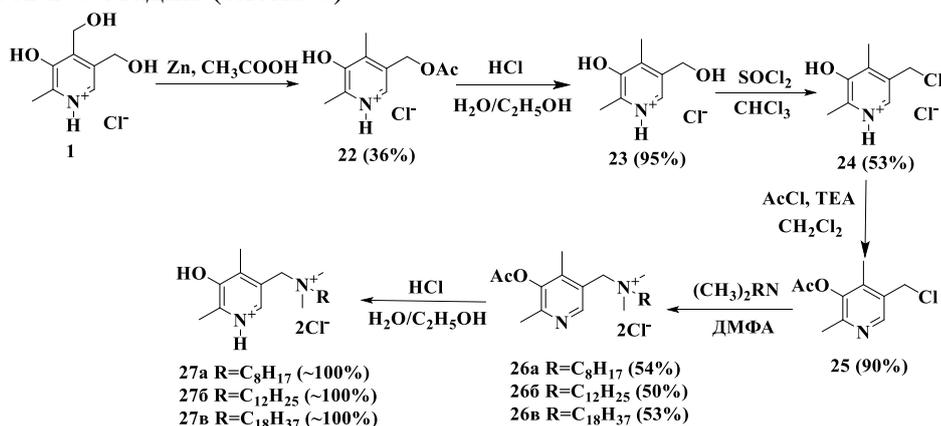


Схема 5

Введение четвертичного аммониевого фрагмента во второе положение пиридинового кольца пиридоксина проводилось в восемь стадий (схема 6). В полученных моно-аммониевых соединениях **33а,б** последовательно гидролизовали сначала семичленный кетальный цикл, а затем в кислой среде шестичленный цикл, с образованием соответствующих соединений **34а,б** и **35а,б**.

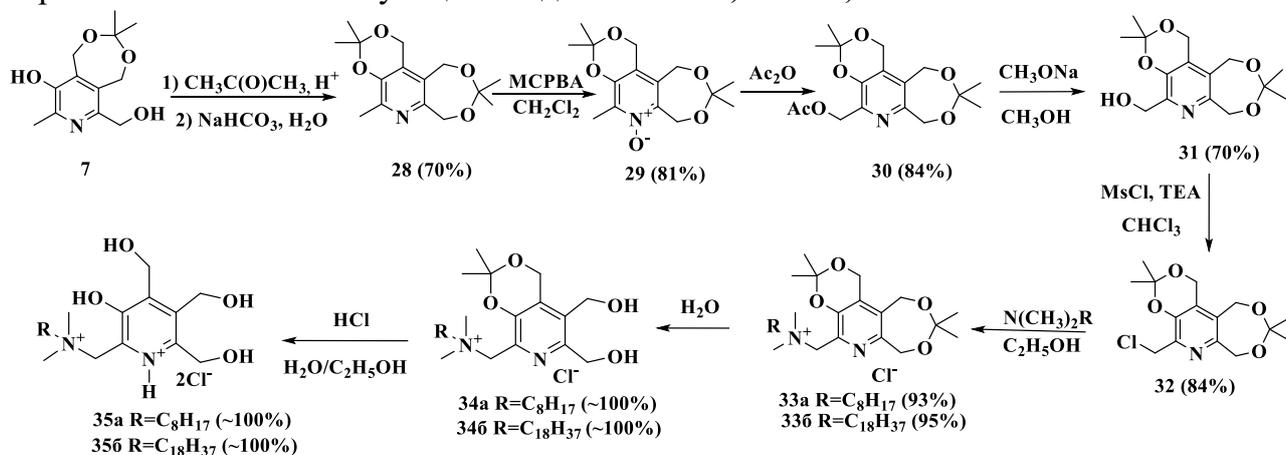


Схема 6

Для соединений, где четвертичный атом азота входит в состав пирролидинового цикла, осуществлялось варьирование природы противоиона и заместителей у ацетального атома углерода. При этом, в качестве липофильных заместителей при атоме азота выступали два октильных заместителя. Моно-аммониевые соединения **41а-б, 37** и **42** были получены в соответствии со схемой 7.

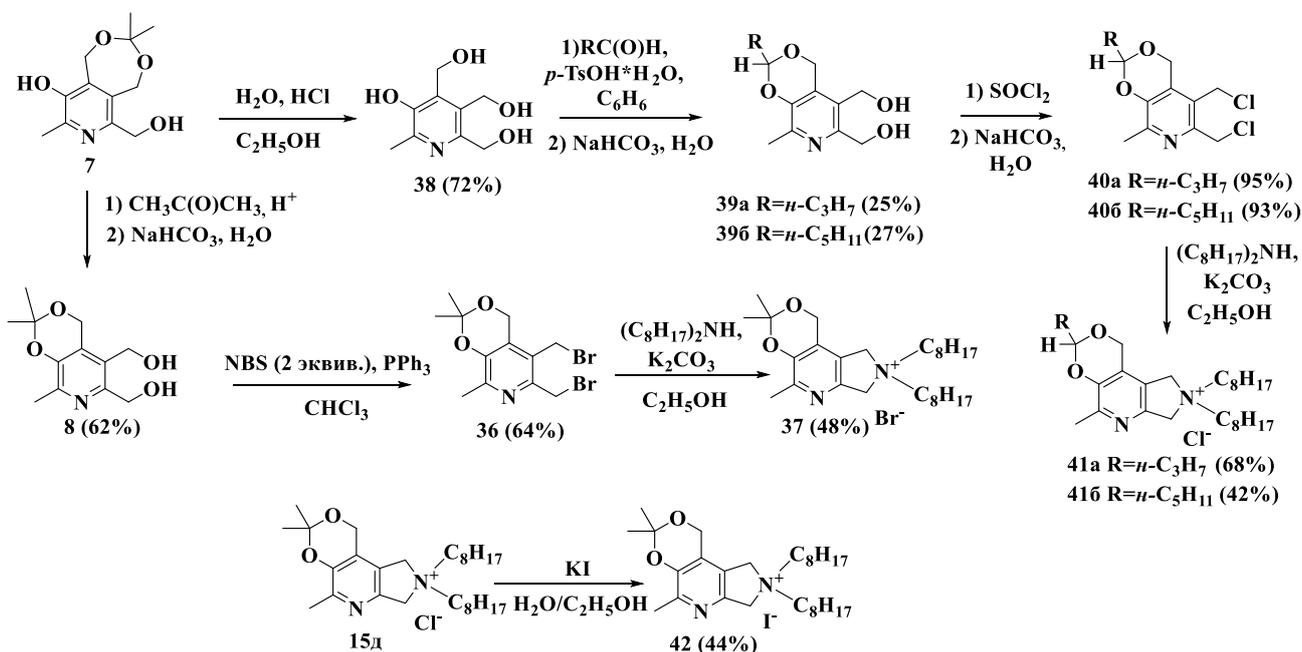


Схема 7

Синтез соединений, содержащих четвертичные аммониевые фрагменты во втором и пятом положениях пиридинового кольца пиридоксина с варьированием заместителей у атома азота, представлен на схеме 8.

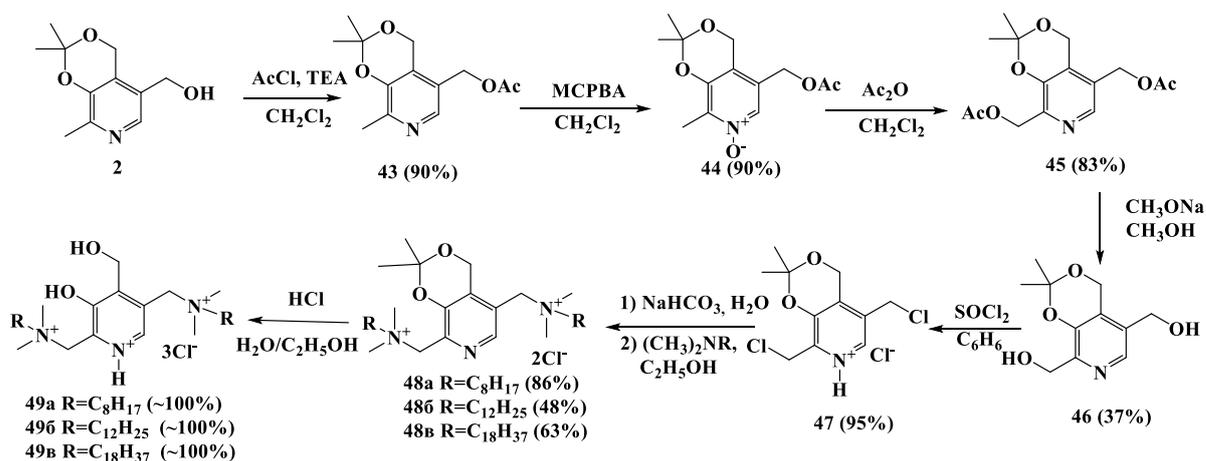


Схема 8

Представляло интерес и получение ряда бис-аммониевых соединений, в которых два пиридоксиновых фрагмента соединены алифатическим линкером с варьируемым количеством метиленовых групп (схема 9).

