

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ГИБРИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ БЕНЗОФУРОКСАНОВ И ПОЛИЕНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

© Е. А. Чугунова,^{1@} Р. Э. Мухаматдинова,² М. А. Сазыкина,³ И. С. Сазыкин,³ М. И. Хаммами,³ Н. И. Акылбеков,² А. Р. Бурилов,¹ Н. В. Кулик,¹ В. В. Зобов¹

¹Институт органической и физической химии имени А. Е. Арбузова
Казанского научного центра Российской академии наук

Россия, 420088, Казань, ул. Арбузова, 8; e-mail: elena-chuginova@list.ru

²Казанский национальный исследовательский технологический университет

³Южный федеральный университет

Академия биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Ростов-на-Дону

Впервые синтезированы гибридные соединения 4,6-дихлор-5-нитробензофураксана, 7-хлор-4,6-динитробензофураксана и 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана с полиеновыми антибиотиками (амфотерицином В и нистатином) и показано, что полученные соединения проявляют биологическую активность, сопоставимую с активностью исходных антибиотиков. Соединение на основе 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана и нистатина проявляет биологическую активность по отношению к *Trichophyton mentagrophytes*, превышающую в 4 раза активность исходного нистатина.

Ключевые слова: бензофураксан, гибридные соединения, нистатин, амфотерицин В, биолюминесцентные сенсоры.

Для лечения грибковых заболеваний, вызванных различными патогенными грибами, в том числе рода *Candida* и *Aspergillus*, *Histoplasma capsulatum* и *Cryptococcus neoformans*, часто применяют полиеновые антибиотики амфотерицин В и нистатин. Однако эти препараты имеют побочные эффекты, такие как нефротоксичность, низкая всасываемость из желудочно-кишечного тракта, плохое проникновение в спинномозговую жидкость, которые ограничивают клиническое применение [1].

В последнее время особое внимание исследователей привлекает получение производных липосомальных амфотерицина и нистатина, которые могут значительно снизить токсичность, улучшить фармакокинетические свойства и увеличить стабильность антибиотиков. С целью получения новых полусинтетических производных полиеновых антибиотиков мы провели реакции амфотерицина В и нистатина с производными бензофураксана, обладающими широким спектром биологической активности [2], и исследовали противогрибковую активность синтезированных производных. Мы предполагали, что

