



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **117279** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
C07D 213/00
A61P 11/00

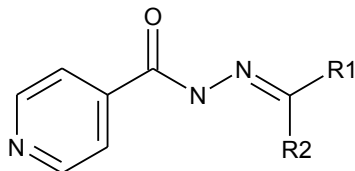
МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 13112	(72) Винахідник(и): Волинець Галина Петрівна (UA), Тукало Михайло Арсентійович (UA), Бджола Володимир Григорович (UA), Тарнавський Сергій Степанович (UA), Старосила Сергій Анатолійович (UA), Гудзера Ольга Йосипівна (UA), Ярмолюк Сергій Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 22.12.2016	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03680 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.06.2017	(74) Представник: Хоменко Ірина Іванівна, реєстр. №363
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.06.2017, Бюл.№ 12	

(54) НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНІ ОРГАНІЧНІ СПОЛУКИ З АНТИТУБЕРКУЛЬОЗНОЮ ДІЄЮ НА ОСНОВІ ГІДРАЗИДУ ІЗОНІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ**(57) Реферат:**

Низькомолекулярні органічні сполуки з антитуберкульозною дією на основі гідразиду ізонікотинової кислоти. Вони містять нові замісники загальної формули:



де R2 - H, R1 - 3-метокси-4-гідроксифеніл, 6-бензотіазол-2-метил, 2-нітрофеніл, 2,4-дигідроксифеніл, 2-піридин, 1-метил-1Н-пірол, 3-гідрокси-4-метоксифеніл, 4-метилфеніл, 1Н-індол-3-іл-1-(3-діетиламінопропан-2-ол), 1Н-індол-3-іл-1-(3-(пропіламіно-2-диметил-3-ол)пропан-2-ол), та R2 - CH₃, R1 - карбетокси, 4-нітрофеніл, 3-нітрофеніл, 4-н-гексилфеніл.

UA 117279 U

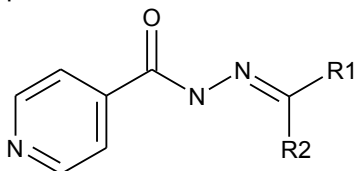
Пропонована корисна модель належить до класу гідразиду ізонікотинової кислоти та його застосування в терапії. Більш конкретно ця модель пропонує нові похідні гідразиду ізонікотинової кислоти, що мають антитуберкульозну активність. Запропоновані сполуки є корисними як фармацевтичні агенти для лікування туберкульозу.

Відомі лікарські препарати гідразиду ізонікотинової кислоти - ізоніазид, фтивазид, метаазид, опініазид, етіонамід, протіонамід, однак основною проблемою їх використання є розвиток стійкості мікобактерій до цих препаратів у більшості пацієнтів, що призводить до втрати ефективності лікування.

Серед всіх вищеперерахованих лікарських препаратів ізоніазид проявляє бактерицидну дію на мікобактерії в стадії розмноження та бактериостатичну - в стадії спокою. Ізоніазид - найефективніший із препаратів гідразиду ізонікотинової кислоти при будь-якій формі та локалізації активного туберкульозу як у дорослих, так і в дітей. Однак, при монотерапії ізоніазидом до нього швидко (у 70 % випадків) розвивається стійкість.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити нові похідні гідразиду ізонікотинової кислоти, що мають антибактеріальну активність щодо штамів *M tuberculosis*, резистентних до ізоніазиду.

Поставлена задача вирішується запропонованими низькомолекулярними органічними сполуками з антитуберкульозною дією на основі гідразиду ізонікотинової кислоти, а відповідно до пропозиції, вони містять нові замісники загальної формули:



де R2 - H, R1-3-метокси-4-гідроксифеніл, 6-бензотіазол-2-метил, 2-нітрофеніл, 2,4-дигідроксифеніл, 2-піридин, 1-метил-1Н-пірол, 3-гідрокси-4-метоксифеніл, 4-метилфеніл, 1Н-індол-3-іл-1-(3-діетиламіно-пропан-2-ол), 1Н-індол-3-іл-1-(3-(пропіламіно-2-диметил-3-ол)пропан-2-ол) та R2 - CH₃, R1 - карбетокси, 4-нітрофеніл, 3-нітрофеніл, 4-н-гексилфеніл.

Запропоновані речовини відрізняються за хімічною структурою замісників R1 та R2 від відомих у літературі [1-9].

Заявлені низькомолекулярні сполуки з антитуберкульозною активністю одержували наступним чином: суміш 1 ммоль гідразиду ізонікотинової кислоти, 1 ммоль відповідного альдегіду або ацетофенону у 75 мл водно-спиртового (1:1) розчину кип'ятили 20-60 хвилин до утворення осаду. Далі реакційну суміш охолоджували та осад відфільтровували. Виходи складали 52-87 %. Структуру синтезованих речовин встановлювали за допомогою спектрів ¹H-ЯМР, записаних у DMSO-D₆ на приладі "Varian MercuryVRX-400" з робочою частотою 400 МГц і внутрішнім стандартом - TMS. Одержані результати свідчать про відповідність синтезованих низькомолекулярних органічних сполук заявленим.

Дослідження антимікобактеріальної активності сполук за аеробних умов

Антимікробну активність сполук щодо штаму *M. tuberculosis* H37Rv, який культивували за аеробних умов, оцінювали шляхом визначення мінімальної інгібувальної концентрації (MIC) сполуки, тобто концентрації, що повністю припиняла ріст бактерій. Метод ґрунтувався на вимірюванні росту бактерій у рідкому середовищі флуоресцентного репортерного штаму H37Rv, де показниками були або оптична щільність або флуоресценція. Використання двох параметрів оцінки мінімізує проблеми, викликані преципітацією сполуки або автофлуоресценцією. Розраховували значення IC₅₀ - концентрацію сполуки, при якій ріст мікроорганізмів інгібується на 50 % та IC₉₀ - концентрацію сполуки, при якій ріст мікроорганізмів інгібується на 90 %.

