©Коллектив авторов

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ СПЕКТРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ДИАМИНОАЗОЛОВ

Ю.В. Бутина[1]*, Т.В. Кудаярова[2], Е.А. Данилова[2], М.К. Исляйкин[2]

[1]Ивановская государственная медицинская академия,
153012, Иваново, Шереметевский проспект, 8; *эл. почта: yuliya_butina@mail.ru
[2]Ивановский государственный химико-технологический университет,
153000, Иваново, Шереметевский проспект, 7

Работа посвящена прогнозированию и экспериментальному исследованию биологической активности N-замещённых аналогов 3,5-диамино-1,2,4-тиадиазола, которые входят в состав ряда лекарственных препаратов с широким спектром фармакологического действия. С целью поиска новых фармакологических веществ, обладающих антибактериальным эффектом, но с отсутствующей к ним резистентности штаммов микроорганизмов, проведено компьютерное прогнозирование биологической активности для ранее синтезированных нами 2N-алкилзамещённых 5-амино-3-имино-1,2,4-тиадиазолинов. Прогнозирование спектра биологической активности, а также оценку вероятной токсичности этих соединений выполняли с использованием доступных в сети Интернет компьютерных программ PASS, GUSAR и Anti-Bac-Pred. Исследование антибактериальной активности *in vitro* по отношению к грамположительным (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*) и грамотрицательным (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosae*) штаммам бактерий выполняли диско-диффузионным методом. Экспериментальные данные соответствуют результатам прогноза.

Ключевые слова: 3,5-диамино-1,2,4-тиадиазол; N-алкилтиадиазолины; компьютерное прогнозирование; PASS; GUSAR; биологическая активность

DOI: 10.18097/PBMC20196502099

ВВЕДЕНИЕ

Поиск и разработка новых более безопасных и эффективных лекарственных препаратов является важной задачей медицинской химии. Для первичного отбора наиболее перспективных соединений в настоящее время широко применяются компьютерные методы, к числу которых относятся веб-ресурсы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), GUSAR (General Unrestricted Structure-Activity Relationships) и Anti-Bac-Pred, свободно доступные в сети Интернет [1-3].

Первая программа, разработка которой началась около 30 лет назад, на основе структурной формулы химического соединения с использованием моделей взаимосвязи “структура-активность” (SAR) со средней точностью около 95% позволяет прогнозировать свыше 5000 видов биологической активности. Вторая программа на основе построенных моделей количественных зависимостей “структура-активность” (QSAR) позволяет оценить величину полулетальной дозы LD_{50} для крыс при четырёх способах введения (внутривенное, внутрибрюшинное, подкожное и пероральное). Третья программа Anti-Bac-Pred разработана недавно в рамках Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы и позволяет рассчитать вероятность антибактериального эффекта для 353 бактерий. Совместное использование этих программ позволяет оценить как биологическую активность, так и острую токсичность изучаемых химических соединений.

В настоящее время насчитывается большое количество лекарственных средств, содержащих 1,2,4-триазольные фрагменты и обладающих широким фармакологическим спектром, включая противогрибковое, антибактериальное, антивирусное, гипотензивное, аналептическое, антидепрессантное, диуретическое, антиоксидантное и антигистаминное действия [4-6]. Известно, что 3,5-диамино-1H-1,2,4-триазол проявляет умеренную противоопухолевую активность на модели лимфоидной лейкемии L-1210 [7, 8]. Другое гетероциклическое соединение, эталонный антигипоксант, выпускаемый под торговым наименованием “Амтизол”, – 3,5-диамино-1,2,4-тиадиазол – является изомером 2,5-диамино-1,3,4-тиадиазола, составляющим основу таких лекарственных средств, как диакарб, метазоламид, этазол, тизанидин, проявляющих противовоспалительную, противотуберкулёзную, противомикробную, противовирусную, бронхолитическую и противоопухолевую активности [9-12].