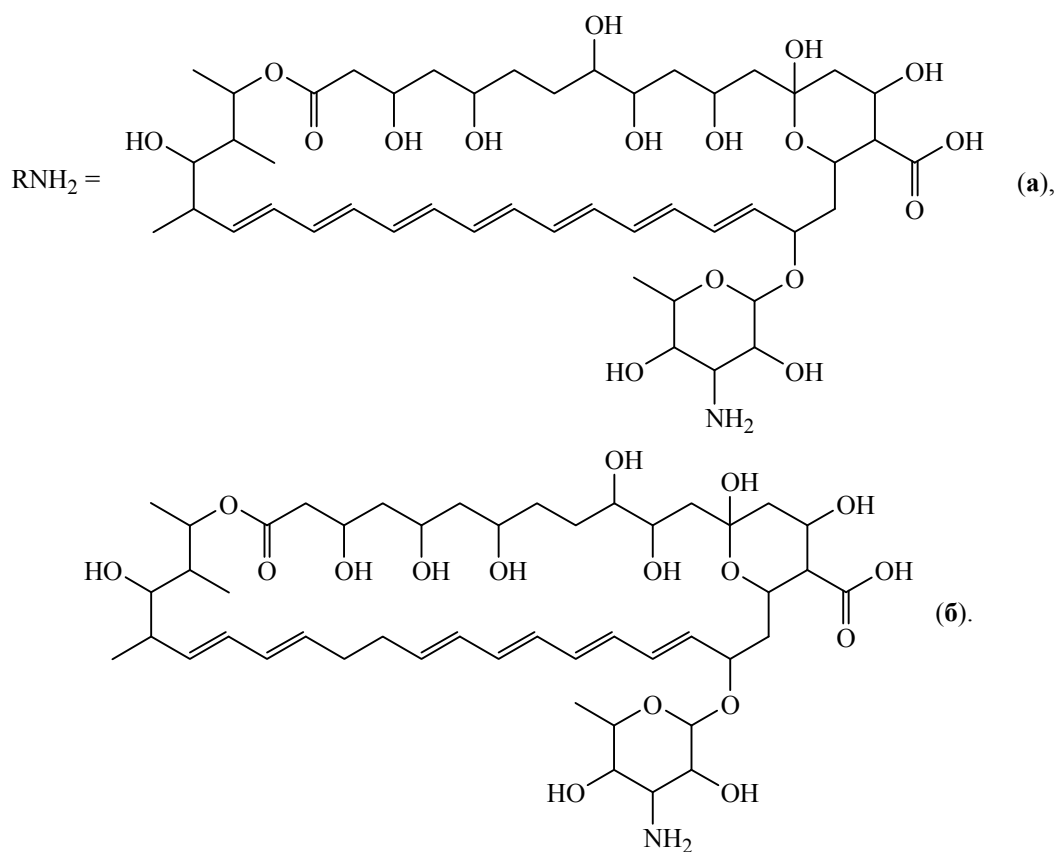
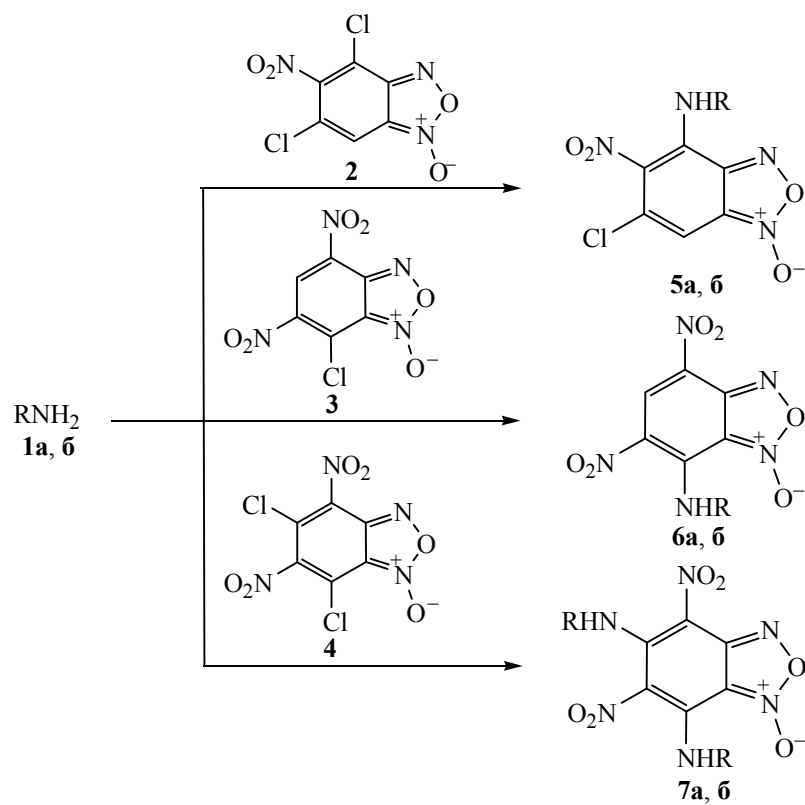
введение NO-донорного бензофураксанового фрагмента [3] в молекулу препарата сохранит фунгицидную активность лекарства при минимизации токсических эффектов.

Гибридные соединения 5–7 были получены взаимодействием бензофураксанов 2–4 с амфотерицином В 1а и нистатином 1б. Исходные 4,6-дихлор-5-нитро- (2), 4,6-динитро-7-хлор- (3) и 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксаны (4) синтезировали из соответствующих нитроанилинов [4–6].

Выход полученных соединений составил 54–68%. Структура соединений 5–7 была доказана данными ИК и ЯМР ¹H спектроскопии, состав – данными элементного анализа.

В спектрах ЯМР ¹H 5–7 присутствуют сигналы протонов фрагментов нистатина и амфотерицина В [7, 8], бензофураксанового кольца в области 6.5–7.3 м. д. (5а, б) или 8.85–8.95 м. д. (6а, б) и NH-группы в области 8.50–8.65 м. д.

Интегральную токсичность полученных соединений по отношению к бактериальным клеткам оценивали при помощи биосенсорных штаммов



Vibrio aquamarinus ВКПМ В-11245 и *Escherichia coli* MG1655 (pXen7).

Показано, что соединения **5a** и **5b** токсичны в

концентрациях 10^{-5} – 10^{-8} М. в отношении бактерий штамма *V. aquamarinus* ВКПМ В-11245. В случае биосенсора *E. coli* MG1655 (pXen7) данные соеди-

нения проявляют допустимую токсичность в концентрациях $\leq 10^{-4}$ М.

