СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРОКСИЗАМЕЩЕННЫХ АНАЛОГОВ ИЗОНИПЕКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ IN SILICO И EX VIVO

Булава Е. А., Зущик П.Ю., Лахвич Ф.Ф.

Белорусский государственный медицинский университет, кафедра биоорганической химии, г. Минск

Ключевые слова: белок-фермент; докинг; зависимость строение-противобактериальная активность;Mycobacterium tuberculosis; производные изонипекотиновой кислоты.

Резюме: *Синтезированы производные дигидроксиизонипекотиновой кислоты и ее аналогов. Проведен сравнительный анализ зависимости строение-противотуберкулезная активность на штаммах Mycobacterium tuberculosis и insilico. Установлена зависимость активности синтезированных веществ от природы функциональной группы и взаимного пространственного расположения заместителей.*

Summary: *Dihydroxyisonipecotic acid derivatives have been synthesized. The comparative analysis of structure-activity dependence has been carried out. It was found that antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis depends on nature of -oyl-functional group and the relative spatial orientation of all the substituents.*

Актуальность. В настоящее время у ряда штаммов *Mycobacterium tuberculosis* выработалась резистентность к средствам традиционной терапии. Поэтому поиск новых противотуберкулёзных лекарственных средств среди представителей других классов соединений может повысить выживаемость и качество жизни некурабельных больных.

Цель: Изучение зависимости “структура - противотуберкулёзная активность” производных изонипекатиновой кислоты.

Задачи:

1.Синтез замещенных производных изонипекотиновой кислоты.

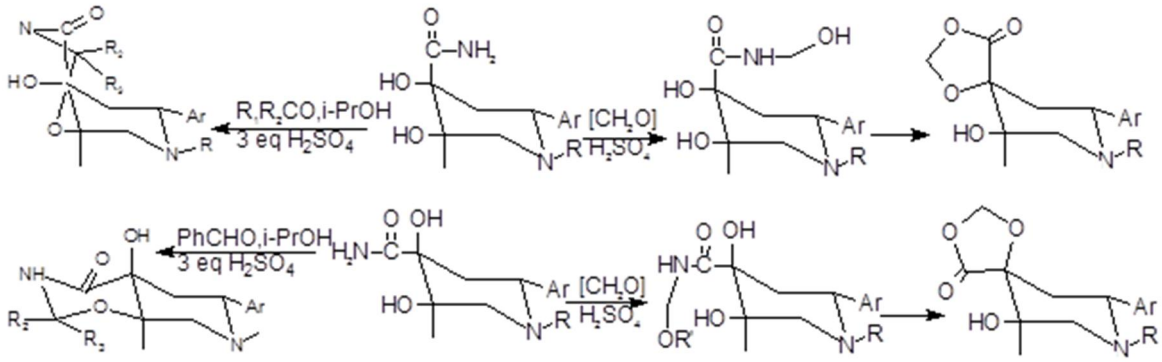
2.Сравнительный анализ зависимости противотуберкулезная активность-строения на штаммах микобактерий (*exvivo*) и *insilico* (компьютерное моделирование).

Материал и методы. Целевые структуры были синтезированы исходя из 3-гидроксипиперидин-4-онов с использованием химически чистых реактивов. Структура полученных соединений доказана с помощью ЯМР и ИК-спектроскопии. Исследование на штаммах микобактерий проводилось совместно с *TAACF, SouthernResearchInstitute.* Исследование *insilico* проводили с использованием компьютерной программы DockingServer.

Результаты и их обсуждение. Известно, что производные изонипекотиновой кислоты обладают различной биологической активностью, в частности связанной с их взаимодействием с опиоидными [1,2] и ГАМК [3] рецепторами. Нами проведен анализ противотуберкулезной активности производных изонипекотиновой кислоты, которые могут включаться в метаболизм бактерий в качестве аналогов ГАМК.

При взаимодействии пипиридинкарбоксамидов с метаналем получены функционально замещённые и спироциклические производные.Так, в реакцииамидов с

параформом или триоксаном в концентрированной кислоте в течение 20-60 мин образуются N-гидроксиметил-, а с метилалем N-метоксиметиламиды.



Механизм образования N-замещённых амидов включает присоединение протонированного формальдегида по тройной связи нитрильной группы по типу реакции ***Риттера***, с последующей гидратацией иминиевого катиона до амида.

Ряд соединений получены при модификации дигидроксинитрилов [5] или их взаимодействием с изонитрилами в условиях реакции Пассерини [6].

Структура полученных соединений и стереохимия новых стереогенных центов установлены на основании данных ИК и ЯМР ^{1}H спектроскопии. Ориентация заместителей у четвертичных атомов углерода цикла производных, полученных их гидроксиамидовпринимается аналогичной исходным гидроксиамидам, исходя из невозможности эпимеризации в условиях проведения реакций.

