

Федеральная целевая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы»

Программное мероприятие: 1.2 Проведение прикладных научных исследований для развития отраслей экономики

Соглашение о предоставлении субсидии № 14.575.21.0037 от 27 июня 2014 г.

Уникальный идентификатор Соглашения: RFMEFI57514X0037

Тема: «Разработка инновационных антибактериальных препаратов для профилактики и терапии внутри- и внебольничных инфекций, вызываемых полирезистентными штаммами грамположительных бактерий»

Сроки выполнения: 27.06.2014 – 31.12.2016 гг.

Исполнитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Индустриальный партнер: Открытое акционерное общество «Татхимфармпрепараты»

Научный руководитель: к.х.н., доцент Штырлин Юрий Григорьевич

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 27 июня 2014 г. № 14.575.21.0037 с Минобрнауки России в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» на этапах №№ 1-4 в период с 27.06.2014 г. по 30.06.2016 г. выполнялись следующие работы:

- проведение аналитического обзора информационных источников по теме ПНИ;
- патентные исследования по теме ПНИ по ГОСТ 15.011-96;
- обоснование выбора направления исследования ПНИ;
- синтез 101 соединения фторхинолонового ряда и четвертичных аммониевых солей;
- исследование антибактериальной активности синтезированных соединений *in vitro* на штаммах условно-патогенных микроорганизмов, в т.ч. полирезистентных;
- исследование токсичности *in vitro* наиболее активных из синтезированных соединений;
- выявление на основании проведенных исследований антибактериальной активности и токсичности *in vitro* соединений-лидеров;
- исследование острой токсичности выявленных соединений-лидеров на крысах;
- исследование подострой токсичности выявленных соединений-лидеров на крысах;
- исследование специфической активности соединений-лидеров на мышах;

- оптимизация химической структуры выявленных соединений-лидеров на основе результатов исследований антибактериальной активности и токсичности. Синтез 25 модифицированных соединений-лидеров фторхинолонового ряда и четвертичных аммониевых солей;

- исследование антибактериальной активности модифицированных соединений-лидеров *in vitro* на штаммах условно-патогенных микроорганизмов, в т.ч. полирезистентных;

- исследование токсичности *in vitro* модифицированных соединений-лидеров;

- исследование острой токсичности модифицированных соединений-лидеров на мышах или крысах;

- исследование подострой токсичности модифицированных соединений-лидеров на мышах или крысах;

- исследование специфической активности модифицированных соединений-лидеров на мышах или крысах;

- обоснование выбора кандидатов в лекарственные средства на основании проведенных исследований *in vitro* и *in vivo*;

- начало исследования хронической токсичности кандидатов в лекарственные средства на мышах или крысах;

- оценка влияния кандидатов в лекарственные средства фторхинолонового ряда на способность ингибировать процессы обмена нуклеиновых кислот в бактериальной клетке посредством специфического взаимодействия с комплексами нуклеиновых кислот с ДНК-гиразой и топоизомеразой IV;

- оценка влияния кандидатов в лекарственные средства, содержащих фрагменты четвертичных аммониевых солей, на целостности клеточной стенки и дезорганизацию цитоплазматической мембраны бактериальной клетки.

- за счет внебюджетных средств:

- проведение дополнительных патентных исследований РИД, полученных при выполнении ПНИ;
- участие в мероприятиях, направленных на освещение и популяризацию промежуточных и окончательных результатов ПНИ;
- закупка необходимого технологического и контрольно-измерительного оборудования.

При этом были получены следующие результаты:

Проведены аналитический обзор информационных источников и патентные исследования по теме ПНИ, на основе которых обоснован выбор направления исследования ПНИ.

Синтезировано 101 соединение фторхинолонового ряда или четвертичных аммониевых солей. Исследована антибактериальная активность 101 соединения *in vitro* на 7 штаммах условно-патогенных микроорганизмов (5 музейных и 2 клинических). Выявлены 37 соединений, обладающих высокой антибактериальной активностью по отношению к

грамположительным бактериям. Углубленное исследование антибактериального действия 37 отобранных соединений проведено на 30 клинических штаммах полирезистентных грамположительных бактерий и 2 клинических штаммах полирезистентных грамотрицательных бактерий. В результате этого этапа скрининга выявлены 16 наиболее активных соединений, которые сопоставимы или превосходят по своей активности высокоэффективные лекарственные препараты. Исследования отобранных соединений *in vitro* на эмбриональных клетках почки человека (HEK-293) и ДНК-повреждающей активности (SOS-хромотест) позволили выявить девять соединений-лидеров, которые превосходят по своей антибактериальной активности высокоэффективные препараты сравнения на полирезистентных штаммах грамположительных бактерий и обладают меньшей или сопоставимой с ними цитотоксичностью на эмбриональных клетках почки человека HEK-293.