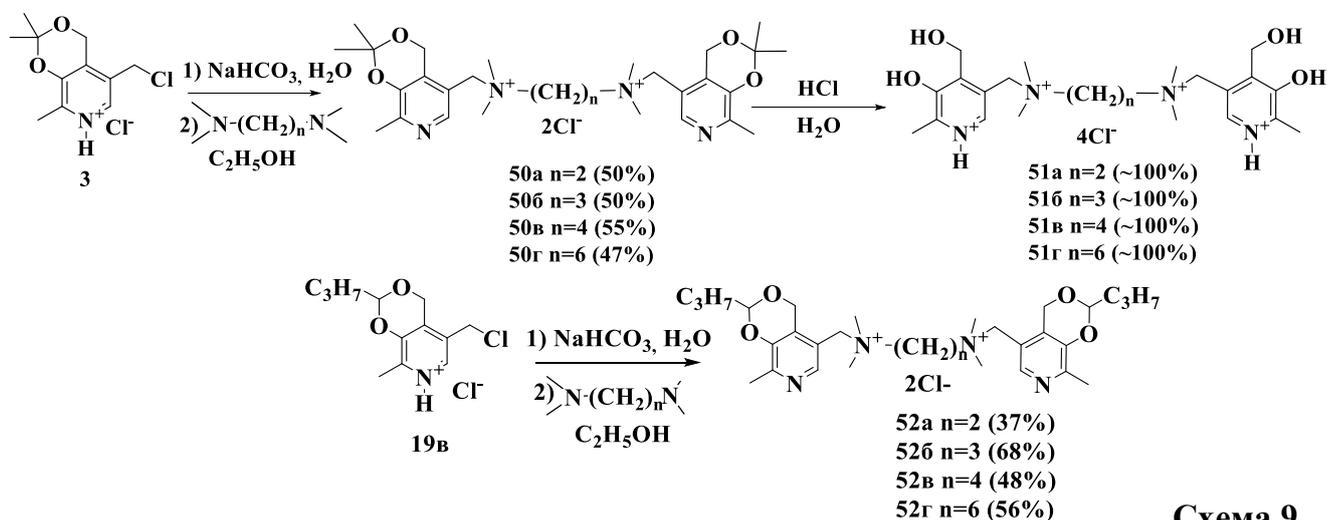


Схема 9

Величины МИК 42 четвертичных аммониевых солей, полученных на втором этапе исследования, представлены в таблице 2 (зеленым выделены наиболее активные соединения). Исследования были проведены в институте фундаментальной медицины и биологии КФУ под руководством д.б.н. Каюмова А.Р.

Таблица 2. Антибактериальная активность *in vitro* четвертичных аммониевых соединений на основе пиридоксина **20а-з**, **21а-б**, **26а-в**, **27а-в**, **34а-б**, **35а-б**, **37**, **41а-б**, **42**, **48-52** и реперных соединений.

Соединение	МИК (мкг/мл)					
	Грамположительные бактерии			Грамотрицательные бактерии		
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. epidermidis</i> (клинич.)	<i>M. luteus</i> (клинич.)	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. typhimurium</i> TA100	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
20а	4	4	2	>64	4	>64
20б	2	4	32	>64	>64	64
20в	2	8	8	>64	>64	>64
20г	8	4	8	>64	>64	>64
20д	2	64	>64	>64	8	>64

20е	>64	>64	>64	>64	>64	>64
20ж	64	64	16	>64	>64	16
20з	8	4	4	>64	>64	>64
21а	4	4	8	8	8	>64
21б	1	1	2	32	2	>64
26а	>64	>64	>64	>64	>64	>64
26б	>64	32	>64	>64	>64	>64
26в	32	2	4	4	8	>64
27а	>64	>64	>64	>64	>64	>64
27б	>64	>64	>64	>64	>64	>64
27в	8	4	8	2	16	>64
34а	64	64	64	>64	>64	>64
34б	2	2	2	>64	>64	>64
35а	>64	>64	>64	>64	>64	>64
35б	8	4	8	>64	>64	>64
37	4	4	0.5	8	2	>64
41а	4	0.5	0.5	4	2	>64
41б	0.5	0.5	0.5	2	0.5	>64
42	4	1	2	32	8	>64
48а	16	32	32	16	>64	>64
48б	2	2	2	2	4	32
48в	>64	>64	>64	>64	>64	>64
49а	16	16	4	2	2	>64
49б	4	16	4	2	2	>64
49в	>64	>64	>64	>64	>64	>64
50а	>64	>64	>64	>64	>64	>64
50б	>64	>64	>64	>64	>64	>64
50в	>64	>64	>64	>64	>64	>64
50г	>64	>64	>64	>64	>64	>64
51а	>64	>64	>64	>64	>64	>64
51б	>64	>64	>64	>64	>64	>64
51в	>64	>64	>64	>64	>64	>64
51г	>64	>64	>64	>64	>64	>64
52а	>64	>64	>64	>64	>64	>64
52б	>64	>64	>64	>64	>64	>64
52в	>64	>64	>64	>64	>64	>64
52г	>64	>64	>64	>64	>64	>64
Бензалкония Хлорид	1	2	0.5	8	0.5	64
Мирамистин	2	2	4	64	16	64
Хлоргексидин	2	1	0.5	1	4	64

Для моно-аммониевых соединений **20г-ж**, содержащих бутильный и более липофильные заместители при ацетальном атоме углерода, практически отсутствуют антибактериальные свойства. Соединения, содержащие менее липофильные заместители **20а-в,з** и **21а,б** проявляют активность на грамположительных бактериях, в целом, сопоставимую с **4б**. При этом соединение **21б**, содержащее додецильный фрагмент при четвертичном атоме азота и пропильный заместитель при ацетальном атоме углерода, существенно превосходит **4б** по антибактериальной активности.

Среди соединений, содержащих метильную группу в 4-м положении пиридинового кольца (соединения **26а-в**, **27а-в**), антибактериальную активность проявляют только соединения, содержащие октадецильный фрагмент при четвертичном атоме азота (**26в**, **27в**). При этом антибактериальная активность полученных соединений сопоставима с моно-аммониевым производным **4б**.

Введение четвертичного аммониевого фрагмента во второе положение пиридинового кольца пиридоксина (соединения **34а-б**, **35а-б**), приводит к снижению активности на фоне производных, содержащих четвертичные аммониевые фрагменты в пятом положении пиридоксина.

Замена двух метильных групп при ацетальном атоме углерода шестичленного цикла в соединении **15д**, где четвертичный атом азота входит в состав пирролидинового цикла, на пропильный **41а** или пентильный **41б** заместители, сопровождается увеличением активности в отношении всех штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Варьирование противоиона, при замене хлорид-аниона в соединении **15д** на йодид и бромид, не влияет на антибактериальную активность.

Введение двух четвертичных аммониевых фрагментов во второе и пятое положения пиридоксина (соединения **48а-в**) положительно сказывается на антибактериальной активности в сравнении с соединениями **13а-в**, содержащими аммониевые фрагменты в пятом и шестом положениях пиридоксина. При этом соединение **48б**, содержащее при четвертичных атомах азота додецильные заместители, проявляет высокую антибактериальную активность, в том числе и в отношении штамма *P. aeruginosa*, на который другие соединения действуют не очень эффективно.

Заметим, что варьирование количества метиленовых групп в алифатическом линкере в бис-аммониевых солях **50а-г**, **51а-г**, **52а-г** не приводит к появлению у этих соединений антибактериальной активности.

Таким образом, по результатам первичного скрининга антибактериальной активности 42 четвертичных аммониевых солей, полученных на втором этапе исследования, было отобрано еще 5 «соединений-лидеров» (**21б**, **26в**, **27в**, **41б** и **48б**).

2. Углубленное исследование антибактериальной активности и токсичности «соединений-лидеров» *in vitro*

Для 9 отобранных «соединений-лидеров» была проведена оценка токсичности *in vitro* на эмбриональных клетках почки человека НЕК-293 с использованием МТТ-теста. Исследования были проведены в НОЦ фармацевтики КФУ под руководством к.б.н. Иксановой А.Г. Установлено, что шесть соединений обладают более низкой токсичностью по сравнению с реперными препаратами мирамистином и хлоридом бензалкония. Три других соединения (**15д**, **27в** и **41б**), проявивших высокую цитотоксичность, были исключены из дальнейших исследований (таблица 3, выделены красным).

