

УДК 579.61

Новые 5-модифицированные пиримидиновые нуклеозиды – ингибиторы роста микобактерий

Л.А. Александрова^{1*}, Э.Р. Шмаленюк¹, С.Н. Кочетков¹, В.В. Ерохин², Т.Г. Смирнова², С.Н. Андреевская², Л.Н. Черноусова²

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

² Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, 107564, Москва, Яузская аллея, 2

*E-mail: ala2004_07@mail.ru

РЕФЕРАТ Туберкулез (ТБ) является одной из важнейших проблем современного здравоохранения. В связи с появлением новых штаммов *M.tuberculosis*, на которые стандартные методы лечения практически не действуют, необходим поиск принципиально новых анти-ТБ агентов. Настоящая работа посвящена изучению способности новых аналогов пиримидиновых нуклеозидов ингибировать рост *M.tuberculosis*. Показано, что 2'-дезоксидеокси-, 3'-азидо-2',3'-дидезокси- и 3'-амино-2',3'-дидезокси- производные уридина и цитидина, содержащиеся в 5-м положении основания протяженные метилоксиалкильные заместители, способны ингибировать рост культуры микобактерий *M.tuberculosis* H37Rv *in vitro*. 5-метилоксидодецил-2'-дезоксидеоксиуридин продемонстрировал наиболее значительную анти-ТБ активность. В то же время 5'-монофосфаты изученных нуклеозидов не обладали противомикробными свойствами. Наиболее эффективные производные нуклеозидов могут послужить прототипами для создания новых противотуберкулезных препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, противотуберкулезные препараты, нуклеозиды, 5-замещенные пиримидиновые нуклеозиды, ингибиторы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТБ – туберкулез, ВИЧ – вирус иммунодефицита человека, МЛУ – множественная лекарственная устойчивость, МИК – минимальная ингибирующая концентрация, КОЕ – колониеобразующая единица.

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез (ТБ) представляется одной из важнейших проблем современного здравоохранения. В начале XXI в. ТБ – одно из наиболее распространенных инфекционных заболеваний, около трети мировой популяции (более двух миллиардов человек) инфицированы *Mycobacterium tuberculosis*. По данным ВОЗ, около 9 млн человек болеет ежегодно, более 2 млн человек в год умирает от ТБ; из них 10 % инфицированы ВИЧ [1, 2]. Заражение ВИЧ повышает шанс реактивации латентной формы туберкулеза [3], и в то же время вызывает быстрое развитие ТБ вскоре после (ре)инфицирования [4]. Риск перехода латентной формы туберкулеза в активную для больных СПИДом достигает 50 %, а для остального населения – всего 10 %.

В начале 1950-х годов были разработаны эффективные и доступные методы лечения ТБ, основанные на использовании различных комбинаций лекарств. Иногда в схему химиотерапии может входить более десяти противотуберкулезных препаратов [5]. С этого времени широкое применение противотуберкулезных препаратов и вакцинация привели к значительному снижению смертности от ТБ. С другой стороны, использование лекарственных средств способствовало отбору штаммов, устойчивых одновременно

но к препаратам нескольких классов. Больные СПИДом, наркоманы и пациенты, перенесшие трансплантацию, имеют крайне ослабленный иммунитет, и поэтому становятся жертвами ТБ. Все это привело к тому, что в конце 1980-х годов частота случаев ТБ в мире снова стала расти. В 1993 г. ВОЗ объявила в связи с ТБ о глобальной критической ситуации. Особо следует отметить новые штаммы *Mycobacterium tuberculosis*: с широкой лекарственной устойчивостью (ХДР) и множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [1], на которые стандартные схемы химиотерапии практически не действуют. МЛУ-ТБ обычно возникает как результат неправильного лечения, когда пациенты получают противотуберкулезные препараты в недостаточном количестве [6]. Кроме того, с начала терапии ТБ до выздоровления обычно проходит не менее полугода, и все это время контакты с инфицированным могут приводить к заражению [5]. Основным фактором, определяющим развитие резистентности под воздействием противотуберкулезных препаратов, является селекция лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий, несущих мутации в геноме.