Моногидроксипиперидинкарбонитрилы получены при нагревании растворов тозилгидразонитрилов, полученных при гироцианировании соответствующих гидразонов, в диэтилфталате, анизоле, п-ксилоле или о-дихлорбензоле в результате реакции дезазотирования при 130-170 С. Реакции протекают с умеренными выходами и отличаются интересными стереохимическими закономерностями. Амиды и сложные эфиры на их основе были получены аналогично.

Совместно с TAACF, SouthernRecearchInstitute изучено влияние природы функциональных групп, структуры и пространственного строения синтезированных гидроксизамещенных производных изонипекотиновой кислоты и ее аналогов на процесс ингибирования роста культур *Mycobacteriumtuberculosis*.

Компьютерное моделирование взаимодействия синтезированных веществ с рецептором (докинг) с помощью программы DockingServer [7] дало сопоставимые результаты с ингибированием роста культуры бактерий. Для анализа insilico в программе DockingServer производных изонипекотиновой кислоты (лиганды) из банка данных 3-D структур белков и нуклеиновых кислот ProteinDataBank (PDB) [8] были выбраны субстраты рецепторов [9].

Выбор конкретных белков-ферментов, катализирующих реакцию синтеза миколевых кислот, основан на механизме действия изониазида, одного из эффективных специфических лекарственных средств против туберкулёза. Известно, что изониазид ингибирует синтез миколевых кислот в клеточной стенке *Mycobacterium tuberculosis*[4]. Для загрузки в программу докинга нами в компьютерных программах ISIS Draw, ChemDraw, Chem3D были смоделированы пространственные струк-

туры синтезируемых веществ. После адаптации презентаций в программе DockingServer структур белков и лигандов (синтезированные вещества) был проведен докинг. Для анализа результатов докинга были выбраны свободная энергия связывания лиганда и рецептора и константа ингибирования. Очевидно, что величина свободной энергии связывания напрямую коррелирует с силой взаимодействия лиганда с белком. Константа ингибирования показывает минимальное количество лиганда необходимое для связывания.

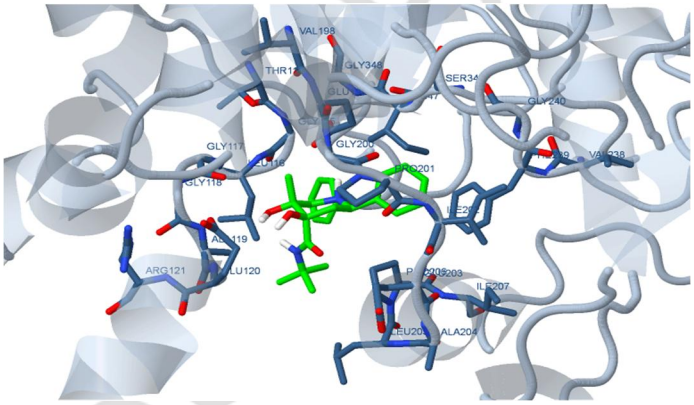
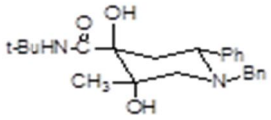
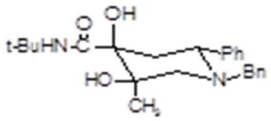
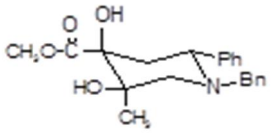
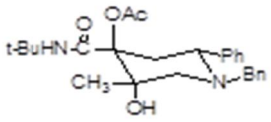
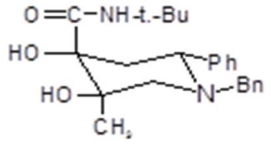
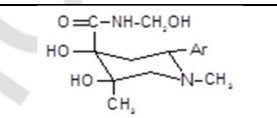
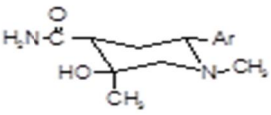
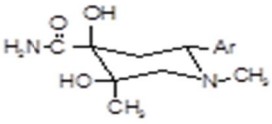
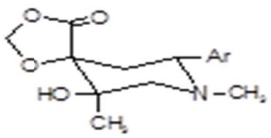


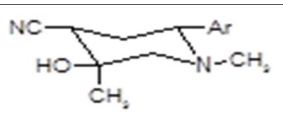
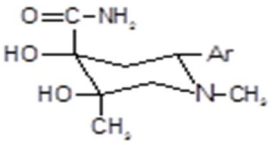
Рис. 1 - Моделирование взаимодействия лиганда с рецептором - докинг.