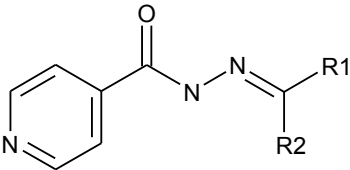
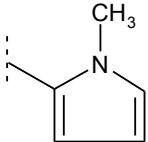
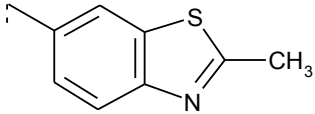
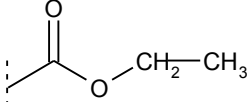
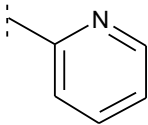
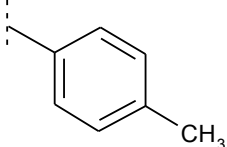
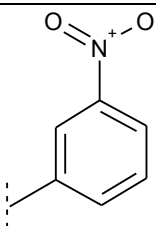
MIC визначали шляхом вимірювання бактеріального росту через 5 днів за присутності досліджуваних сполук. Сполуки розчиняли в DMSO (Fisher) та робили серію розведень шляхом двократного зменшення концентрації. Речовини розводили в середовищі 7H9-Tw-OADC (4,7 г/л поживного середовища Middlebrook 7H9 Base (VWR), Tween 80 (Fisher) (0,05 %), Middlebrook OADC Supplement (VWR) (10 %)) у 96-лункових плашках (фінальна концентрація DMSO становила 2 %). Найвища концентрація сполуки становила 200 мкМ у випадку якщо речовини були розчинні в DMSO в 10 мМ концентрації. Для сполук із поганою розчинністю найвища концентрація була нижчою в 50 разів, ніж стокова концентрація, наприклад, 100 мкМ для 5 мМ стокового розчину в DMSO, 20 мкМ для 1 мМ стокового розчину. Для високоактивних сполук досліди повторювали при нижчих початкових концентраціях. Кожна плашка містила декілька контролів (лише середовище/DMSO, без бактеріальних клітин), відсутність росту (100 мкМ рифампіцину (Sigma-Aldrich)) та максимальний ріст (лише DMSO). Плашки інокулювали

клітинами *M. tuberculosis* та інкубували протягом 5 днів: ріст вимірювали за оптичною щільністю (OD_{590}) та флуоресценцією (Ex 560/Em 590), використовуючи плашковий рідер BioTek™ Synergy 4. Для вимірювання чисельного значення MIC будували 10-точкову дозозалежну криву як % росту і підганяли до моделі Гомпертца з використанням GraphPad Prism 5. MIC розраховували з точки перегину кривої підігнаної до нижньої асимптоти (відсутній ріст бактерій). Крім того, дозозалежні криві генерували, використовуючи алгоритм Левенберга-Марквардта і визначали концентрації, при яких спостерігалось інгібування росту бактерій на 50 % та на 90 % (значення IC_{50} та IC_{90} , відповідно).

Хімічні структури замісників похідних гіdraзиду ізонікотинової кислоти та антимікобактеріальну активність досліджуваних сполук за аеробних умов наведено в таблиці 1.

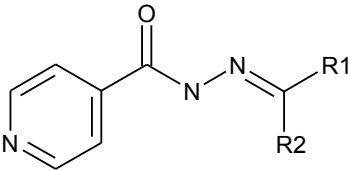
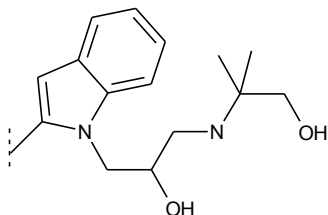
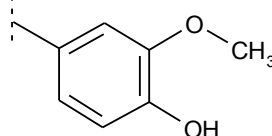
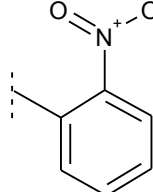
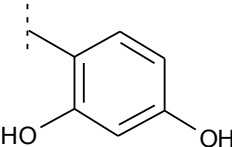
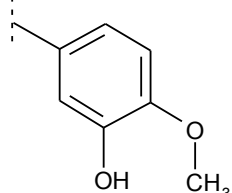
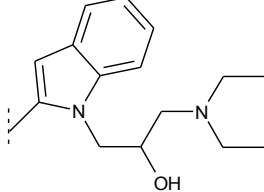
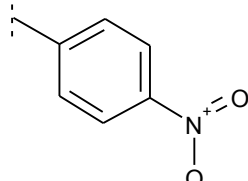
Таблиця 1

Хімічні структури замісників похідних гіdraзиду ізонікотинової кислоти та антимікобактеріальна активність (MIC (мкМ), IC_{50} (мкМ) та IC_{90} (мкМ)) за аеробних умов

					
№ сполуки	R1	R2	IC_{50}	IC_{90}	MIC
1		H	0,2	0,584	0,391
2		H	1,0	1,7	1,4
3		CH ₃	0,5	0,6	0,6
4		H	1,2	1,4	1,3
5		H	1,1	1,8	1,4
6		CH ₃	4,6	7,8	5,8

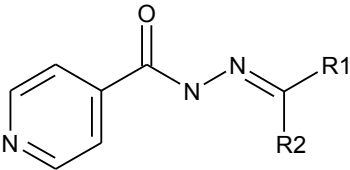
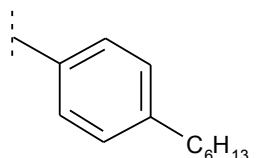
Таблиця 1

Хімічні структури замісників похідних гідразиду ізонікотинової кислоти та антимікобактеріальна активність (MIC (мкМ), IC₅₀ (мкМ) та IC₉₀ (мкМ)) за аеробних умов

					
№ сполуки	R1	R2	IC ₅₀	IC ₉₀	MIC
7		H	2,4	4,9	4,3
8		H	0,8	1,6	1,4
9		H	3,5	8,2	6,1
10		H	36	51	42
11		H	1,4	3,1	1,8
12		H	1,6	3,2	2,5
13		CH ₃	5,8	10	8

Таблиця 1

Хімічні структури замісників похідних гідразиду ізонікотинової кислоти та антимікобактеріальна активність (MIC (мкМ), IC₅₀ (мкМ) та IC₉₀ (мкМ)) за аеробних умов

					
№ сполуки	R1	R2	IC ₅₀	IC ₉₀	MIC
14		CH ₃	1,8	2,7	2,6

Дослідження активності сполуки 1 відносно до резистентних штамів *M. tuberculosis*.