Для России ТБ представляет одну из важнейших проблем, поскольку на сегодняшний день его распространен-

№	X	R1	R2	R3
1	ОН	C ₁₀ H ₂₁	ОН	ОН
2	ОН	C ₁₂ H ₂₅	ОН	ОН
3	ОН	C ₁₀ H ₂₁	H ₂ PO ₄	ОН
4	NH ₂	C ₁₀ H ₂₁	H ₂ PO ₄	ОН
5	ОН	C ₉ H ₁₉	H ₂ PO ₄	ОН
6	NH ₂	C ₁₂ H ₂₅	ОН	ОН
7	NH ₂	C ₁₄ H ₂₉	ОН	ОН
8	ОН	C ₁₂ H ₂₅	ОН	ОН
9	ОН	C ₁₂ H ₂₅	ОН	N ₃
10	ОН	C ₁₂ H ₂₅	ОН	NH ₂

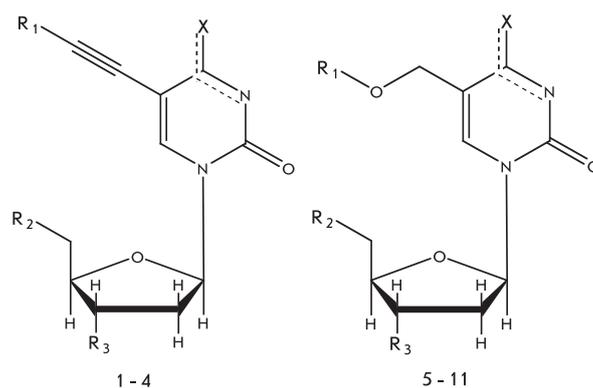


Рис. 1. Структура изучаемых соединений

ность составляет 190.5 случая на 100 тысяч населения, а заболеваемость – 85.1 на 100 тысяч населения, смертность – 17.9 на 100 тысяч. При этом, согласно статистическим данным МЗ и СР РФ, в России частота МЛУ-ТБ среди впервые выявленных составляет 13.6 %, а среди больных с рецидивами – 28.8 % [7]. В связи с вышесказанным необходим поиск принципиально новых противотуберкулезных препаратов.

Терапия вирусных инфекций часто основывается на использовании производных природных нуклеозидов [8]. Противотуберкулезная активность нуклеозидов до недавнего времени не была выявлена. В последнее время появились сообщения о нескольких группах модифицированных нуклеозидов, продемонстрировавших на экспериментальных моделях заметное антимикобактериальное действие [9–14].

Недавно показано, что 5-модифицированные пиримидиновые нуклеозиды с протяженными 1-алкильными заместителями обладают ингибирующей активностью в отношении *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis in vitro* [11–14]. Наилучшую антимикобактериальную активность продемонстрировали 5-(1-додецинильные) и 5-(1-тетрадецинильные) производные нуклеозидов. Изучение влияния модификации углеводного фрагмента на противобактериальные свойства 5-модифицированных нуклеозидов показало, что практически все 2'-дезоксидезокси-, 2',3'-дидезокси-, 2',3'-дидезокси-3'-фтор-, 2',3'-дидезокси-2'-фтор- нуклеозиды, а также ациклические и арабинонуклеозиды с протяженными 1-алкильными заместителями демонстрировали анти-ТБ-активность [11–14]. Настоящая работа посвящена изучению способности ингибировать рост *Mycobacterium tuberculosis* синтезированными нами 2'-дезоксидезокси-, 3'-азидо-2',3'-дидезокси- и 3'-амино-2',3'-дидезокси- пиримидиновыми нуклеозидами, содержащими в 5-м положении основания протяженные метилоксиалкильные заместители.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые соединения (1 – 10, рис. 1). 5-(1-додецинил)- и 5-(1-тетрадецинил)-2'-деоксиуридин (1 и 2, соответственно), используемые в качестве контроля, получены

по методу [11]. 5-метоксиалкильные производные пиримидиновых нуклеозидов (6–10) синтезированы по разработанному нами методу [15], 5'-монофосфаты нуклеозидов (3–5) по методу [15–16].

Микобактериальный штамм. Для проведения испытаний препаратов использовали чувствительный к противотуберкулезным препаратам лабораторный штамм *M.tuberculosis* H37Rv. Микобактерии были переведены в суспензию одиночных клеток в одинаковой фазе роста и стандартизованы по КОЕ [17]. В работе использовали обогащенную жидкую питательную среду Дюбо (Difco).