Результаты исследования представлены в таблице 1. Анализ данных таблицы показывает корреляцию результатов исследования активности на штаммах бактерий и *insilico*. Наиболее выраженное действие характерно для производных I и II. Анализ структуры синтезированных веществ показывает, что ингибирование жизнедеятельности бактерий напрямую зависит не только от класса веществ, но и от относительной конфигурации заместителей. По-видимому, активность производных изоникотиновых кислот связана с их включением в метаболизм бактерий в качестве аналогов ГАМК. Можно выделить два фактора, определяющих активность исследуемых веществ: легкость превращения до аминокислоты и степень конфигурационного отличия от ГАМК вее физиологически активной конформации. Так, более активными являются производные с *трет*.-бутиламидной, затем сложноэфирными группами (сравни активность амида II и сложного эфира III с одинаковой конфигурацией стереогенных центров), затем следуют соединения с амидной и нитрильной группами (можно предположить, что условия конверсии амидов до кислот в организме бактерий близки к механизмам типа S_N1 и *трет*.-бутиламидная группировка оказывается наиболее активной в реакции гидролиза). Среди всех проанализированных веществ выделяется амид I с *транс*-диаксиальным расположением гидроксильных групп, активность которого в 5 раз превышает активность его ацилированного производного IV и в 2,5 раза превышает активность эпимерного по C_3амида II. Очевидно, именно подобная конфигурация с *транс*-диаксиальным расположением гидроксильных групп обеспечивает наиболее выраженное ингибирующее действие на развитие бактерий в результате нарушения естественных процессов метаболизма. В то же время соединения с аксиальным расположением кислотообразующей группировки обладают минимальной активностью (отсутствие активности для амида XII).

Таблица1. Зависимость структура-активность против Mycobacteriumtuberculosis

№	**Структура**	**Exvivo**	**Insilico**	
		% ингибирования	Свободная энергия связывания	Константа ингибирования
I		65	-9.52 kcal/mol	105 nM
II		23	-8.14 kcal/mol	1.07 uM
III		18	-8.88 kcal/mol	307.63 nM
IV		13	-6.34 kcal/mol	22.50 uM
V		12	-8.68 kcal/mol	433.06 nM
VI		10	-6.58 kcal/mol	14.92 uM
VII		8	-7.45 kcal/mol	3.45 uM
VIII		8	-7.36 kcal/mol	4.06 uM
IX		5	-8.22 kcal/mol	949.25 nM

Репозиторий БГМУ

X		5	-7.59 kcal/mol	2.75 uM
XI		0	-6.96 kcal/mol	7.90 uM

Результаты проведенного исследования говорят о том, что синтезированные производные изонипекотиновой кислоты представляют интерес в качестве потенциальных лекарственных средств для лечения туберкулеза, и что варьирование конфигурации стереогенных центров и природы кислотообразующей группы могут привести к открытию новых веществ с препаративными значениями антибактериальной активности. Это особенно актуально в связи с резистентностью патогенных организмов к существующим традиционным лекарственных средствам.

Выводы:

1. Активность α,β-дигидроксизамещенных производных изонипекотиновой кислоты зависит от природы и взаимного положения функциональных групп.

2. Более активными являются производные с трет.-бутиламидной группой в экваториальном положении и с *транс*-диаксиальным расположением гидроксильных групп.

3. Исследованияexvitro и insilico дают сопоставимые результаты и использование данных методов в совокупности может быть эффективным для дизайна и разработки методов синтеза новых перспективных лекарственных средств для лечения туберкулёза.

Литература

1. Brine G. A., Stark P. A., Carroll F. L., Singh P. Synthesis of 4,4-Disubstituted Piperidine Analogs of (□)-*cis*-N-[1-(2Hydroxy-2-Phenylethyl)-3-methyl-4-piperidyl]-N-phenylpropanamide. //J. Het. Cem.-1994.-Vol. 31, N 3.-P. 513-520.

2. Dugas H. Bioorganic Chemistry.A Chemical Approach to Enzyme Action. NY: Springer-Verl., 1989 P. 96-109 MolecularRecognitionandDrugDesign

3. Jacobsen P, Labouta I., Schaumburg K., Falch E, Kroggsgaard-Larsen P. Hydroxy- and Amino-substituted Piperidinecarboxylic Acids as □-Aminobutiric Acid Agonist and Uptake Inhibitors. // J. Med. Chem.- 2002.-Vol. 25, N 10.-P.-1157-1162.

4. Takayama K, Wang C, Besra GS. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*// ClinMicrobiol Rev. 2005 Jan; 18(1): 81–101.

5. Лахвич Ф.Ф., Хрипач Н. Б., Станишевский Л. С. Стереохимия гидроцианирования гидроксипиперидин-4-онов // ХГС.-1993, N 5.-С. 673-676.

6. Лахвич Ф.Ф., Лахвич О.Ф., Станишевский Л.С. Стереохимия и продукты присоединения трет.-бутилизонитрила по карбонильной группе 3-гидроксипиперидин-4-онов // ХГС.-1997, N 4.-С. 523-527.

7. http://www.dockingserver.com/web/

8. http://www.rcsb.org/pdb/home/hom.do

9. http://tuberculist.epfl.ch/quicksearch.php?gene+name=kasa

Репозиторий БГМУ