Тестування сполуки 1 щодо резистентних штамів *M. tuberculosis* проводили в 96-лункових плашках. До лунок додавали по 100 мкл поживного середовища Middlebrook 7H12 (0,47 г поживного бульйону 7H9, 0,1 г казиту, 100 мл дистильованої води, 0,1 мл пальмітинової кислоти (5,6 мг/мл вільної кислоти в етанолі), 0,5 г розчину БСА (50 мг/мл у воді), 0,1 мл розчину каталази (4 мг/мл у воді)). Сполуку розчиняли в ДМСО і розводили в середовищі Middlebrook 7H12 до концентрації 100 мкг/мл у 7H12. До лунки із середовищем додавали 100 мкл розчину сполуки і робили двократне розведення вздовж ряду лунок плашки. Із останньої лунки відбирали 100 мкл розчину і виливали. Потім до лунок додавали по 100 мкл розчину мікроорганізмів. Концентрація клітин *M. tuberculosis* у плашці становила $5,0 \times 10^5$ КУО/мл. Використовували ізоніазид-резистентний штам *M. tuberculosis* (SRI 1367) (INH-R), рифампін-резистентний штам *M. tuberculosis* (SRI 1369) (RIF-R) та моксіфлоксацин-резистентний штам *M. tuberculosis* (SRI 4000) (OFX-R). Плашки інкубували 7 днів при 37 °C (із вологістю). На 7 день плашки аналізували візуально та визначали абсорбцію за допомогою платкового рідера EnVision. Значення MIC - це найнижча концентрація (мкг/мл) сполуки, що інгібує ріст мікроорганізмів. Використовували наступні контролю: 1) лише середовище (контроль на стерильність); 2) мікроорганізм у середовищі (негативний контроль); 3) позитивний контроль (замість досліджуваної сполуки додавали рифампін та ізоніазид).

Результати вважали коректними, якщо позитивний контроль - рифампін проявляв активність у діапазоні значень MIC від 0,05 до 0,2 мкг/мл, а ізоніазид - у діапазоні значень MIC від 0,025 до 0,05 мкг/мл.

Мінімальну інгібувальну концентрацію сполуки 1 (MIC, мкМ) щодо штамів *M. tuberculosis* наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

MIC сполуки 1 відносно до штамів *M. tuberculosis* (мкг/мл)

№ сполуки	H ₃₇ Rv	INH-R	RIF-R	OFX-R
1	0,25	0,032	0,03	0,032
рифампін	0,05	0,05	>100	0,39
ізоніазид	>100	>100	0,05	>100

INH-R - ізоніазид-резистентний штам *M. tuberculosis* (SRI 1367)

RIF-R - рифампін-резистентний штам *M. tuberculosis* (SRI 1369)

OFX-R - моксіфлоксацин-резистентний штам *M. tuberculosis* (SRI 4000)

Дослідження внутрішньоклітинної активності сполуки 1

Досліджували інгібувальну активність сполуки 1 щодо штамів *M. tuberculosis* H₃₇Rv, фагоцитованого макрофагами J774.A1. J774.A1 - це адгезивна макрофагова клітинна лінія, отримана з миші, що використовується для визначення інгібування внутрішньоклітинних

патогенів. Клітини вирощували в культуральній колбі об'ємом 225 см² у середовищі RPMI 1640, що містило 10 % FBS при 37 °C за наявності 5 % CO₂. Неадгерентні клітини видаляли шляхом заміни наявного середовища свіжим поживним середовищем, а адгерентні клітини зішкрібали. Визначали концентрацію клітин, використовуючи MiShroge cell counter і розчиняли суспензію клітин до концентрації 2,0 × 10⁵ клітин/мл. 1 мл суспензії макрофагів додавали в кожну лунку 12-лункових плашок та інкубували протягом 24 годин, щоб клітини прикріпилися до стінок. Потім замінювали наявне середовище на середовище RPMI 1640 із 1 % FBS (для того щоб обмежити проліферацію клітин) та інкубували протягом 24 годин. Визначали кількість клітин на лунку та розраховували кількість *M. tuberculosis*, необхідну для досягнення множинності інфекції 10. Суспендували бактерії в середовищі RPMI 1640 із 1 % FBS та підганяли до щільності, розрахованої на попередньому етапі. Розливали по 1 мл бактеріальної суспензії у лунки та інкубували протягом 4 годин щоб дозволити макрофагам фагоцитувати мікобактерії (інфекційний період). Потім видаляли супернатант і двічі промивали стерильним PBS для того, щоб повністю позбутися позаклітинних бактерій. Під час інфекційного періоду сполуку розводили в середовищі RPMI 1640 із 1 % FBS і по 1 мл розчину додавали в кожну лунку з клітинами та інкубували протягом 4 днів. Потім видаляли середовище і кожну лунку тричі промивали PBS. Макрофаги лізували заміною середовища росту одним мілілітром додецил сульфату натрію (0,25 %) у PBS. Із кожної лунки видаляли 100 мкл лізату, розводили у стерильному PBS і висівали на плашки із агаром Middlebrook 7H10. Плашки інкубували протягом 16-21 дня при 37 °C і потім підраховували кількість колоній. Для того, щоб визначити відсоток зниження внутрішньоклітинної кількості мікобактерій, ділять число колоній з лунок на кількість колоній у негативному контролі і множать результати на 100.

Передбачуване зниження у виживанні для рифампіну становить 0 при 0,01 мкг/мл, 0,5-1,0 log зниження при 0,1 мкг/мл та 2-3 log зниження при 1 мкг/мл.

Для сполуки 1 використовували концентрації 1, 0,1 та 0,01 мкг/мл. Результати дослідження внутрішньоклітинної активності сполуки 1 наведено в таблиці 3.

Дослідження цитотоксичності сполуки 1. Готували 96-лункові плашки з неінфікованими макрофагами. У кожну лунку висівали 0,1 мл 5,0 × 10⁴ клітин (макрофагів)/мл у середовищі RPMI 1640 (+10 % FBS). Включали одну колонку лунок, що містили лише середовище і одну колонку лунок, що містили клітини в середовищі. Плашки інкубували протягом 3 днів при 37 °C із 5 % CO₂. Видаляли середовище, яке містило FBS. Готували розведення сполуки в середовищі RPMI 1640 (без FBS). Додавали сполуку в об'ємі 0,1 мл у концентраціях 1, 0,1 та 0,01 мкг/мл. Плашки інкубували додатково протягом 3 днів при 37 °C із 5 % CO₂. Після інкубації до кожної лунки додавали 0,01 мл (10 мкл) реагенту MTT, включаючи контроль. Повертали плашку в інкубатор на 2-4 години при 37 °C із 5 % CO₂. Періодично клітини переглядали під інвертованим мікроскопом на наявність пурпурного преципітату. За наявності останнього додавали 0,1 мл детергента до кожної лунки. Залишали накриту плашку в темряві на 2-4 години при кімнатній температурі. Потім вимірювали абсорбцію при 570 нм у плашковому рідері.