Оценка эффективности препаратов. Изучение влияния препаратов на рост микобактериального штамма проводили на автоматической системе детекции роста Bactec MGIT 960 (BD, USA) в течение 24 дней. Микобактериальную суспензию в объеме 500 мкл инокулировали в 7.9 мл питательной среды. Конечная концентрация *M.tuberculosis* в образце составляла 10⁵–10⁶ КОЕ/мл. Каждую из концентраций, включая контрольные пробы без препарата, исследовали при трех повторах.

Антимикобактериальное действие препаратов оценивали по динамике роста *M.tuberculosis* H37Rv в присутствии различных концентраций препаратов по сравнению с ростом штамма на среде, не содержащей препаратов [17]. Детекция роста проводилась каждый час автоматически и регистрировалась с помощью программного обеспечения Epicenter (BD, USA). Рост микобактериальных клеток выражался в относительных единицах флюоресценции (ОЕФ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами изучена способность ингибировать рост *M.tuberculosis* синтезированных производных 2'-дезоксинуклеозидов (6–10, рис. 1), в которых протяженный линейный алкильный заместитель введен в 5-е положение пиримидинового основания через метилокси-группу, что обеспечивает большую подвижность углеводородного радикала по сравнению с 1-алкильными производными (1 и 2), описанными в литературе [11–14]. Разработанный нами метод синтеза 5-метоксиалкильных производных пиримидиновых нуклеозидов [15] значительно проще и дешевле предложен-

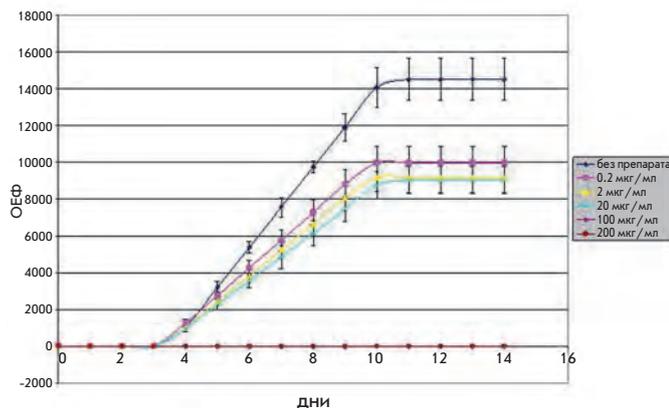


Рис. 2. Данные типичного эксперимента по проверке антимикобактериальной активности соединений. Диаграмма динамики роста культуры *M. tuberculosis* H37Rv под воздействием препарата **9** в различных концентрациях. ОЕФ – относительные единицы флюоресценции, регистрируемые с помощью программного обеспечения Epicenter (BD, USA)

ного способа получения 5-(1-алкинил)нуклеозидов [11–14]. Для выявления вклада 3'-модификации углеводного остатка в противотуберкулезную активность 5-модифицированных нуклеозидов были синтезированы производные 2'-дезоксигуанидина с одинаковым заместителем в пятом положении основания: 2'-дезокс-, 3'-азидо-2',3'-дидезокси- и 3'-амино-2',3'-дидезокси-5-метилоксидодецилуридин (**8–10**, рис. 1).

Результаты определения бактериостатической активности (ингибирующих рост концентраций) препаратов по росту микобактерий в автоматизированной системе Bactec MGIT960 показали, что культура *M. tuberculosis* H37Rv, экспонировавшаяся со средой без добавления препаратов, дала рост через 3.59 сут. Кривая роста имела классический сигмоидный вид и состояла из трех фаз – фаза скрытого роста (до 3.59 сут), экспоненциальной (лог-фаза, или фаза активного деления микобактериальных клеток) – с 3.59 сут по 10.25 сут и стационарной фазы, когда количество клеток в культуре не увеличивалось – с 10.25 сут до даты окончания эксперимента (рис. 2). Продолжительность фазы активного деления составила 6.66 сут.