Таблица 3. Значения CC_{50} «соединений-лидеров» на эмбриональных клетках почки человека НЕК-293.

Соединение	4б	13а	13б	15д	21б	26в	27в	41б	48б	Мирамистин	Бензалкония хлорид
CC_{50} , мкг/мл	1.4	11.0	7.0	0.3	2.8	3.2	0.5	0.2	7.0	1.5	0.4

Для 6 отобранных соединений было осуществлено углубленное исследование антибактериального действия на 17 штаммах бактерий (в т.ч. 16 клинических) в ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе" под руководством д.б.н. Мирчинк Е.П. (таблица 4). В качестве препарата сравнения был выбран мирамистин. Результаты проведенного исследования *in vitro* показали, что соединение **486** можно рассматривать в качестве перспективного доклинического кандидата, сопоставимого по антибактериальной активности и превосходящего по безопасности широко применяемые в медицинской практике бензалкония хлорид и мирамистин.

Таблица 4. Антибактериальная активность *in vitro* «соединений-лидеров» с низкой цитотоксичностью.

Штамм	МИК (мкг/мл)						
	46	13a	136	216	26в	486	Мирамистин
1. <i>S. aureus</i> 700699 ATCC	4	16	2	2	1	1	2
2. <i>S. aureus</i> 100 MRSA	4	8	1	1	1	1	2
3. <i>S. aureus</i> 5 MRSA	4	8	2	2	1	0.5	4
4. <i>S. aureus</i> 6 MRSA	4	8	1	1	1	0.5	2
5. <i>S. aureus</i> 3797 MRSA	8	32	1	2	2	0.5	4
6. <i>S. aureus</i> 3798 MRSA	4	8	2	2	1	0.5	2
7. <i>S. aureus</i> 4603 MRSA	4	4	2	1	1	0.5	4
8. <i>S. haemoliticus</i> 161	4	4	2	2	2	1	4
9. <i>S. haemoliticus</i> 1025	16	8	2	2	1	0.5	4
10. <i>S. haemoliticus</i> 602	16	8	2	4	2	1	4
11. <i>S. haemoliticus</i> 585	32	8	2	8	4	0.5	2
12. <i>S. epidermidis</i> 681	2	4	1	1	4	1	1
13. <i>S. epidermidis</i> 9	8	8	1	2	4	1	2
14. <i>E. faecalis</i> 560	4	16	1	2	4	0.5	2
15. <i>E. faecium</i> 569	2	16	1	1	2	0.5	1
16. <i>E. faecium</i> 101	8	-	1	2	4	1	2
17. <i>E. coli</i> 396	32	-	32	32	>64	16	32

3. Разработка доклинического кандидата в антисептическое лекарственное средство

Важнейшим требованием к современным лекарственным средствам является их высокая стабильность при хранении в течение длительного времени. Испытания 0.2% водного раствора соединения **486** были проведены методом «ускоренного старения» при 40 °С с использованием метода ВЭЖХ. Как показали результаты исследования, соединение **486** в водном растворе оказалось крайне нестабильным вследствие гидролиза шестичленного кетального цикла, приводящего к образованию продукта **496**. По этой причине **486** нельзя рассматривать в качестве перспективного доклинического кандидата. С целью увеличения гидролитической устойчивости была проведена биоизостерная замена диметилкетального цикла в соединении **486** на значительно более устойчивый к гидролизу ацетальный цикл с этильным заместителем у атома углерода, с сохранением всех остальных элементов химической структуры (рисунок 2).

Биоизостерная замена

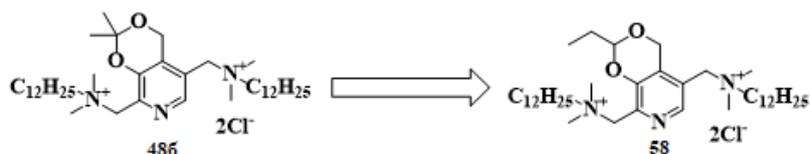


Рисунок 2. Биоизостерная замена диметилкетального цикла на ацетальный в соединении **486**.

На первых стадиях, взаимодействием с пропионовым альдегидом было получено соединение **186**, которое затем ацилировалось хлористым ацетилем. Далее осуществлялось N-окисирование соединения **53** путем его обработки *m*-хлорпербензойной кислотой. На четвертой стадии проводилась перегруппировка полученной N-окиси **54** в среде уксусного ангидрида по реакции Бокельхейде. Далее, осуществлялось снятие ацетатной защиты в щелочной среде с последующим хлорированием диола **56** хлористым тионилем. Взаимодействие полученного хлорпроизводного **57** с двукратным мольным избытком *N,N*-диметилдодeciламина в этаноле приводило к образованию бис-аммониевой соли **58** (схема 10).

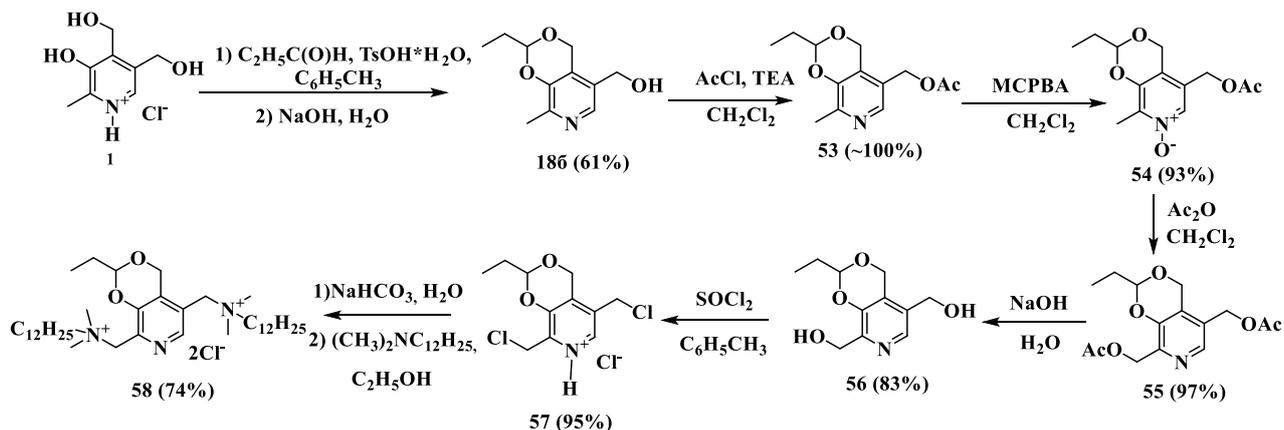


Схема 10

Как и предполагалось, в отличие от диметилкетала **486**, 0.2 % водный раствор соединения **58**, содержащего ацетальный шестичленный цикл, оказался гидролитически устойчивым и при длительном хранении площадь его пика на хроматограмме ВЭЖХ не изменялась.

Исследование антибактериальной активности соединения **58** *in vitro* проводилось на 87 музейных и клинических штаммах, в т.ч. выделенных из больных республиканской клинической больницы г. Казани, в сравнении с мирамистином, бензалкония хлоридом и хлоргексидином. Исследования были проведены в НОЦ фармацевтики КФУ под руководством к.б.н. Никитиной Е.В. Установлено, что соединение **58** проявляет превосходящую препараты сравнения антибактериальную активность. При этом особенно важно отметить, что к соединению **58** были чувствительны все исследованные бактериальные штаммы (МИК < 64 мкг/мл), в то время как мирамистин был неактивен в отношении 10 штаммов (МИК > 64 мкг/мл), бензалкония хлорид - в отношении 6 штаммов, а хлоргексидин - одного штамма. Эти обнадеживающие данные позволили нам, в отличие от соединения **486**, присвоить соединению **58**, обладающему как высокой антибактериальной эффективностью и низкой цитотоксичностью (CC₅₀ (НЕК-293) = 4.2 мкг/мл), так и стабильностью в водном растворе, шифр доклинического кандидата - **KFU-05**.

4. Антисептические свойства доклинического кандидата

Дальнейшие исследования **KFU-05** были направлены на выявление его потенциала в качестве антисептического лекарственного средства. Все исследования проводились в НОЦ фармацевтики КФУ под руководством к.б.н. Иксановой А.Г.

В отношении грамположительных микроорганизмов (*S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*) в составе биоплёнок **KFU-05** продемонстрировал в 2 раза более высокую активность по сравнению с мирамистином и бензалкония хлоридом, а в отношении грамотрицательных (*E. coli*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*) - сопоставимую, либо более высокую.