Все исследованные производные бензофураксана не проявили заметной биологической активности в отношении повреждения ДНК как с метаболической активацией [биосенсор *E. coli* MG1655 (pRecA-lux)], так и без нее. Они не вызывают окислительного стресса вследствие повышения внутриклеточного уровня супероксид-анион-радикала и оксида азота [биосенсор *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux)], а также перекисных соединений [биосенсор *E. coli* MG 1655 (pKatG-lux)]. Исследуемые вещества не вызывают активации системы Quorum Sensing 1-го типа [биосенсор *E. coli* MG1655 (pVFR1-lux)].

Таким образом, исследование токсичности синтезированных соединений **5–7** с помощью lux-биосенсоров показало, что производные **5a** и **5b** проявляют бактериотоксические свойства в низких концентрациях (10^{-5} – 10^{-8} М.) по отношению к используемому в исследовании биосенсорному штамму *V. aquamarinus* ВКПМ В-11245. Данные соединения или их производные могут быть исследованы в качестве потенциальных антибактериальных препаратов.

Так как исследованные соединения обладают бактериотоксичностью, но не вызывают повреждения ДНК клетки, т. е. не являются генотоксичными, они были изучены на противогрибковую активность. В качестве тест-объектов использовали грибы *Aspurgillus niger* ВКМФ-1119, *Trichophyton gypseum* и *Candida albicans* 855-653. Среди всех исследованных соединений наиболее высокую противогрибковую активность показали производные **5a**, **5b** и **7b**. Производные 4,6-дихлор-5-нитробензофураксана **2** и 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана **4** на основе полиеновых антибиотиков **5** и **7** сохраняют активность, свойственную исходным препаратам. Наиболее активным является соединение **7b**. Его активность по отношению к *Trichophyton gypseum* в 4 раза превышает активность исходного нистатина. Введение в молекулы нистатина и амфотерицина В фрагмента 7-хлор-4,6-динитробензофураксана **3** приводит к полному исчезновению биологической активности.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^1H записаны на спектрометре Bruker MSL-400 с рабочей частотой 400.13 МГц относительно сигналов остаточных протонов дейтерированного растворителя (DMSO- d_6). ИК спектры сняты на Фурье-спектрометре Vector 22 Bruker в

интервале 400–4000 cm^{-1} . Образцы исследовали в виде таблеток KBr. Температуры плавления определяли на нагревательном столике Voetius. Полноту протекания реакций и чистоту синтезированных соединений контролировали методом тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil (Краснодар, Россия), проявитель – УФ излучение. Элементный анализ выполнен на элементном анализаторе Carlo-Erba EA 1108.

Исходные лекарственные препараты очищали от наружной оболочки механическим путем, затем растирали до порошкообразного состояния, растворяли в ДМСО и отфильтровывали, фильтрат с активным компонентом использовали для реакции.

Синтез производных бензофураксана 5a, б. К раствору 0.001 моля 4,6-дихлор-5-нитробензофураксана **2** и 0.001 моля NaHCO_3 2 мл ДМСО добавляли раствор 0.001 моля противогрибкового препарата в 3 мл ДМСО. Полученную реакционную смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре, затем выливали в дистиллированную воду. Осадок отделяли, промывали бензолом и сушили в вакууме (0.06 мм рт. ст.) при 40°C до постоянной массы. Выделенный порошок очищали колоночной хроматографией на силикагеле Lancaster (0.060–0.2 мм) в системе бензол–этилацетат. Фракции, содержащие целевой продукт объединяли, растворитель упаривали в вакууме. Остаток перекристаллизовали из смеси ацетон–пентан (1:3).

19E,21E,23E,25E,27E,29E,31E-4-({2-[(36-Карбоксии-1,3,4,7,9,11,17,37-октагидрокси-15,16,18-триметил-13-оксо-14,39-диоксабицикло[33.3.1]нонатриаконта-19,21,23,25,27,29,31-гептен-33-ил)-окси]-3,5-дигидрокси-6-метилтетрагидро-2H-пиран-4-ил}амино)-6-хлор-5-нитробензо[с][1,2,5]-оксадиазол-1-оксид (5a). Выход 0.70 г (60%), коричневатый порошок, т. пл. 100°C. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1556 (NO_2), 1624 (фураксановое кольцо), 3435 (NH). Найдено, %: С 55.90; Н 6.29; Cl 3.00; N 4.65. $\text{C}_{53}\text{H}_{73}\text{ClN}_4\text{O}_{21}$. Вычислено, %: С 55.96; Н 6.47; Cl 3.12; N 4.92.