Відсоток виживання макрофагів для позитивного контролю рифампіну повинен становити >90 % при найнижчій концентрації.

Результати дослідження цитотоксичності сполуки 1 наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Внутрішньоклітинна активність сполуки 1 у макрофагах та її цитотоксичність

Сполука	Логарифмічна редукція активності бактерії в макрофагах (низька концентрація)	Логарифмічна редукція активності бактерії в макрофагах (середня концентрація)	Логарифмічна редукція активності бактерії в макрофагах (висока концентрація)	MTT % виживання (низька концентрація)	MTT % виживання (середня концентрація)	MTT % виживання (висока концентрація)
1	2,02	2,26	2,43	100	96	83
Рифампін (позитив- ний контроль)	1,06	2,39	2,86	95	85	73

Дослідження зв'язування з протеїнами плазми крові сполуки 1.

Зв'язування з протеїнами плазми крові людини досліджуваної сполуки 1 визначали за допомогою рівноважного діалізу. Сполуку тестували з використанням напівпроникної мембрани, яка розділяє два об'єми, що відповідно містять протеїн (плазма крові людини) і буфер. Молекули можуть проникати вільно, але білки не можуть проходити через мембрану.

5 Досліджувану сполуку змішували з плазмою крові людини і вносили до приладу. Після врівноваження при 37 °C з PBS, досліджувану речовину в кожному компартменті визначали кількісно за допомогою LC-MS/MS.

Сполуку додавали до плазми крові при фіксованій концентрації 5 мкМ. Суміш піддавали діалізу в приладі RFD (Rapid Equilibrium Dialysis, Пірс) проти PBS та інкубували на орбітальному шейкері протягом 4 год. при 37 °C. Збирали аліквоти плазми і PBS; однаковий об'єм PBS додавали до зразків плазми крові і однаковий об'єм плазми додавали до зразків PBS. Три об'єми метанолу (містить внутрішній стандарт зв'язування - пропранолол (Sigma)) додавали для осадження білків і вивільнення сполуки. Кожну сполуку тестували два рази. Зразки центрифугували, супернатант відновлювали і аналізували за допомогою LC-MS/MS. Кожний зразок включав варфарин (Sigma) як високоев'язувальний контроль. Відсоток зв'язування з білками плазми крові для сполуки 1 наведено в таблиці 4.

15

Таблиця 4

Зв'язування з протеїнами плазми крові сполуки 1, %

№ сполуки	Зв'язування з протеїнами плазми крові, %
1	42,1
Пропранолол	75,6
Варфарин	99,4

Дослідження проникності сполуки 1 через моношар клітин Caco-2.

20 Проникність сполуки 1 оцінювали з використанням моношару клітин Caco-2. Проникність сполуки визначали в обох напрямках. Для напрямку проникності А-Б, досліджувану сполуку додавали до апікальної сторони моношару клітин Caco-2 і визначали транспорт сполуки до базальної сторони. Для напрямку проникності Б-А, досліджувану сполуку додавали до базальної сторони моношару клітин Caco-2 і визначали транспорт сполуки до апікальної сторони. Дослідження проводили протягом 2 годин два рази. Кількість сполуки, наявної в кожному компартменті визначали кількісно за допомогою LC-MS/MS.

25

Сасо-2 клітини трипсинізували, ресуспендували в середовищі і наносили на 96-лункову плашку Millipore 96-well Caco-2 plate. Клітини росли та диференціювалися протягом трьох тижнів. Додавання поживних речовин проводили з інтервалом у два дні. Для дослідження проникності від апікальної до базолатеральної (А→Б) сторони, сполуки додавали до апікальної (А) сторони і проникнення сполуки визначали на базолатеральній (Б) стороні; для дослідження проникності від базолатеральної до апікальної (Б→А) сторони, сполуки додавали до базолатеральної (Б) сторони і проникнення сполуки визначали на апікальній (А) стороні. У кожному експерименті як контроль використовували атенолол (MP Biomedicals) (низька проникність), пропранолол (Sigma) (висока проникність) та талінолол (TRC) (P-gp- залежний транспорт).

30

35

Якісний контроль. Сторона А містила 100 мкМ барвника Lucifer yellow (Sigma) у транспортному буфері із рН 6,5 (1,98 г/л глюкози у 10 мМ HEPES (Sigma), 1X Hank's Balanced Salt Solution (Lonza)), а В сторона містила транспортний буфер із рН 7,4 (1,98 г/л глюкози у 10 мМ HEPES (Sigma), 1X Hank's Balanced Salt Solution (Lonza)). Сасо-2 клітини інкубували з цими буферами 1 або 2 години, буфер приймаючої сторони аналізували за допомогою LC-MS/MS. Аліквоти клітинних буферів аналізували за рівнем флуоресценції для визначення транспорту непроникного барвника Lucifer yellow з метою підтвердження того, що моношар клітин Caco-2 правильно сформувався.

40

45 В таблиці 5 дані представлені як проникність сполуки $P_{app} = (dQ/dt) / (C_0 A)$
 dQ/dt - рівень проникнення
 C_0 - початкова концентрація сполуки
 A - площа моношару

Таблиця 5

Проникнення через моношар клітин Caco-2 сполуки 1

№ сполуки	Тривалість дослідження (год.)	A→B P _{app} (10 ⁻⁶ см/с)	B→A P _{app} (10 ⁻⁶ см/с)	Рівень витікання
1	1	26,6	24,7	0,93
1	2	20,3	16,0	0,79

Дослідження інгібувальної активності сполуки 1 до шести ізоформ цитохрому P450.

5 Сполуку 1 тестували на здатність інгібувати шість ізоформ ензиму P450-CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 і CYP3A4. Для кожного аналізу мікросоми печінки людини інкубували зі специфічним субстратом кожної ізоформи CYP за присутності сполуки. Формування метаболітів для кожної ізоформи визначали кількісно за допомогою LC-MS/MS як ступінь активності ензиму. Розраховували ферментативну активність і визначали IC₅₀.