В *in vitro* тестах 0.2 % раствор **KFU-05** при 15 минутной экспозиции вызывал гибель 100 % (в суспензии) и 99.99 % (на поверхности) штаммов *S. aureus* ATCC 209p и *E. coli* CDC F-50, что сопоставимо с активностью бензалкония хлорида и превышает эффективность мирамистина.

Пятиминутная экспозиция 0.2 % раствора **KFU-05** ингибирует рост *E. coli* CDC F-50 на коже крыс на 97.5 %, что сопоставимо с эффектами бензалкония хлорида, мирамистина и хлоргексидина.

Также показано, что в отношении мицелиальных и дрожжевых видов грибов (*C. albicans*, *Asp. fumigatus*, *Rh. oryzae*) **KFU-05** проявляет более низкую противогрибковую активность (МИК = 62.5 мкг/мл), чем бензалкония хлорид (МИК = 7.8-15.6 мкг/мл), но более высокую, чем мирамистин (МИК = 31.2-500 мкг/мл). В тесте в растворе по фунгицидному действию **KFU-05** превосходит мирамистин и сопоставим с бензалкония хлоридом.

Исследование противовирусной активности в отношении герпесвируса 1 типа показало, что вирулицидное действие препарата **KFU-05** (200 мкг/мл) было сопоставимо с эффектами мирамистина (150 мкг/мл) и бензалкония хлорида (200 мкг/мл). Дополнительно, в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, под руководством к.б.н. А.А. Штро было проведено исследование вирулицидной активности **KFU-05** в отношении вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1). **KFU-05** показал хорошую активность ($IC_{50} = 10$ мкг/мл), со снижением титра вируса в максимально переносимой концентрации на 3.5 lg ТИД₅₀ (тканевая инфекционная доза).

Антипротозойное действие **KFU-05** в отношении брюхожесничных инфузорий стилонихии (*Stylonychia mytilus*) было сопоставимо (25 мкг/мл) с хлоргексидином (20 мкг/мл), бензалкония хлоридом (30 мкг/мл) и превосходило мирамистин (50 мкг/мл).

Исследования острой токсичности **KFU-05** на мышах при внутрижелудочном введении показали, что величина ЛД₅₀ для него составляет 1700 мг/кг. Широко применяемые в настоящее время антисептики мирамистин (ЛД₅₀ = 1000 мг/кг), бензалкония хлорид (ЛД₅₀ = 180 мг/кг) и хлоргексидин (ЛД₅₀ = 1260 мг/кг) существенно более токсичны при внутрижелудочном введении на мышах.

Важнейшей особенностью **KFU-05** является отсутствие развития резистентности у бактерий. В отличие от коммерческих антисептиков **KFU-05** не терял активности даже после 30 пассажей. Этот эффект был продемонстрирован на различных штаммах бактерий и грибов (*Pseudomonas spp.*, *E. coli*, *Acinetobacter spp.*, *S. aureus* MRSA, *S. intermedius* MRSI, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *C. albicans*, *C. tropicalis*).

К настоящему моменту **KFU-05** успешно завершил официальные доклинические исследования в качестве антисептического лекарственного средства в

рамках ФЦП «Фарма-2020» (Государственный контракт № 14.N08.11.0197 от 27.11.2017) и выводится на I фазу клинических исследований.

5. Влияние доклинического кандидата на модельные и бактериальные мембраны

В литературе известно, что механизм антибактериального действия ЧАС заключается в дезорганизации цитоплазматической мембраны бактерий. Нами было проведено исследование действия **KFU-05** на модельные фосфолипидные мембраны, полученные из лецитиновых липосом. При 5-минутной обработке липосом 0.2%-раствором **KFU-05** наблюдается значительное уменьшение их гидродинамического диаметра, а также изменение их дзета-потенциала с -28 мВ до +25 мВ (таблица 5). Подобные изменения размера и поверхностного заряда липосом свидетельствуют об адсорбции **KFU-05** на их поверхности и реорганизации структуры их фосфолипидного бислоя. Сходные эффекты (размер липосом, величина дзета-потенциала) вызывает и воздействие реперного бензалкония хлорида, механизм действия которого хорошо изучен.

Таблица 5. Значения гидродинамического диаметра (нм) и дзета-потенциала (мВ) поверхности лецитиновых липосом при 5-минутной экспозиции с 0.2% растворами **KFU-05** и бензалкония хлорида.

Соединение	Гидродинамический диаметр (нм)	Величина дзета-потенциала (мВ)
KFU-05	123.0 ± 8.5, 38.8 ± 6.6, 4.6 ± 0.1	+25.2 ± 0.8
Бензалкония хлорид	132.5 ± 7.8	+15.6 ± 1.1
Контроль	162.0 ± 4.0	-28.0 ± 4.0

Помимо эксперимента на модельных мембранах, была проведена визуализация влияния **KFU-05** на музейный штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Исследование проводилось в НОЦ фармацевтики КФУ к.х.н. Агафоновой М.Н. Было показано, что инкубация 0.2 % раствора **KFU-05** с *S. aureus* в течение 30 минут приводит к изменению формы бактерий, разрушению клеточной мембраны, вытеканию содержимого клеток и их последующей гибели (рисунок 3).

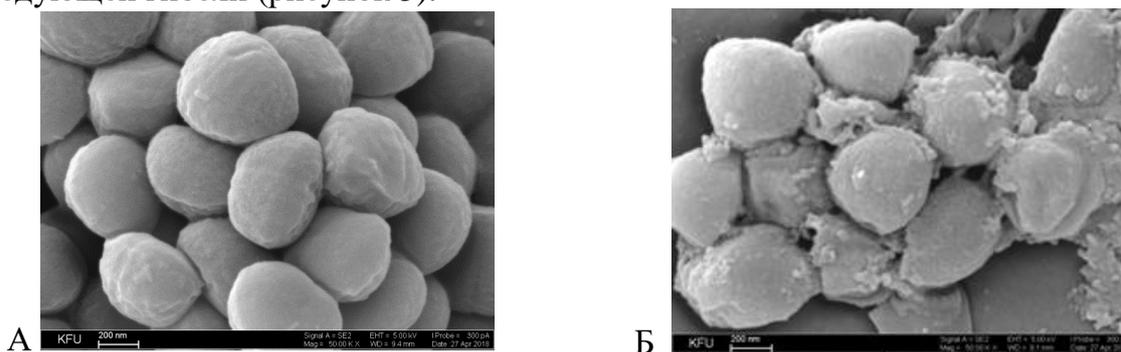


Рисунок 3. Микрофотографии клеток *S. aureus*, полученные с помощью СЭМ, при воздействии препарата **KFU-05** (Б) и интактные клетки тест-организма без добавления объекта испытания (А) (контроль). Увеличение изображений в 50000 раз.

6. Разработка опытно-промышленного способа получения доклинического кандидата

Разработанная лабораторная методика синтеза, представленная на схеме 10, имела ряд недостатков, которые создавали препятствия при переходе на стадию опытно-технологических работ (доклинических исследований), потребовавших

наработки фармацевтической субстанции **KFU-05** в больших объемах. Существенными недостатками лабораторной технологии **KFU-05** являлись ее многостадийность (7 стадий синтеза), высокая трудоемкость, использование большого количества прекурсоров, особенно уксусного ангидрида, а также большое количество отходов (на 1 кг фармсубстанции образуется 600 кг отходов).

На этом этапе работы нами был разработан лишенный этих недостатков опытно-промышленный способ получения фармсубстанции **KFU-05**, который включает 4 стадии без использования уксусного ангидрида, чистоту не менее 99 %, а также в пять раз меньшее количество образующихся отходов. Способ заключается в первоначальном получении хлорида **196** с его последующим хлорированием трихлоризоциануровой кислотой в хлороформе с получением дихлорпроизводного **57**. Стоит отметить, что использование других хлорирующих агентов (N-хлорсукцинимида, хлористого сульфурила), варьирование растворителей (хлористый метилен, тетрахлорметан, тетрахлорэтан), использование инициаторов радикальных реакций (AIBN, перекись бензоила) не приводила к желаемому дихлориду **57**. На последней стадии осуществлялось взаимодействие дихлорида **57** с двукратным мольным избытком N,N-диметилдодециламина в ацетоне при 55 °С (схема 11). Разработанный новый способ получения **KFU-05** прекрасно масштабировался на 15 л стеклянном реакторе Buchi и позволил получить необходимое для полноценного проведения доклинических исследований количество фармацевтической субстанции.