В медицинской химии широко используются 5-членные гетероциклы как идеальные фармакофоры для конструирования фармакологических веществ, обладающих различными видами биологической активности [13]. В этом отношении азольный цикл является одной из привилегированных структур при создании библиотек новых лекарственно-подобных (drug-like) соединений [14]. В частности, 1,2,4-тиадиазолы применяют в качестве основного строительного блока для препаратов различного терапевтического действия: противовоспалительного, противосудорожного, антигипертензивного,

нейропротекторного [15, 16]. Особый интерес вызывают производные 5-амино-1,2,4-тиадиазола как препараты для предупреждения и лечения нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера [17]. Показана способность этих соединений препятствовать агрегации β-амилоида в характерные сенильные бляшки, которые рассматриваются в качестве основного патологического фактора при болезни Альцгеймера [18]. Таким образом, изучение биологической активности азолсодержащих производных является перспективным направлением поиска новых фармакологических веществ.

Целью настоящей работы было получение, компьютерное прогнозирование и экспериментальное тестирование биологической активности новых аналогов 3,5-диамино-1,2,4-тиадиазола.

МЕТОДИКА

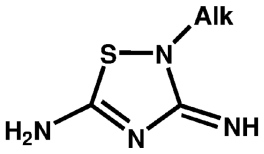
Компьютерную оценку биологической активности исследуемых соединений проводили с использованием программ PASS, GUSAR и Anti-Bac-Pred, находящихся в открытом доступе в сети Интернет. Описание этих программ приведено в работах [1-3].

Антибактериальные свойства исследовали диско-диффузионным методом определения чувствительности, который основан на способности противомикробного препарата диффундировать из пропитанных им бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара.

В качестве тест-культур использовали грамположительные (Г+) *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis* и грамотрицательный (Г-) *Escherichia coli* штаммы микроорганизмов. Эксперименты проводили в трёх повторах. Для этого готовили растворы исследуемых соединений в 91% этаноле с концентрацией $2{,}7\cdot10^{-2}$ моль/л. На приготовленный мясопептонный агар сплошным газоном засевали тест-культуры, чашки подсушивали при температуре 37±1°C и выкладывали простерилизованные в течение 3 ч и пропитанные соответствующим препаратом диски. Факт ингибирования (торможения роста) микробных клеток исследуемых соединений отмечали после термостатирования при 37±1°C в течение 20 ч. Оценку противомикробной активности проводили по диаметру зоны отсутствия роста тест-культур (диаметру лизиса – d). При измерении зон подавления роста вокруг дисков ориентировались на зону полного подавления роста микроорганизмов, определяемую невооружённым глазом, при расположении чашки на расстоянии примерно 30 см от глаз. Измерение зон подавления роста проводили с точностью до миллиметра при помощи линейки. Полученные результаты в процентном соотношении были отнесены к действию известного лекарственного препарата – амоксициллина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было выполнено компьютерное прогнозирование биологической активности и острой токсичности для 2N-бутил-, 2N-гептил-, 2N-октил-, 2N-нонил-, 2N-децил, 2N-додецил-5-амино-3-имино-1,2,4-тиадиазолинов (**1-6**) (рисунок), синтез которых был описан нами ранее в работах [10, 19-22].



1-6

Alk = C_4H_9 (**1**); C_7H_{15} (**2**); C_8H_{17} (**3**); C_9H_{19} (**4**); $C_{10}H_{21}$ (**5**); $C_{12}H_{25}$ (**6**)

Рисунок. Структурные формулы исследуемых соединений.

С использованием недавно разработанной компьютерной программы Anti-Bac-Pred [3] мы оценили противомикробную активность синтезированных соединений. Полученные результаты приведены в таблице 1 (P_a – вероятность наличия; P_i – вероятность отсутствия соответствующей активности).

С наиболее высокой вероятностью прогнозируется проявление противомикробной активности у соединений **1-6** по отношению к грамположительному штамму *Lactococcus lactis* и резистентному грамотрицательному штамму *Stenotrophomonas maltophilia*, который является возбудителем внутрибольничных инфекций. Вероятность проявления активности по отношению к грамотрицательным штаммам *Escherichia coli* и резистентной *Escherichia coli DH5[alpha]* соединениями **1-6** сравнительно невысока. Как видно из данных таблицы 1, длина углеродной цепочки не оказывает существенного влияния на величину P_a.