10 Сполуку розчиняли в суміші ацетонітрил: ДМСО (9:1). Кінцевий вміст ДМСО в реакційній суміші був однаковий у всіх розчинах, які використовували в аналізі, і становив <0,2 %. Експерименти проводили з повтором. Сполуку інкубували з мікросомами печінки людини в буферному розчині, що містив 2 мМ НАДФН (відновлена форма коферменту нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату) (Sigma) і субстрату в кінцевому об'ємі 200 мкл. Реакційні суміші інкубували при 37 °C протягом оптимального часу (10-60 хв), і зупиняли додаванням метанолу, що містив внутрішній стандарт (пропранолол) для аналітичного визначення. Зразки інкубували при 4 °C протягом 10 хв. і центрифугували при 4 °C протягом 10 хв. Супернатант видаляли і метаболіти субстрату аналізували за допомогою LC-MS/MS. Зниження кількості метаболіту в порівнянні з контролем використовували для розрахунку значення IC₅₀ (значення концентрації, яка приводить до інгібування на 50 %).

20 Було встановлено, що сполука 1 інгібує одну ізоформу цитохрому P450-CYP2C19 зі значенням IC₅₀=15 мкМ.

Дослідження мікросомної стабільності сполуки 1. Сполуку тестували на мікросомну стабільність за використання пулу мікросом S9 печінки людини (Celsis). Мікросоми інкубували з досліджуваною сполукою при 37 °C за присутності кофактора НАДФН (Sigma), реакцію зупиняли, супернатант відновлювали і сполуку кількісно визначали за допомогою LC-MS/MS. Фіксовані концентрації тестованої сполуки визначали два рази при 5 часових точках, а стабільність сполуки виражали як функцію часу.

30 Сполуку тестували із мікросомами печінки людини при 37 °C з повтором. Кожний зразок містив 0,3 мг/мл мікросомного протеїну людини у буферному розчині (2 мМ НАДФН, 3 мМ MgCl₂ (Sigma), 100 мМ натрій фосфатний буфер; pH 7,4). Зразки відділяли через 0, 5, 15, 30, і 45 хвилин, перемішували з рівним об'ємом розчину (метанол), що зупиняє реакцію (містить пропранолол (Sigma) як внутрішній стандарт), та інкубували >10 хвилин при -20 °C. Вносили додатковий об'єм води, центрифугували для відділення преципітованого протеїну і супернатант аналізували за допомогою LC-MS/MS для кількісного визначення вихідної сполуки, що залишилася. Проводили контрольну реакцію без НАДФН (контрольний буфер) для того щоб визначити деградацію сполуки, що не залежить від НАДФН. Верапаміл (Sigma) та декстрометофарм (Sigma) вносили як контрольні сполуки.

40 Аналіз даних. Дані конвертували у % сполуки, що залишилася в порівнянні з нульовою точкою часу. Дані були встановлені на моделі розпаду першого порядку для визначення часу піврозпаду сполуки. Характеристичний кліренс (CL_{int}) розраховували, виходячи з часу піврозпаду та концентрації протеїну:

$$CL_{int} = \ln(2)/(T_{1/2} [\text{мікросомний протеїн}])$$

$$T_{1/2} = 0.693/k$$

$$CL_{int} = \text{характеристичний кліренс}; T_{1/2} = \text{час піврозпаду}; k = \text{зсув}$$

45 Дані стосовно мікросомальної стабільності для сполуки 1 наведено в таблиці 6.

Таблиця 6

Мікросомна стабільність in vitro сполуки 1, час напіврозпаду (T_{1/2} (хв))

№ сполуки	Концентрація (μM)	НАДФН- залежний час напіврозпаду T _{1/2}	НАДФН- незалежний час напіврозпаду T _{1/2}
1	1	149	>180

Таким чином, метаболізм сполуки 1 відбувається за НАДФН-залежним шляхом. Дослідження цитотоксичності сполуки 1 щодо еукаріотних клітин HepG2

- 5 Цитотоксичність сполуки щодо еукаріотних клітин визначали за використання клітин печінки людини HepG2 (ATCC). Клітини HepG2 інкубували зі сполукою протягом 72 годин і визначали життєздатність клітин. IC₅₀ встановлювали як концентрацію сполуки, що призводить до зниження виживання клітин на 50 % через 72 години інкубації. Цитотоксичність сполуки визначали шляхом вимірювання життєздатності клітин HepG2 через 3 дні інкубації в присутності тестованої речовини. Сполуку серійно розчиняли в ДМСО. Найвища концентрація сполуки становила 100 мкМ, де сполука була розчинна в ДМСО при 10 мМ концентрації. Клітини HepG2 культивували в середовищі DMEM (середовище DMEM з високим рівнем глюкози (Invitrogen), 1X розчин пеніциліну-стрептоміцину (Fisher), 2 мМ Corning Glutogro supplement (Fisher), 1 мМ пірувату натрію (Fisher), фетальна бичача сироватка (10 %) (Fisher)), висівали в 384-лункові
- 10 плашки для аналізу, що містила сполуку та інкубували протягом 24 год. при 37 °C, 5 % CO₂. Після додавання сполуки клітини інкубували ще протягом 72 годин. Кінцева концентрація ДМСО складала 1 %. Життєздатність клітин визначали за допомогою CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega), вимірюючи відносні одиниці люмінесценції (RLU). Дозо-залежну криву відгуку будували з використанням алгоритму Левенберга-Марквардта. IC₅₀ визначали як
- 15 концентрацію сполуки, що призводить до зниження життєздатності клітин на 50 %. Як контроль використовували стауроспорин (Santa Cruz Biotechnology).

Сполука 1 виявилася не цитотоксичною (IC₅₀ >100 мкМ), тоді як значення IC₅₀ стауроспорину, що є позитивним контролем, становить 0,045 мкМ.

- 25 Дослідження антимікобактеріальної активності сполук 2-7 за умов низького вмісту Оксигену. Антимікробну активність сполук щодо штаму *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv за умов гіпоксії визначали методом LORA (low oxygen recovery assay). Бактерії спочатку адаптували до умов низького вмісту Оксигену і потім експонували до сполук при гіпоксії. Це супроводжувалося певним періодом росту за аеробних умов, а ріст вимірювали, використовуючи люмінесценцію.