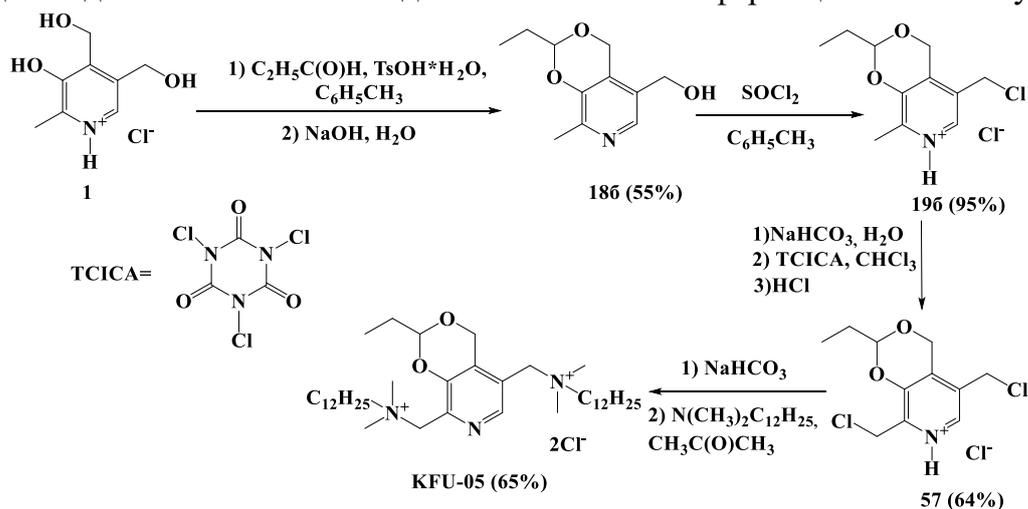


Схема 11

7. Разработка «мягких лекарств» на основе производных пиридоксина, содержащих четвертичные аммониевые фрагменты

Вторым типом целевых структур, запланированных к получению в настоящей работе, стали четвертичные аммониевые соединения на основе производных пиридоксина, дизайн которых осуществлялся по концепции «мягких лекарств». Структура подобных соединений представляла собой шестичленные ацетали (кетали) пиридоксина, связанные через линкер с остатком жирной карбоновой кислоты. Для выявления закономерностей «структура - активность» варьировались следующие параметры химической структуры: положение четвертичного аммониевого фрагмента в пиридиновом кольце пиридоксина, количество метиленовых групп в остатке карбоновой кислоты, заместители при ацетальном атоме углерода, количество метиленовых фрагментов в алкильном линкере между четвертичным атомом азота и амидным (сложноэфирным) фрагментом, природа связи кислота – линкер (рисунок 4).

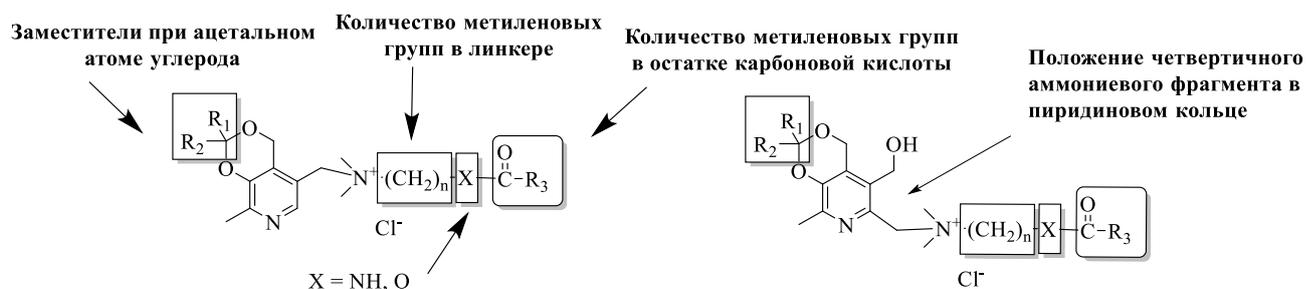
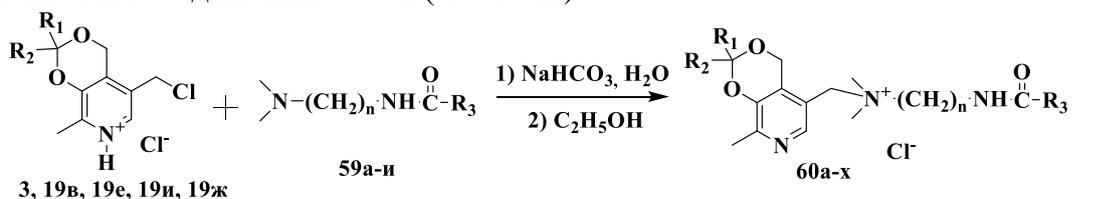


Рисунок 4. Дизайн «мягких лекарств» на основе производных пиридоксина.

Взаимодействием хлорпроизводных **3**, **19в,е,и,ж** с амидами **59а-и** в эквимольном соотношении в этаноле была получена серия четвертичных аммониевых соединений **60а-х** (схема 12).



- 60а** R₁ = R₂ = CH₃, R₃ = C₁₁H₂₃, n=2 (71%) **60м** R₁ = C₃H₇, R₂=H, R₃= C₁₇H₃₅, n=2 (46%)
60б R₁ = R₂ = CH₃, R₃ = C₁₃H₂₇, n=2 (53%) **60н** R₁ = C₃H₇, R₂=H, R₃= C₁₁H₂₃, n=3 (44%)
60в R₁ = R₂ = CH₃, R₃ = C₁₅H₃₁, n=2 (36%) **60о** R₁=C₃H₇, R₂=H, R₃=C₁₃H₂₇, n=3 (58%)
60г R₁ = R₂ = CH₃, R₃ = C₁₇ H₃₅, n=2 (44%) **60п** R₁=C₃H₇, R₂=H, R₃=C₁₅H₃₁, n=3 (57%)
60д R₁ = R₂ = CH₃, R₃ = C₁₁H₂₃, n=3 (45%) **60р** R₁=C₃H₇, R₂=H, R₃ = C₁₇H₃₅, n=3 (46%)
60е R₁ = R₂ = CH₃, R₃ = C₁₃H₂₇, n=3 (40%) **60с** R₁=C₅H₁₁, R₂=H, R₃ = C₁₃H₂₇, n=3 (57%)
60ж R₁ = R₂ = CH₃, R₃ = C₁₅H₃₁, n=3 (43%) **60т** R₁=C₈H₁₇, R₂=H, R₃ = C₁₃H₂₇, n=3 (76%)
60з R₁ = R₂ = CH₃, R₃ = C₁₇H₃₅, n=3 (49%) **60у** R₁ = R₂ = CH₃, R₃ = C₅H₁₁, n=3 (63%)
60и R₁ = C₃H₇, R₂=H, R₃= C₁₁H₂₃, n=2 (45%) **60ф** R₁=C₃H₇, R₂=H, R₃=C₅H₁₁, n=3 (40%)
60к R₁ = C₃H₇, R₂=H, R₃ = C₁₃H₂₇, n=2 (58%) **60х** R₁=C₈H₁₇(CH₃)CH, R₂=H, R₃=C₅H₁₁, n=3 (40%)
60л R₁ = C₃H₇, R₂=H, R₃=C₁₅H₃₁, n=2 (46%)

Схема 12

Для всех полученных соединений была исследована антибактериальная активность на 5 бактериальных штаммах в сравнении с мирамистином, бензалкония хлоридом и хлоргексидином (таблица 6, зеленым выделены наиболее активные соединения). Исследования были проведены в институте фундаментальной медицины и биологии КФУ под руководством д.б.н. Каюмова А.Р.

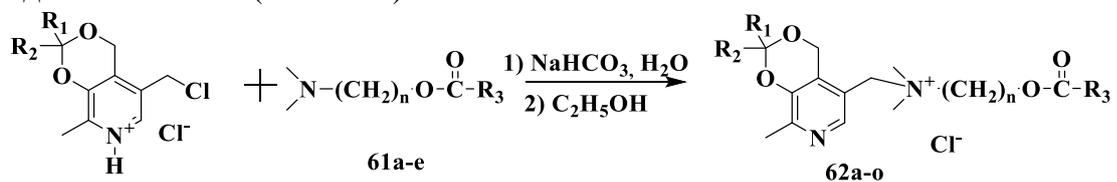
Таблица 6. Антибактериальная активность *in vitro* соединений **62а-х**.