Таким образом, по результатам двух этапов выполнения проекта после скрининга 101 соединения выявлено 9 соединений-лидеров, представляющих интерес для дальнейшего углубленного исследования антибактериальной активности и токсичности *in vivo* с целью выявления перспективных кандидатов в лекарственные средства.

Исходя из данных исследований антибактериальной активности и токсичности *in vitro*, а также синтетической доступности из 9 перспективных соединений были отобраны 3 соединения-лидера (AP-45, AP-53 и AP-25). Для исследования токсичности и специфической активности *in vivo* были наработаны опытные партии каждого из соединений в количествах 70-90 г. Исследование острой и подострой токсичности 3 соединений-лидеров *in vivo* на крысах показало, что соединение AP-45 существенно более токсично, чем AP-53 и AP-25 и не представляет интерес для дальнейшей разработки. Исследование специфической активности соединений AP-53 и AP-25 на модели генерализованного сепсиса на мышах в сравнении с моксифлоксацином показало, что соединение AP-25 существенно эффективнее, чем моксифлоксацин и наиболее перспективно для дальнейшей разработки. Соединение AP-53 оказалось гораздо менее эффективным по сравнению с моксифлоксацином.

Таким образом, по результатам трех этапов выполнения проекта после скрининга антибактериальной активности и токсичности *in vitro* и *in vivo* 101 соединения фторхинолонового ряда или четвертичных аммониевых солей, выявлен перспективный кандидат в антибактериальное лекарственное средство - соединение AP-25.

В рамках выполнения 4 этапа проекта была проведена оптимизация химической структуры выявленного по результатам первых трех этапов проекта кандидата в антибактериальное лекарственное средство AP-25 и синтезировано 25 новых соединений фторхинолонового ряда и четвертичных аммониевых солей. Был проведен первичный скрининг антибактериальной активности синтезированных соединений *in vitro* на 7 штаммах условно-патогенных микроорганизмов и выявлено 10 высокоактивных соединений.

Углубленное исследование антибактериального действия отобранных соединений на клинических штаммах полирезистентных грамположительных и грамотрицательных бактерий позволило выявить 6 наиболее активных соединений, которые сопоставимы или превосходят по своей активности высокоэффективные лекарственные препараты (моксифлоксацин, ломефлоксацин, мирамистин и ванкомицин). Исследования *in vitro* на эмбриональных клетках почки человека (НЕК-293), мутагенности (тест Эймса) и ДНК-повреждающей активности (SOS-хромотест) позволили выявить два соединения-лидера (AP-102 и FP-63), которые превосходят по своей антибактериальной активности высокоэффективные лекарственные препараты, а также обладают меньшей или сопоставимой с ними цитотоксичностью.

Для исследования токсичности и специфической активности *in vivo* были наработаны опытные партии каждого из соединений в количествах 70-90 г. Исследование острой и подострой токсичности на крысах 2 соединений-лидеров показало, что оба соединения являются нетоксичными и не оказывают негативного воздействия на показатели крови, внутренние органы и ткани животных. На модели генерализованного сепсиса на мышах специфическая активность соединений AP-102 и FP-63 оказалась значительно выше препарата сравнения моксифлоксацина.

Таким образом, по результатам четырех этапов проекта (скрининга антибактериальной активности и токсичности *in vitro* и *in vivo* 126 соединений фторхинолонового ряда и четвертичных аммониевых солей) были отобраны два кандидата в антибактериальные лекарственные средства - AP-25 и FP-63.

Исследование механизма действия отобранных кандидатов в антибактериальные лекарственные средства показало, что FP-63 ингибирует ферменты ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, а AP-25 вызывает дезорганизацию цитоплазматической мембраны бактериальной клетки. Начато исследование хронической токсичности соединений FP-63 и AP-25 на крысах.

Синтезированные соединения являются новыми, не имеющими аналогов по химической структуре.

Полученные результаты полностью соответствуют требованиям Технического задания и План-графику исполнения обязательств.

Комиссия Минобрнауки признала обязательства по Соглашению на отчетных этапах исполненными надлежащим образом.