- 30 Сполуки розчиняли в ДМСО (Fisher) та робили серію розведень шляхом двократного зменшення концентрації. Речовини розводили в середовищі Dubos-Tw-Albumin (DTA) (6,5 г/л поживного середовища Dubos Broth Base (Fisher), Dubos medium albumin (Fisher) (10 %), Tween 80 (Fisher) (0,05 %)) у 96-лункових плашках (фінальна концентрація ДМСО становила 2 %). Найвища концентрація сполуки становила 200 мкМ у випадку, якщо речовини були розчинні в ДМСО в 10 мМ концентрації. Клітини *M. tuberculosis*, що конститутивно експресують оперон luxABCDE інокулювали в середовище DTA в газонепроникних скляних пробірках та інкубували
- 35 18 днів для досягнення умов гіпоксії (модель гіпоксії Вейна). За відсутності Оксигену бактерії перебувають у нереплікуючому стані. Їх інокулювали в плашки із середовищем, що містило сполуки та інкубували за анаеробних умов протягом 10 днів, а потім інкубували протягом 28 годин за аеробних умов. Крім того, нереплікуючі бактерії інокулювали в плашки із середовищем, що містило сполуки та інкубували за аеробних умов протягом 5 днів. Ріст в обох випадках вимірювали за показниками люмінесценції. Рифампіцин (Sigma-Aldrich) та метронідазол (Sigma-Aldrich) використовували як позитивні контролю загибелі *M. tuberculosis* за аеробних та анаеробних умов, відповідно.
- 40

- 45 7. Антимікобактеріальну активність досліджуваних сполук за умов гіпоксії наведено в таблиці

Дослідження мінімальної бактерицидної концентрації сполук 2-7

Бактерицидну активність сполук досліджували щодо штаму *M. tuberculosis* H37Rv, який вирощували за аеробних умов у середовищі 7H9-Tw-OADC. Обрахунок живих клітин проводили через 3 тижні експозиції до сполук для визначення рівня загибелі.

- 50 Клітини *M. tuberculosis* вирощували за аеробних умов до логарифмічної фази та інокулювали в рідке середовище, що містило чотири різні концентрації сполук із максимальною концентрацією ДМСО 2 %. Для сполук зі значенням MIC > 20 μM, відібрані концентрації були 10X MIC, 5X MIC, 1X MIC і 0,25X MIC (200, 100, 20 і 5 μM). Культури інкубували зі сполуками

протягом 21 дня, а виживання клітин визначали шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць на агарових плашках в 0, 7, 14 та 21 день. Мінімальну бактерицидну концентрацію визначали як мінімальну концентрацію, необхідну для досягнення 2-log загибелі на 21 день. ДМСО був використаний як позитивний контроль росту. Мінімальну бактерицидну концентрацію (МБС) сполук наведено в таблиці 7.

Таблиця 7

Активність похідних гідразиду ізонікотинової кислоти MIC (мкМ), IC₅₀ (мкМ), IC₉₀ (мкМ) за анаеробних умов та мінімальна бактерицидна активність МБС (мкМ)

№ сполуки	IC ₅₀	IC ₉₀	MIC	MBC
2	0,23	0,28	0,35	1,4
3	0,23	0,28	0,36	0,6
4	0,42	0,59	0,84	1,3
5	0,19	0,21	0,24	1,4
6	0,26	0,34	0,47	5,8
7	1,4	33	>200	>43
Рифампіцин	0,00079	0,0024	0,0075	
Метронідазол	19	41	95	

Дослідження цитотоксичності та внутрішньоклітинної активності сполук 2-7. Цитотоксичність сполук щодо еукаріотних клітин визначали на клітинній лінії моноцитів людини THP-1. Клітини диференціювали в макрофагоподібні клітини за використання 4-форбол-12-міристат-13-ацетату (ФМА) (Sigma-Aldrich) та інкубували зі сполуками протягом трьох днів і визначали рівень виживання клітин. Значення IC₅₀ визначали, як концентрацію, що призводить до зниження рівня виживання клітин на 50 %.

Сполуки розчиняли в ДМСО (Fisher) та робили серію розведень шляхом трикратного зменшення концентрації. Найвища концентрація тестованої сполуки становила 50 мкМ, де сполуки були розчинні в ДМСО в 10 мМ концентрації. Клітини THP-1 культивували в середовищі RPMI (RPMI-1640 (Fisher), фетальна бичача сироватка, pH 7,2 (10 %) (Fisher)), 2 мМ GlutaMAX (Fisher), 1 мМ пірувату натрію та диференціювали в макрофагоподібні, використовуючи 80 нМ PMA протягом ночі при 37 °C, 5 % CO₂.

Клітини культивували в плашках протягом 24 годин перед додаванням розчинів сполук (фінальна концентрація ДМСО становила 0,5 %). Як контроль використовували стауроспорин. Потім клітини інкубували протягом 3 днів при 37 °C, 5 % CO₂; ріст вимірювали за допомогою CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega), що використовує АТФ як індикатор росту клітин. Відносні одиниці люмінесценції вимірювали, використовуючи плашковий рідер Biotek Synergy 4. Дозозалежну криву генерували, використовуючи алгоритм Левенберга-Марквардта і визначали концентрацію, при якій спостерігалось інгібування росту бактерій на 50 % (значення IC₅₀) (таблиця 8).

Таблиця 8

Цитотоксичність похідних гідразиду ізонікотинової кислоти IC₅₀ мкМ)

№ сполуки	IC ₅₀
2	>100
3	>100
4	>100
5	>100
6	>100
7	>50
Стауроспорин	0,016

Внутрішньоклітинну активність сполук визначали за використання клітин THP-1, інфікованих M. tuberculosis. Клітини диференціювали в макрофагоподібні клітини за використання ФМА та інфікували бактеріями. Інфіковані клітини інкубували зі сполуками протягом 72 годин.

Сполуки розчиняли в ДМСО (Fisher) та робили серію розведень шляхом трикратного зменшення концентрації. Найвища концентрація тестованої сполуки становила 50 мкМ, де

сполуки були розчинні в ДМСО в 10 мМ концентрації. Клітини THP-1 культивували в середовищі RPMI (RPMI-1640 (Fisher), фетальна бичача сироватка, pH 7,2 (10 %) (Fisher)), 2 мМ GlutaMAX (Fisher), 1 мМ пірувату натрію) та диференціювали в макрофагоподібні, використовуючи 80 нМ PMA протягом ночі при 37 °C, 5 % CO₂.