Соединение	МИК (мкг/мл)				
	Грамположительные бактерии			Грамотрицательные бактерии	
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>B. cereus</i> (клинич.)	<i>M. luteus</i> (клинич.)	<i>E. coli</i> MG1655	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
60а	1	8	4	32	32
60б	2	4	4	8	2
60в	1	4	1	32	2
60г	4	8	2	>64	8
60д	8	8	16	64	64
60е	0.5	2	1	8	8
60ж	4	2	2	>64	8
60з	4	8	4	>64	8
60и	1	2	2	4	32
60к	1	2	1	32	8
60л	8	16	16	>64	>64

60м	>64	>64	>64	>64	>64
60н	1	4	4	8	32
60о	2	2	2	2	>64
60п	2	4	2	2	>64
60р	>64	>64	>64	>64	>64
60с	2	1	2	>64	>64
60т	>64	>64	>64	>64	>64
60у	>64	>64	>64	>64	>64
60ф	>64	>64	>64	>64	>64
60х	>64	>64	>64	>64	>64
Бензалкония хлорид	1	4	0.5	8	64
Мирамистин	2	4	2	8	64
Хлоргексидин	2	1	0.5	1	64

Как видно из представленных данных, для производных, содержащих фрагменты стеариновой и капроновой кислот **60г,з,м,р,у,ф,х** наблюдается резкое снижение антибактериальной активности. Для соединений, содержащих одинаковые фрагменты карбоновой кислоты и линкера, но различающихся заместителями при ацетальном атоме углерода, наблюдается снижение антибактериальной активности. Так, при переходе от соединения **60о** к **60с** и далее к соединению **60т**, содержащему наиболее липофильный заместитель у ацетального атома углерода, активность уменьшается. Количество метиленовых фрагментов в линкере между четвертичным и амидными атомами азота не влияет на антибактериальную активность. Наиболее активными из исследованных соединений оказались соединения **60б,е,и,к**, содержащие в амидном фрагменте остатки миристиновой и лауриновой кислот. Их активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, в целом, была сопоставима с препаратами сравнения.

На втором этапе исследований была получена серия соединений на основе эфиров жирных кислот. Синтез производных на основе стеариновой и капроновой кислот не проводился, поскольку аналогичные соединения в серии амидов не проявили значимой антибактериальной активности. Взаимодействием хлорпроизводных **3, 19в,е,и** с эквимольным количеством сложных эфиров **61а–е** в этаноле при 70 °С были получены соответствующие четвертичные аммониевые соединения **62а–о** (схема 13).



3, 19в, 19е, 19и

62а R₁= R₂= CH₃, R₃= C₁₁H₂₃, n=2 (47%)

62б R₁= R₂= CH₃, R₃= C₁₃H₂₇, n=2 (49%)

62в R₁= R₂= CH₃, R₃= C₁₅H₃₁, n=2 (41%)

62г R₁= R₂= CH₃, R₃= C₁₁H₂₃, n=3 (46%)

62д R₁= R₂= CH₃, R₃= C₁₃H₂₇, n=3 (73%)

62е R₁= R₂= CH₃, R₃= C₁₅H₃₁, n=3 (40%)

62ж R₁= C₃H₇, R₂=H, R₃= C₁₁H₂₃, n=2 (45%)

62з R₁= C₃H₇, R₂=H, R₃= C₁₃H₂₇, n=2 (39%)

62и R₁= C₃H₇, R₂=H, R₃= C₁₅H₃₁, n=2 (53%)

62к R₁= C₃H₇, R₂=H, R₃= C₁₁H₂₃, n=3 (42%)

62л R₁= C₃H₇, R₂=H, R₃= C₁₃H₂₇, n=3 (60%)

62м R₁= C₃H₇, R₂=H, R₃= C₁₅H₃₁, n=3 (48%)

62н R₁= C₅H₁₁, R₂=H, R₃= C₁₃H₂₇, n=3 (70%)

62о R₁= C₈H₁₇, R₂=H, R₃= C₁₃H₂₇, n=3 (73%)

Схема 13

Как и для предыдущей серии амидов, для сложных эфиров **65а–о** была исследована антибактериальная активность *in vitro* (таблица 7).

Таблица 7. Антибактериальная активность *in vitro* соединений 62а-о.

Соединение	МИК (мкг/мл)				
	Грамположительные бактерии			Грамотрицательные бактерии	
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>B. cereus</i> (клинич.)	<i>M. luteus</i> (клинич.)	<i>E. coli</i> MG1655	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
62а	4	4	4	16	64
62б	0.5	1	0.5	8	1
62в	0.5	1	0.5	>64	4
62г	2	1	2	8	32
62д	2	2	2	16	16
62е	16	8	2	>64	32
62ж	1	2	2	4	32
62з	0.5	4	0.5	16	1
62и	2	4	1	>64	8
62к	2	2	1	4	32
62л	2	2	1	>64	4
62м	32	32	8	>64	32
62н	8	4	8	>64	>64
62о	>64	>64	>64	>64	>64
Бензалкония хлорид	1	4	0.5	8	64
Мирамистин	2	4	2	8	64
Хлоргексидин	1	1	0.5	1	64

Антибактериальная активность четвертичных аммониевых соединений на основе сложных эфиров 62а-о оказалась сопоставима с активностью биоизостерных амидов кислот 60а-х и препаратов сравнения. При этом наибольшую активность проявили соединения 62б, 62з и 62к, содержащие фрагменты миристиновой и лауриновой кислот.

Для оценки влияния на антибактериальную активность положения фармакофорного фрагмента в пиридиновом кольце пиридоксина был синтезирован ряд четвертичных аммониевых соединений на основе 6-(гидроксиметил)пиридоксина, содержащих фрагменты эфиров или амидов миристиновой кислоты 64а-г и 66а-г (схема 14).

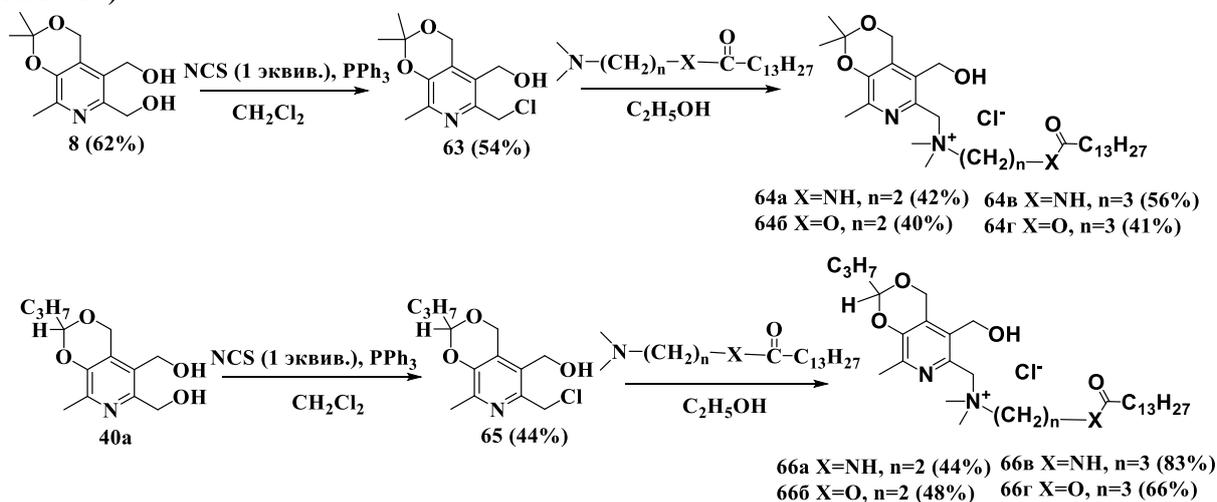


Схема 14

В таблице 8 приведена антибактериальная активность полученных соединений.

Таблица 8. Антибактериальная активность *in vitro* соединений **64а-г** и **66а-г**.

Соединение	МИК (мкг/мл)				
	Грамположительные бактерии			Грамотрицательные бактерии	
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>B. cereus</i> (клинич.)	<i>M. luteus</i> (клинич.)	<i>E. coli</i> MG1655	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
64а	1	1	2	8	>64
64б	1	0.5	1	32	64
64в	2	2	1	16	>64
64г	1	0.5	2	64	>64
66а	2	2	4	64	>64
66б	2	2	2	64	>64
66в	2	1	1	64	>64
66г	2	2	2	64	>64
Бензалкония хлорид	1	4	0.5	8	64
Мирамистин	2	4	2	8	64
Хлоргексидин	1	1	0.5	1	64

Как видно из представленных в таблице 8 данных, эфиры и амиды производных пиридоксина, содержащие аммониевые фрагменты в шестом положении, обладают сопоставимой активностью на грамположительных бактериях в сравнении с производными, содержащими аммониевые фрагменты в пятом положении пиридоксина, а также препаратами сравнения. Однако, их активность на грамотрицательных бактериях *P. aeruginosa* и *E. coli* оказалась существенно ниже. Таким образом, по результатам первичного скрининга антибактериальной активности 43 синтезированных ЧАС по концепции «мягких лекарств» были отобраны 9 соединений (**62б**, **62е**, **62и**, **62к**, **65б**, **65з**, **65к**, **67а** и **67б**) для дальнейших углубленных исследований.