На первом этапе, с целью подтверждения антимикобактериальной активности нуклеозидов и отработки условий проведения эксперимента, были исследованы 5-(1-додецил) и 5-(1-тетрадецил)-2'-дезоксигуанидин (**1** и **2**), в концентрациях 2, 20 и 200 мкг/мл, согласно литературным данным подавлявшим рост *M. bovis* (МИК₉₀ 50 и 10 мкг/мл, соответственно) и на 50–70 % ингибирующим в высоких концентрациях рост *M. avium* [11]. Нами было показано, что оба препарата полностью подавляли рост культуры *M. tuberculosis* в концентрации 200 мкг/мл.

5-метоксикальцильные производные пиримидиновых нуклеозидов (**6**, **7**, **9** и **10**) и монофосфаты нуклеозидов **3–5** тестируются в концентрациях 0,2, 2, 20, 100 и 200 мкг/мл, а 5-метилоксидодецил-2'-дезоксигуанидин (**8**) – в концентрациях 0,2, 2, 20, 50 и 100 мкг/мл. Данные типичного экс-

перимента по проверке антимикобактериальной активности соединений приведены на рис. 2.

При исследовании антимикобактериального действия препаратов **6–10** на культуру *M. tuberculosis* H37Rv было показано, что препарат **6** вызывал 100 %-ное ингибирование роста при концентрациях 200 и 100 мкг/мл, **7** – 200 и 100 мкг/мл, **8** – 100 и 50 мкг/мл, **9** – 200 и 100 мкг/мл, **10** – 200 и 100 мкг/мл (рис. 2). Таким образом, минимальная ингибирующая концентрация (МИК) для препаратов **6**, **7**, **9** и **10** составила 100 мкг/мл и препарата **8** – 50 мкг/мл.

Нуклеозиды, содержащие в 5-м положении нуклеинового основания объемные гидрофобные группы, плохо растворимы в воде. Для повышения растворимости мы синтезировали 5'-монофосфаты нуклеозидов (**3-**) по методу [16], однако полученные соединения не ингибировали рост микобактерий даже в высокой (200 мкг/мл) концентрации, и параметры кривых роста культуры, культивируемой с этими препаратами, не отличались от контроля без препарата.

Нами была оценена продолжительность фазы активного роста культуры, экспонируемой с тестируемыми препаратами, в концентрациях, не приводящих к 100 %-ному ингибированию роста культуры, по сравнению с контролем (рис. 3). Данные выражены в относительных единицах (ОЕ), вычисленных как отношение времени фазы активного деления культуры, растущей в присутствии препарата, к продолжительности фазы активного деления контрольной культуры (*M. tuberculosis* H37Rv без препаратов). Как видно из рис. 3, под действием 20 мкг 5-метилоксидодецил-2'-дезоксигуанидина (**8**) и 5-метилоксидодецил-3'-амино-2',3'-дидезоксиуридина (**10**) наблюдается увеличение продолжительности фазы активного деления, достоверно отличающееся от контроля ($p \leq 0.01$), что свидетельствует о снижении интенсивности деления микобактериальных клеток в культуре. Следует отметить, что для этих

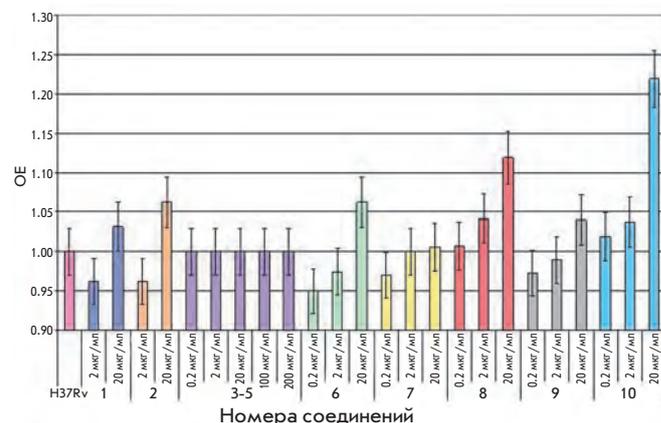


Рис. 3. Оценка эффективности препаратов, вызывающих ингибирование роста культуры *M. tuberculosis* при различных концентрациях. ОЕ – отношение продолжительности фазы активного деления культуры *M. tuberculosis* H37Rv, экспонируемой с тестируемыми препаратами, к продолжительности фазы активного деления контрольной культуры, принятой за единицу