Клітини THP-1 інфікували люмінесцентним штамом H37R.V (що конститутивно експресує luxABCDE), та інкубували протягом ночі при 37 °C, 5 % CO₂. Інфіковані клітини відновлювали за допомогою розчину Accutase/EDTA (Fisher), двічі відмивали фосфатним буфером для видалення позаклітинних бактерій та висівали в плашки. До клітин додавали розчини сполук (кінцева концентрація ДМСО становила 0,5 %). Плашки інкубували протягом 72 год. при 37 °C, 5 % CO₂. Як контроль використовували ізоніазид. Кількість живих бактеріальних клітин визначали за рівнем люмінесценції. Відносні одиниці люмінесценції визначали за використання платкового рідера Biotek Synergy 2. Дозозалежну криву генерували, використовуючи алгоритм Левенберга-Марквардта і визначали концентрації, при яких спостерігалось інгібування росту бактерій на 50 % та на 90 % (значення IC₅₀ та IC₉₀, відповідно) (табл. 9).

Таблиця 9

Внутрішньоклітинна активність (IC₅₀, IC₉₀ (мкМ)) похідних гідразиду ізонікотинової кислоти

№ сполуки	IC ₅₀	IC ₉₀
2	>100	
3	>100	
4	>100	
5	>100	
6	>100	
7	0,19	0,30
Ізоніазид	0,315	0,38

Дослідження антибактеріальної активності сполук 2-7 щодо резистентних штамів *M. tuberculosis*.

Активність сполук щодо п'яти резистентних штамів *M. tuberculosis* визначали за аеробних умов. Використовували два ізоніазид-резистентні штами (INH-R1 і INH-R2), два рифампіцин-резистентні штами (RIF-R1 і RIF-R2) та флуорохінолон-резистентний штам (FQ-R1). Метод ґрунтується на вимірюванні росту бактерій в рідкому середовищі за показником оптичної густини. INH-R1 був отриманий із H37Rv (мутація гену *katG* (Y155*)), INH-R2 - штам ATCC35822. RIF-R1 був отриманий із H37Rv (мутація гену *rpoB* (S522L)), RIF-R2 - штам ATCC35828. FQ-R1 був отриманий із H37Rv (мутація гену *gyrB* (D94N)).

Мінімальну інгібувальну концентрацію сполуки визначали шляхом вимірювання бактеріального росту через п'ять днів за присутності досліджуваної сполуки. Сполуки розчиняли в ДМСО (Fisher) та робили серію розведень шляхом двократного зменшення концентрації. Речовини розводили в середовищі 7H9-Tw-OADC у 96-лункових плашках (фінальна концентрація ДМСО становила 2 %). Найвища концентрація сполуки становила 200 мкМ у випадку, якщо речовини були розчинні в ДМСО в 10 мМ концентрації. Кожна плашка містила декілька контролів (лише середовище/ДМСО, без бактеріальних клітин), відсутність росту (100 мкМ рифампіцину (Sigma-Aldrich)) та максимальний ріст (лише ДМСО). Планшети інокулювали клітинами *M. tuberculosis* та інкубували протягом 5 днів: ріст вимірювали за оптичною щільністю (OD₅₉₀). Для вимірювання чисельного значення MIC будували 10-точкову дозозалежну криву як % росту і підганяли до моделі Гомпертца з використанням GraphPad Prism 5. MIC розраховували з точки перегину кривої, підігнаної до нижньої асимптоти (відсутній ріст бактерій). Крім того, дозозалежні криві генерували, використовуючи алгоритм Левенберга-Марквардта і визначали концентрації, при яких спостерігали інгібування росту бактерій на 50 % та на 90 % (значення IC₅₀ та IC₉₀, відповідно).

Мінімальну інгібувальну концентрацію похідних гідразиду ізонікотинової кислоти (MIC, мкМ) щодо резистентних штамів *M. tuberculosis* наведено в таблиці 10, IC₅₀ (мкМ) - в таблиці 11, IC₉₀ (мкМ) - в таблиці 12.

Таблиця 10

Мінімальна інгібувальна концентрація (MIC, мкМ) похідних гідразиду ізонікотинової кислоти
відносно до резистентних штамів *M. tuberculosis*

№ сполуки	INH-R1	INH-R2	RIF-R1	RIF-R2	FQ-R1
2	>200	>200	0,93	1,9	2,1
3	>200	>200	0,40	0,91	0,82
4	>200	>200	0,82	1,8	1,6
5	>200	>200	0,37	1,7	0,83
6	>200	>200	1,8	7,2	6,3
7	>200	>200	0,42	0,87	0,89
рифампіцин	0,016	0,0058	3,6	>50	0,018
рифампіцин	0,020	0,011	3,0	>50	0,015
ізоніазид	>200	>200	0,32	0,66	0,64
ізоніазид	>200	>200	0,36	0,71	0,80
левофлоксацин	1,4	2,1	1,4	1,4	24
левофлоксацин	1,4	2,3	1,3	1,6	26

INH-R1 - ізоніазид-резистентний штам H37Rv (мутація гену *katG* (Y155*)),
 INH-R2 - ізоніазид-резистентний штам H37Rv (ATCC35822)
 RIF-R1 - рифампіцин-резистентний штам H37Rv (мутація гену *rpoB* (S522L))
 RIF-R2 - рифампіцин-резистентний штам H37Rv (ATCC35828)
 FQ-R1 - флуорохінолон-резистентний штам H37Rv (мутація гену *gyrB* (D94N)).

Таблиця 11

IC₅₀ похідних гідразиду ізонікотинової кислоти
відносно до резистентних штамів *M. tuberculosis* (мкМ)

№ сполуки	INH-R1	INH-R2	RIF-R1	RIF-R2	FQ-R1
2	>200	>200	0,28	1,4	1,3
3	>200	>200	0,19	0,46	0,39
4	>200	>200	0,37	0,92	0,72
5	>200	>200	0,21	0,66	0,37
6	>200	>200	1,2	3,8	3,3
7	>200	>200	0,36	0,83	0,59
рифампіцин	0,0092	0,0041	1,7	>50	0,0095
рифампіцин	0,011	0,0057	1,3	>50	0,0094
ізоніазид	>200	>200	0,28	0,64	0,47
ізоніазид	>200	>200	0,25	0,74	0,49
левофлоксацин	0,94	1,2	0,79	0,89	14
левофлоксацин	0,80	1,4	0,87	1,1	15

INH-R1 - ізоніазид-резистентний штам H37Rv (мутація гену *katG* (Y155*)),
 INH-R2 - ізоніазид-резистентний штам H37Rv (ATCC35822)
 RIF-R1 - рифампіцин-резистентний штам H37Rv (мутація гена *rpoB* (S522L))
 RIF-R2 - рифампіцин-резистентний штам H37Rv (ATCC35828)
 FQ-R1 - флуорохінолон-резистентний штам H37Rv (мутація гена *gyrB* (D94N)).