8. Углубленное исследование антибактериальной активности производных пиридоксина, полученных по концепции «мягких лекарств», *in vitro*

Для девяти отобранных соединений было проведено углубленное исследование антибактериальной активности на 20 клинических штаммах бактерий в сравнении с мирамистином и хлоридом бензалкония. Исследования были проведены в НОЦ фармацевтики КФУ под руководством к.б.н. Никитиной Е.В. (таблица 9, зеленым выделены «соединения-лидеры»).

Таблица 9. Антибактериальная активность *in vitro* производных пиридоксина **62б**, **62е**, **62и**, **62к**, **65б**, **65з**, **65к**, **67а** и **67б**, полученных по концепции «мягких лекарств».

Штаммы	МИК (мкг/мл)										
	60б	60е	60и	60к	62б	62з	62к	64а	64б	Бензалкония хлорид	Мирамистин
Грамположительные бактерии											
<i>S. aureus</i> 713 MRSA	4	16	4	2	8	2	16	4	2	8	64
<i>S. aureus</i> 983 MRSA	64	64	16	16	64	64	32	32	32	16	>64
<i>S. aureus</i> MRSA 1053	4	8	2	1	8	2	8	4	2	4	32
<i>S. intermedius</i> MRSI 1061	4	8	4	2	8	2	16	4	4	4	64
<i>S. aureus</i> MRSA 1065	8	8	2	2	8	2	16	2	4	4	32

<i>S. aureus</i> MRSA 1131	16	16	4	2	16	4	16	4	4	4	32
<i>S. intermedius</i> MRSI 1143	4	16	4	2	8	4	16	4	4	4	64
<i>S. aureus</i> 25	4	8	2	2	8	2	8	2	2	2	16
<i>E. faecalis</i> 23	2	4	2	1	4	4	4	1	2	1	4
<i>E. faecalis</i> 3063	2	4	2	1	4	4	4	1	2	2	16
Грамотрицательные бактерии											
<i>Acinetobacter</i> spp. 3	64	64	32	32	64	64	64	32	64	16	>64
<i>Pseudomonas</i> spp. 5	64	64	32	32	64	64	32	32	64	16	>64
<i>Klebsiella</i> spp. 11	64	64	16	32	64	32	32	32	64	16	>64
<i>Proteus</i> spp. 17	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	64	>64
<i>E. coli</i> 718	32	>64	8	8	32	32	8	16	32	8	64
<i>Moraxella</i> sp. 765	64	>64	16	16	64	64	64	64	64	16	>64
<i>K. pneumoniae</i> 1813	4	>64	2	1	4	1	8	2	2	1	16
<i>P. aeruginosa</i> 1945	64	>64	16	8	64	64	>64	32	64	32	64
<i>S. marcescens</i> 1966	64	>64	64	64	64	>64	>64	>64	>64	64	>64
<i>S. ureilytica</i> 1972	64	>64	64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64

Наиболее активными оказались соединения **60и,к** и **64а**. Антибактериальная активность «соединений-лидеров» на штаммах грамположительных бактерий сопоставима с активностью бензалкония хлорида, но на штаммах грамотрицательных бактерий эффективность бензалкония хлорида была выше. При этом, все три соединения оказались несколько более активными на фоне мирамистина как на грамположительных, так и на грамотрицательных бактериях.

Таким образом, на основании углубленного скрининга антибактериальной активности из 9 соединений были отобраны 3 «соединения-лидера» **62и**, **64а** и **60к**, для которых в настоящее время проводятся дальнейшие исследования противомикробной активности и токсичности.

9. Количественные взаимосвязи «структура - активность» в ряду четвертичных аммониевых соединений на основе производных пиридоксина

Для выявления количественных взаимосвязей в ряду синтезированных ЧАС на основе производных витамина В₆ были построены зависимости антибактериальной активности на музейных штаммах *S. aureus* ATCC 29213 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 от липофильности (logD_{7.3}) для всех синтезированных соединений (рисунок 5). Расчет величины logD_{7.3} для всех полученных соединений производился с помощью онлайн-платформы Chemicalize (ChemAxon).

Для ЧАС с закрытой ароматической гидроксигруппой (ацетали, кетали) оптимальным интервалом липофильности для проявления антибактериальной активности являются значения logD от 0 до 5. На других исследованных бактериальных штаммах зависимости активности от липофильности были аналогичными. Стоит также отметить, что показатель LogD, хоть и является важным, но не всегда решающим для проявления высокой антибактериальной активности: не менее важны также структурные особенности молекул. Так, для соединений, содержащих ароматическую гидроксигруппу, даже при оптимальных значениях липофильности наблюдается резкое снижение антибактериальной активности в сравнении с соединениями-аналогами, имеющими в своем составе ацетальный или кетальный фрагмент.

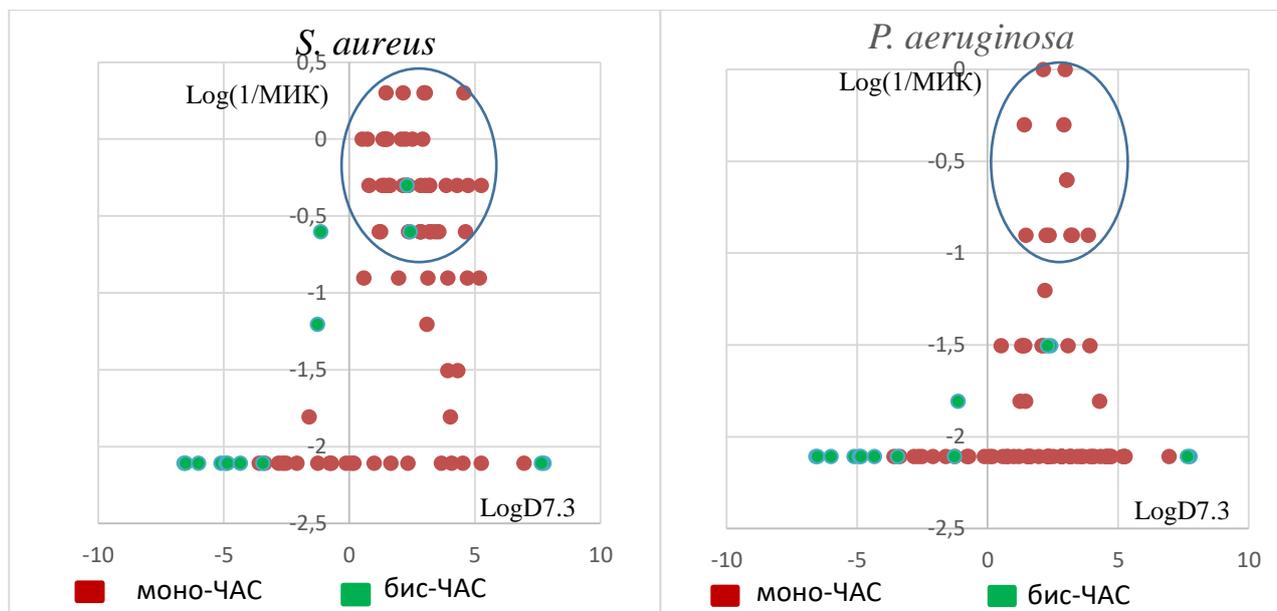


Рисунок 5. График зависимости антибактериальной активности ($\log(1/\text{МИК})$) от липофильности ($\log D_{7.3}$) моно- и бис-аммониевых солей с шестичленной кетальной (ацетальной) защитной группой на штаммах *S.aureus* ATCC 29213 и *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Для объяснения крайне низкой активности ЧАС без ацетальной (кетальной) защиты ароматической гидроксигруппы было высказано предположение, что вследствие наличия мощных электроакцепторных заместителей, к каковым относятся четвертичные аммониевые фрагменты, кислотность соединений должна значительно увеличиваться и, как следствие, в условиях эксперимента по определению МИК соединений (pH среды равно 7.3) будет иметь место депротонирование ароматической гидроксильной группы. С этой целью для четырех соединений (**58**, **5в**, **146** и **496**), а также пиридоксина **1**, было проведено экспериментальное измерение кислотно-основных свойств (таблица 10). Исследования были проведены на кафедре неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ под руководством к.х.н. Штырлина В.Г.

Таблица 10. Экспериментальные значения констант кислотной диссоциации (pK_a) соединений **1**, **5в**, **146**, **496** и **58**.