19E,21E,25E,27E,29E,31E-4-({2-[(36-Карбоксии-1,3,4,7,9,11,17,37-октагидрокси-15,16,18-триметил-13-оксо-14,39-диоксабицикло[33.3.1]нонатриаконта-19,21,25,27,29,31-гексен-33-ил)окси]-3,5-дигидрокси-6-метилтетрагидро-2H-пиран-4-ил}амино)-6-хлор-5-нитробензо[с][1,2,5]оксадиазол-1-оксид (5b). Выход 0.76 г (65%), оранжевый порошок, т. пл. 102–103°C. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1565 (NO_2), 1622 (фураксановое кольцо), 3432 (NH). Найдено, %: С 55.99; Н 6.48; Cl 3.00; N 5.12. $\text{C}_{53}\text{H}_{73}\text{ClN}_4\text{O}_{21}$. Вычислено, %: С 55.86; Н 6.63; Cl 3.11; N 4.92.

Производные 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуросана **7a** и **7b** получали аналогично без использования NaHCO_3 . Производные 7-хлоро-4,6-динитробензофуросана **6a** и **6b** получали аналогично с использованием в качестве растворителя этилового спирта; время реакции – 4 ч при 60°C.

19E,21E,25E,27E,29E,31E-7-(2-[(36-Карбокси-1,3,4,7,9,11,17,37-октагидрокси-15,16,18-триметил-13-оксо-14,39-диоксабицикло[33.3.1]нонатриаконта-19,21,25,27,29,31-гексен-33-ил)окси]-3,5-дигидрокси-6-метилтетрагидро-2H-пиран-4-ил}амино)-4,6-динитробензо[с][1,2,5]оксадиазол-1-оксид (6a). Выход 0.61 г (54%), светло-коричневый порошок, т. пл. 155°C. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1540 (NO_2), 1629 (фуросановое кольцо), 3451 (NH). Найдено, %: C 55.29; H 6.26; N 6.43. $\text{C}_{53}\text{H}_{73}\text{N}_5\text{O}_{23}$. Вычислено, %: C 55.44; H 6.41; N 6.10.

19E,21E,25E,27E,29E,31E-7-(2-[(36-Карбокси-1,3,4,7,9,11,17,37-октагидрокси-15,16,18-триметил-13-оксо-14,39-диоксабицикло[33.3.1]нонатриаконта-19,21,25,27,29,31-гексен-33-ил)окси]-3,5-дигидрокси-6-метилтетрагидро-2H-пиран-4-ил}амино)-4,6-динитробензо[с][1,2,5]оксадиазол-1-оксид (6b). Выход 0.72 г (64%), черный порошок, т. пл. 100°C. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1564 (NO_2), 1632 (фуросановое кольцо), 3420 (NH). Найдено, %: C 55.70; H 6.71; N 6.15. $\text{C}_{53}\text{H}_{75}\text{N}_5\text{O}_{23}$. Вычислено, %: C 55.34; H 6.57; N 6.09.

19E,21E,25E,27E,29E,31E-5,7-бис(2-[(36-Карбокси-1,3,4,7,9,11,17,37-октагидрокси-15,16,18-триметил-13-оксо-14,39-диоксабицикло[33.3.1]нонатриаконта-19,21,23,25,27,29,31-гептен-33-ил)окси]-3,5-дигидрокси-6-метилтетрагидро-2H-пиран-4-ил}амино)-4,6-динитробензо[с][1,2,5]оксадиазол-1-оксид (7a). Выход 1.20 г (68%), оранжевое масло. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1552 (NO_2), 1618 (фуросановое кольцо), 3433 (NH). Найдено, %: C 58.22; H 6.89; N 4.31. $\text{C}_{100}\text{H}_{144}\text{N}_6\text{O}_{40}$. Вычислено, %: C 58.02; H 7.01; N 4.06.