Таблиця 12

IC₉₀ похідних гідразиду ізонікотинової кислоти по відношенню до резистентних штамів *M. tuberculosis* (мкМ)

№ сполуки	INH-R1	INH-R2	RIF-R1	RIF-R2	FQ-R1
2	>200	>200	0,75	3,6	2,8
3	>200	>200	0,21	0,86	0,46
4	>200	>200	0,44	1,9	1,1
5	>200	>200	0,37	1,8	0,42
6	>200	>200	1,8	7,9	7,8
7	>200	>200	0,42	1,4	0,89
рифампіцин	0,022	0,0071	4,3	>50	0,025
рифампіцин	0,024	0,012	3,4	>50	0,024
ізоніазид	>200	>200	0,31	0,97	0,63
ізоніазид	>200	>200	0,36	1,0	0,86
левофлоксацин	1,5	2,3	1,5	1,5	23
левофлоксацин	1,5	2,3	1,3	1,9	24

INH-R1 - ізоніазид-резистентний штам H37Rv (мутація гена *katG* (Y155*)),

INH-R2 - ізоніазид-резистентний штам H37Rv (ATCC35822)

RIF-R1 - рифампіцин-резистентний штам H37Rv (мутація гена *rpoB* (S522L))

RIF-R2 - рифампіцин-резистентний штам H37Rv (ATCC35828)

FQ-R1 - флуорохінолон-резистентний штам H37Rv (мутація гену *gyrB* (D94N)).

Таким чином, досліджувані похідні гідразиду ізонікотинової кислоти проявляють високу антитуберкульозну активність щодо патогенного штаму *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv за аеробних та анаеробних умов і мають внутрішньоклітинну активність на макрофагоподібних клітинах. Крім того, сполука 1 з хімічною назвою (1-метил-1H-пірол-2-ілметил)-гідразид ізонікотинової кислоти є ефективною стосовно ізоніазид-, рифампіцин- та флуорохінолін-резистентних штамів мікобактерій та характеризується хорошими ADME властивостями (рівень зв'язування з протеїнами плазми крові становить 42,1 %, сполука є проникною через моношар клітин Caco-2, інгібує лише одну з досліджуваних ізоформ цитохрому P450-CYP2C19) та має низьку цитотоксичність стосовно еукаріотних клітин HepG2 (>100 μM). Перераховані властивості дозволяють використовувати цю сполуку у фармацевтиці як препарат для лікування мультирезистентних форм туберкульозу.

Джерела інформації:

1. Judge V. Isoniazid: the magic molecule /V. Judge, B. Narasimhan, M. Ahuja. //Med. Chem. Res. - 2012. - Vol. 21. - P. 3940-3957.

2. Preparation and antitubercular activities in vitro and in vivo of novel Schiff bases of isoniazid /[M. Hearn, M. Cynamon, M. Chen et al.]. //Eur. J. Med. Chem. - 2009. - Vol. 44. - P. 4169-4178.

3. Synthesis, toxicity, and antituberculosis activity of isoniazid derivatives containing sterically hindered phenols. /[Y. Oludina, A. Voloshina, M. Kulik et al.]. //Pharm Chem J. - 2014. - Vol. 48. - P. 5-7.

4. Anti-tuberculosis activity of lipophilic isoniazid derivatives and their interactions with first-line anti-tuberculosis drugs /[T. Parumasivam, H. Kumar, P. Ibrahim et al.]. //J. Pharm. Res. - 2013. - Vol. 7. - P. 313-317.

5. Synthesis and bioevaluation of some new isoniazid derivatives /[L. Matei, C Bleotu, I. Baciuet al.]. //Bioorg. Med. Chem. - 2013. - Vol. 21. - P. 5355-5361.

6. Synthesis of highly potent novel anti-tubercular isoniazid analogues with preliminary pharmacokinetic evaluation /[A. Ramani, A. Monika, V. Indira et al.]. // Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2012. - Vol. 22. - P. 2764-2767.

7. Synthesis and evaluation of isonicotinoyl hydrazone derivatives as antimycobacterial and anticancer agents /[H. Kumar, T. Parumasivam, F. Jumaat et al.]. //Med. Chem. Res. - 2014. Vol. 23. - P. 269-279.

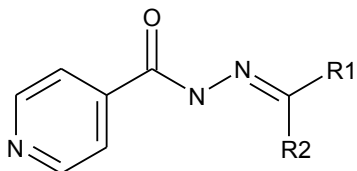
8. Potent antimycobacterial activity of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analog 2-pyridylcarboxaldehyde isonicotinoyl hydrazone: a lipophilic transport vehicle for isonicotinic acid hydrazide /[S. Ellis, D. Kalinowski, L. Leotta et al.]. //Mol Pharm. - 2014. - Vol. 85. - P. 269-278.

9. Synthesis and evaluation of copper(II) complexes with isoniazid-derived hydrazones as anticancer and antitubercular agents [G. Firmino, M. de Souza, C Pessoa et al.]. //Biometals. - 2016. - doi: 10.1007/s10534-016-9968-7.

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Низькомолекулярні органічні сполуки з антитуберкульозною дією на основі гіdraзиду ізонікотинової кислоти, які **відрізняються** тим, що містять нові замісники загальної формули:



- 10 де R2 - H, R1 - 3-метокси-4-гідроксифеніл, 6-бензотіазол-2-метил, 2-нітрофеніл, 2,4-дигідроксифеніл, 2-піридин, 1-метил-1Н-пірол, 3-гідрокси-4-метоксифеніл, 4-метилфеніл, 1Н-індол-3-іл-1-(3-діетиламінопропан-2-ол), 1Н-індол-3-іл-1-(3-(пропіламіно-2-диметил-3-ол)пропан-2-ол), та R2 - CH₃, R1 - карбетокси, 4-нітрофеніл, 3-нітрофеніл, 4-н-гексилфеніл.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601