препаратов показана задержка начала роста микобактерий по сравнению с контролем на 24 ч (для препарата **8**) и на 18 ч (для препарата **10**).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Мы впервые показали, что производные 2'-дезоксиринидина и 2'-дезокситидина с протяженными метилоксиалкильными заместителями способны ингибировать рост культуры микобактерий *M. tuberculosis* H37Rv. 5-метилоксидодецил-2'-дезоксиринидин (**8**) можно признать наиболее активным в отношении *M. tuberculosis*, поскольку он имел наименьшую МИК из всех тестируемых соединений (50 мкг/мл), а его воздействие в концентрации, не вызывающей 100 %-ного ингибирования, приводило к наибольшему увеличению продолжительности фазы активного деления и максимальной задержке начала роста культуры. Тем не менее нами не выявлено принципиальных различий

в ингибирующем действии пиримидиновых нуклеозидов, различающихся как структурой заместителя в 5-м положении основания (1-алкинильный или метилоксиалкильный), так и углеводным фрагментом (2-дезокси-, 2,3-дидезокси-3-азидо- и 2,3-дидезокси-3-аминорибофураноза).

Таким образом, нами продемонстрирована способность 5-метилоксиалкильных производных пиримидиновых 2'-дезоксинуклеозидов ингибировать рост *M. tuberculosis in vitro*, наиболее эффективные из которых могут послужить прототипами для создания новых противотуберкулезных препаратов. ●

Работа частично поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 08-04-00549).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Org., <http://www/who/int/mediacentre/factsheets/fs104/en/2005>
2. Banerjee R., Schechter G.F., Flood J., Porco T.C. // *Expert Rev. Anti Infect Ther.* 2008. V. 6. P. 713–24.
3. Bucher H.C., Griffith L.E., Guyatt G.H., Sudre P., Naef M., Sendi P., Battagay M. // *AIDS* 1999. V. 13. P. 501–507.
4. Daley C.L., Small P.M., Schechter G.F., Schoolnik G.K., McAdam R.A., Jacobs W.R., Hopewell P.C. // *N. Engl. J. Med.* 1992. P. 326. V. 231–235.
5. Ginsberg A.M., Spigelman M. // *Nat. Med.* 2007. V. 13. P. 290–4.
6. Tsuyuguchi I. // *Tuberculosis (Edinb.)* 2001. V. 81. P. 221–7.
7. Туберкулез в России. ООО «РПЦ Прима». М., 2009.
8. De Clercq E. // *Adv. Virus Res.* 2009. V. 73. P. 1–53.
9. Van Calenbergh S. // *Verh K Acad. Geneeskdg Belg.* 2006. V. 68. P. 223–48.
10. Gupte A., Boshoff H.I., Wilson D.J., Neres J., Labello N.P., Somu R.V., Xing C., Barry III C.E., Aldrich C.C. // *J. Med. Chem.* 2008. 51. 7495–7507.
11. Rai D., Johar M., Manning T., Agrawal B., Kunimoto D.Y., Kumar R. // *J. Med. Chem.* 2005. 48. 7012–7017.
12. Rai D., Johar M., Srivastav N.C., Manning T., Agrawal B., Kunimoto D. Y., Kumar R. // *J. Med. Chem.* 2007. 50. 4766–4774.
13. Johar M., Manning T., Tse C., Desroches N., Kunimoto D.Y., Agrawal B., Kumar R. // *J. Med. Chem.* 2007. 50. 3696–3705.
14. Srivastav N.C., Manning T., Kunimoto D.Y., Kumar R. // *Bioorganic & Medical Chemistry*. 15. 2007. 2045–2053.
15. Alexandrova L.A., Skoblov A.Yu., Jasko M.V., Victorova L.S., Kravetsky A.A. // *Nucl. Acids Res.* 1998. 26. № 3. 778–786.
16. Дяткина Н.Б., фон Янта-Липински М., Минасян Ш.Х., Куханова М.К., Краевский А.А., Чиджавадзе З.Г., Бибилашвили Р.Ш. // *Биоорганическая химия*. 1987. Т. 13. С. 1366–1374.
17. Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Кузьмин А.В. // *Пробл. туб. и болезн. легк.* 2006. № 12. С. 43–48.