19E,21E,25E,27E,29E,31E-5,7-бис(2-[(36-Карбокси-1,3,4,7,9,11,17,37-октагидрокси-15,16,18-триметил-13-оксо-14,39-диоксабицикло[33.3.1]нонатриаконта-19,21,25,27,29,31-гексен-33-ил)окси]-3,5-дигидрокси-6-метилтетрагидро-2H-пиран-4-ил}амино)-4,6-динитробензо[с][1,2,5]оксадиазол-1-оксид (7b). Выход 1.04 г (59%), светло-желтый порошок, т. пл. 97–98°C. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1568 (NO_2), 1623 (фуросановое кольцо), 3460 (NH). Найдено, %: C 58.18; H 7.04; N 4.33. $\text{C}_{100}\text{H}_{148}\text{N}_6\text{O}_{40}$. Вычислено, %: C 57.90; H 7.19; N 4.05.

Биологическую активность исследовали с использованием бактериальных lux-биосенсоров для

определения интегральной токсичности [*V. aquamarinus* VKPM В-11245, *E. coli* MG1655 (pXen7)], ДНК-тропных эффектов [*E. coli* MG1655 (pRecA-lux), *E. coli* MG1655 (pColD-lux)], веществ, вызывающих окислительный стресс [*E. coli* MG 1655 (pKatG-lux), *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux)], а также влияющих на бактериальную систему Quorum Sensing 1-го типа [*E. coli* MG1655 (pVFR1-lux)].

Биосенсорные штаммы, полученные путем трансформации штамма *E. coli* MG1655 гибридными плазмидами pXen7, pRecA-lux, pColD-lux, pKatG-lux, pSoxS-lux, pVFR1-lux, предоставлены И.В. Мануховым (ГосНИИГенетика). Природный штамм *V. aquamarinus* VKPM В-11245 выделен из воды Черного моря [9].

Определение токсичности с помощью бактериальных lux-биосенсоров проводили по методике [10]. Фунгистатические свойства изучали методом серийных разведений в жидкой питательной среде по методикам [11] в соответствии с методическими указаниями по изучению противомикробной активности фармакологических веществ [12]. Бактериостатическое и фунгистатическое действие препаратов наблюдали при задержке роста тест-микроорганизма в концентрациях, не превышающих 500 мкг/мл. За действующую дозу принимали наименьшую концентрацию препарата, при которой наблюдалась задержка роста и размножения тест-культур микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-03-31365) и Южного федерального университета (грант № 213.01–07–2014/12ПЧВГ) с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Биотехнология, биомедицина и экологический мониторинг».

Список литературы

1. Бурбелло А.Т., Шабров А.В., Денисенко П.П. Современные лекарственные средства: Клинико-фармакологический справочник практического врача СПб: Нева, 2003. 864 с.
2. Jovené C., Chugunova E.A., Goumont R. // Mini Rev. Med. Chem. 2013. Vol. 13. N 8. P. 1089. DOI: 10.2174/1389557511313080001.
3. Григорьев Н.Б., Граник В.Г. Оксид азота (NO): Новый путь к поиску лекарств. М.: Вузовская книга, 2004. 360 с.
4. Юсупова Л.М., Молодых Ж.В., Бузыкин Б.И., Фаляхов И.Ф., Анисимова Н.Н., Шарнин Г.П., Булидоров В.В., Свиридов С.И., Левинсон Ф.С. Пат. РФ № 2032678 (1995).
5. Norris W.P., Chafin A. // Heterocycles. 1984. Vol. 22. P. 271. DOI: 10.3987/R-1984-02-0271.

6. Юсупова Л.М., Фаляхов И.Ф., Снатлова Л.В., Гарипов Т.В., Шиндала Махамад Кхамид Т.А., Иникаев Д.Р. Пат. РФ № 2255935 (2005).
7. Lancelin J.-M., Beau J.-M. // *Tetrahedron Lett.* 1989. Vol. 30. P. 4521. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)80734-6.
8. McNamara C.M., Box S., Crawforth J.M., Hickman B.S., Norwood T.J., Rawlings B.J. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1998. Vol. 1. P. 83. DOI: 10.1039/A704545J.
9. Сазыкин И.С., Сазыкина М.А., Кудеевская Е.М., Сазыкина М.И. Пат. РФ № 2534819 (2014).
10. Chugunova E., Boga C., Sazykin I., Cino S., Micheletti G., Mazzanti A., Sazykina M., Burilov A., Khmelevtsova L., Kostina N. // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. Vol. 93. P. 349. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.02.023.
11. Ведьмина Е.А., Фурер Н.М. Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. М.: Медицина, 1964. Т. 1. С. 670.
12. Милованова С.Н., Степанищева З.Г. Методы экспериментальной химиотерапии. М.: Медицина, 1971. С. 318.