Соединение	pK_a (O-H)	pK_a (N-H)	Степень ионизации (% анионной формы) ароматической гидроксигруппы (O-H) при $\text{pH} = 7.3$
1	8.90	4.92	2.1
5в	6.79	2.69	76.3
146	6.02	2.57	95.1
496	5.08	2.54	99.4
58	-	1.20	-

Величины pK_a (O-H) производных пиридоксина, содержащих электроакцепторные аммониевые фрагменты в различных положениях пиридинового цикла, оказались в интервале от 5 до 7 (соответствуют органическим кислотам средней силы). Таким образом, значительное снижение антибактериальной активности ЧАС, у которых в физиологических условиях появляется анионный центр, объясняется простым электростатическим отталкиванием этих соединений с отрицательно заряженными клеточными мембранами бактериальных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведённых исследований сделаны следующие выводы:

1. Синтезировано 120 новых четвертичных аммониевых соединений на основе производных витамина В₆, структура которых доказана методами ЯМР ¹H, ¹³C и масс-спектрометрии высокого разрешения.
2. По результатам скрининга антибактериальной активности и токсичности четвертичных аммониевых соединений на основе витамина В₆ *in vitro* выявлен перспективный кандидат в антисептическое лекарственное средство.
3. Исследование взаимосвязи «структура - антибактериальная активность» в ряду четвертичных аммониевых соединений на основе производных витамина В₆ показало, что для соединений, содержащих шестичленный ацетальный или кетальный цикл, липофильность является ключевым фактором, влияющим на антибактериальную активность. Причиной низкой антибактериальной активности соединений с ароматической гидроксильной группой является её ионизация в физиологических условиях, что приводит к электростатическому отталкиванию с отрицательно заряженной клеточной мембраной бактериальных клеток.
4. Показано, что по своей противомикробной активности и безопасности выявленный кандидат в антисептическое средство превосходит известные на фармацевтическом рынке антисептики. Его важнейшей особенностью является отсутствие выработки резистентности у бактерий.
5. Разработан эффективный способ синтеза и отработана опытно-промышленная технология получения кандидата в антисептическое лекарственное средство.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Shtyrlin, N.V. Synthesis and antibacterial activity of novel quaternary ammonium pyridoxine derivatives / N.V. Shtyrlin, **S.V. Sapozhnikov**, S.A. Koshkin, A.G. Iksanova, A.H. Sabirov, A.R. Kayumov, A.A. Nureeva, M.I. Zeldi, Y.G. Shtyrlin // *Med. Chem.* – 2015. – V. 11, № 7. – P. 656–665.
2. Kayumov, A.R. New derivatives of pyridoxine exhibit high antibacterial activity against biofilm-embedded *Staphylococcus* cells / A.R. Kayumov, A.A. Nureeva, E.Y. Trizna, G.R. Gazizova, M.I. Bogachev, N.V. Shtyrlin, M.V. Pugachev, **S.V. Sapozhnikov**, Y.G. Shtyrlin // *BioMed Res. Int.* – 2015. – Article ID 890968, 10 pages.
3. Shtyrlin, N.V. Synthesis and antibacterial activity of quaternary ammonium 4-deoxypyridoxine derivatives / N.V. Shtyrlin, **S.V. Sapozhnikov**, A.S. Galiullina, A.R. Kayumov, O.V. Bondar, E.P. Mirchink, E.B. Isakova, A.A. Firsov, K.V. Balakin, Y.G. Shtyrlin // *BioMed Res. Int.* – 2016. – Article ID 3864193, 8 pages.
4. **Sapozhnikov, S.V.** New quaternary ammonium pyridoxine derivatives: synthesis and antibacterial activity / **S.V. Sapozhnikov**, N.V. Shtyrlin, A.R. Kayumov, A.E. Zamaldinova, A.G. Iksanova, E.V. Nikitina, E.S. Krylova, D.Y. Grishaev, K.V. Balakin, Y.G. Shtyrlin // *Med. Chem. Res.* – 2017. – V. 26, Iss. 12. – P. 3188–3202.

Патенты

1. Патент РФ № 2561281. Антибактериальные средства на основе четвертичных аммониевых солей / Ю.Г. Штырлин, Н.В. Штырлин, **С.В. Сапожников**, А.Г. Иксанова, Е.В. Никитина, А.Р. Каюмов; ФГАОУ ВПО КФУ. – Оpubл. – 27.08.2015.
2. Патент РФ № 2607522. Четвертичные аммониевые соли на основе

производных витамина В₆ / Ю.Г. Штырлин, Н.В. Штырлин, **С.В. Сапожников**, А.Г. Иксанова, Е.В. Никитина, А.Р. Каюмов; ФГАОУ ВО КФУ. – Оpubл. – 02.12.2015.

3. Патент РФ № 2641309. Антисептическое лекарственное средство / Ю.Г. Штырлин, Н.В. Штырлин, А.Д. Стрельник, **С.В. Сапожников**, А.Г. Иксанова, Р.Р. Казакова, М.Н. Агафонова; ФГАОУ ВО КФУ. – Оpubл. – 17.01.2018.

4. Патент РФ № 2666544. Четвертичная аммониевая соль, обладающая антимикотической и антибактериальной активностью / Ю.Г. Штырлин, Н.В. Штырлин, **С.В. Сапожников**, А.Г. Иксанова, Е.В. Никитина, Р.Р. Казакова, С.А. Лисовская; ФГАОУ ВО КФУ. – Оpubл. – 09.11.2018.

5. Патент РФ № 2697848. Способ получения 5,8-(бис(метилен(N,N-диметил-N-додециламмоний))-2-этил-4Н-[1,3]диоксино[4,5с]-пиридиний дихлорида / Ю.Г. Штырлин, Н.В. Штырлин, **С.В. Сапожников**, Р.С. Павельев, К.В. Балакин; ФГАОУ ВО КФУ. – Оpubл. – 21.08.2019.

Тезисы докладов конференций

1. **Сапожников, С.В.** Синтез и антибактериальные свойства аммониевых солей на основе производных пиридоксина / **С.В. Сапожников**, Н.В. Штырлин, М.И. Зелди, Е.В. Никитина, Ю.Г. Штырлин // II Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации». Тезисы докладов. – Чебоксары, 2014. – С. 198-199.

2. **Сапожников, С.В.** Синтез и антибактериальная активность фосфониевых и аммонийных солей на основе пиридоксина / **С.В. Сапожников**, М.В. Пугачев, Н.В. Штырлин // VIII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2014». Тезисы докладов. – Санкт-Петербург, 2014. – С. 86–87.

3. **Сапожников, С.В.** Синтез и исследование антибактериальной активности аммониевых солей на основе пиридоксина и 6-(гидроксиметил)пиридоксина / **С.В. Сапожников**, Н.В. Штырлин, А.А. Нуреева, А.Р. Каюмов, Ю.Г. Штырлин // IV Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации». Тезисы докладов. – Чебоксары, 2015. – С. 127.

4. **Сапожников, С.В.** Синтез и антибактериальная активность моно- и бис-аммониевых солей на основе пиридоксина / **С.В. Сапожников**, Н.В. Штырлин, А.А. Габдрахманова, А.Г. Иксанова, А.Р. Каюмов, Е.В. Никитина, Ю.Г. Штырлин // Кластер конференций по органической химии «ОргХим-2016». Тезисы докладов. – Санкт-Петербург, 2016. – С. 656–657.

5. **Сапожников, С.В.** Разработка противомикробных средств на основе производных пиридоксина, содержащих четвертичные аммониевые фрагменты / **С.В. Сапожников**, Н.В. Штырлин, А.Ю. Друк, А.Г. Иксанова, А.Р. Каюмов, Е.В. Никитина, Ю.Г. Штырлин // VI Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации». Тезисы докладов. – Чебоксары, 2017. – С. 222–223.

6. Shtyrlin, N.V. Synthesis and biological activity of pyridoxine-based quaternary ammonium salts / N.V. Shtyrlin, **S.V. Sapozhnikov**, A.G. Iksanova, A.R. Kayumov, S.A. Lisovskaya, E.V. Nikitina, Yu.G. Shtyrlin // 3th Russian Conference on Medicinal Chemistry «MedChem Russia 2017». Тезисы докладов. – Казань, 2017. – С. 27.

7. **Sapozhnikov, S.** Synthesis and antimicrobial activity of quaternary ammonium salts based on pyridoxine derivatives and fatty acids / **S. Sapozhnikov**, N. Shtyrlin, A. Kayumov, G. Alekbaeva, A. Druk, Y. Shtyrlin // 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry «MedChem Russia 2019». Тезисы докладов. – Екатеринбург, 2019. – С. 107.