Для установления возможных механизмов действия изучаемых соединений нами выполнен прогноз их спектров биологической активности с помощью программы PASS. При анализе полученных результатов было установлено, что N-алкилтиадиазолины **1-6** потенциально могут обладать различными видами биологической активности. При этом для всех N-алкилтиадиазолинов **1-6** отмечается высокая степень вероятности (P_a=0,650-0,543) ингибирующей

Таблица 1. Прогноз спектра противомикробной активности алкилтиадиазолинов по отношению к грамположительному и грамотрицательным штаммам бактерий

Соединение	Число атомов С в алкильной цепочке	*Lactococcus lactis* (Г+)		*Resistant Stenotrophomonas maltophilia* (Г-)		*Resistant Escherichia coli DH5[alpha]* (Г-)		*Escherichia coli* (Г-)	
		P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i
1	C_4	0,762	0,017	0,763	0,020	0,124	0,017	0,190	0,113
2-6	C_7, C_8, C_9, C_{10}, C_{12}	0,737	0,022	0,777	0,018	0,119	0,019	0,178	0,120

активности киназы гликогенсинтазы-3 (GSK-3) и киназы гликогенсинтазы-3β (GSK-3β), которые участвуют во множестве сигнальных путей, вовлечённых в развитие болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона, болезни Паркинсона [23], сахарного диабета II типа [24], рака простаты, недифференцированного лейкоза [25], биполярных расстройств [26], униполярной депрессии, воспалительных процессов, гипертрофии сердца и др., что находится в соответствии с данными [27]. Аналогичные киназы паразитов могут быть мишенями при борьбе с малярией, трипаносомозом и другими протозойными инфекциями [26, 28].

Как видно из представленных данных (табл. 2), увеличение числа атомов углерода в алкильном заместителе не влияет на величину P_a, которая остаётся практически постоянной, что указывает на основной фармакофор в этой группе – гетероцикл.

Сравнение с уже известными лекарственными препаратами – ривастигмином, используемым при деменциях альцгеймеровского типа и болезни Паркинсона, и дазатинибом, имеющим в своём составе тиазольный цикл и являющимся противоопухолевым средством, – показывает, что синтезированные нами соединения **1-6** потенциально могут проявлять большую ингибирующую активность по отношению к соответствующим протеинкиназам.

Исследование антибактериальной активности *in vitro* было выполнено по отношению к грамположительным и грамотрицательным штаммам: *Escherichia coli* (Г-), *Staphylococcus aureu*s (Г+), *Staphylococcus saprophyticus* (Г+), *Staphylococcus epidermidis* (Г+) и *Pseudomonas aeruginosae* (Г-). Результаты микробиологических исследований представлены в таблице 3.

Таблица 2. Значения вероятностей ожидаемой ингибирующей активности киназы гликогенсинтазы-3β и киназы гликогенсинтазы-3 для соединений **1-6**

Соединение	Киназа гликогенсинтазы-3β		Киназа гликогенсинтазы-3	
	P_a	P_i	P_a	P_i
1	0,650	0,003	0,593	0,003
2-6	0,623	0,003	0,543	0,004
Ривастигмин	-	-	-	-
Дазатиниб	-	-	-	-

Как видно из представленных в таблице 3 данных, все изучаемые соединения проявляют некоторую активность по отношению к *Escherichia coli*; производные **3**, **5** и **6** активны по отношению к *Staphylococcus saprophyticus*, а производные **1** и **4** – по отношению к *Staphylococcus aureus*. В то же время их активность существенно ниже по сравнению с известным антибиотиком амоксициллином, активность которого была взята за 100%. Влияние длины цепи алифатического радикала при гетероциклическом фрагменте проявилось в отношении стафиллококов: нарастание эффекта происходит при увеличении длины алкильной цепочки. По отношению к штамму *Pseudomonas aeruginosae* соединения не проявили активности.

Хотя к настоящему времени изучить экспериментально *in vitro* прогнозируемую активность по отношению к киназам гликогенсинтазы и протеинкиназам нам не удалось, полученные результаты прогноза указывают на возможные механизмы действия этих веществ.

По данным программы GUSAR, анализируемые соединения **1-6** с высокой степенью вероятности могут относиться к слаботоксичным веществам (4 класс опасности). В соответствии с прогнозом, они не будут обладать мутагенностью и тератогенностью, вероятность проявления нежелательных эффектов выражена слабо.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В ходе работы с использованием компьютерных программ PASS, Anti-Bac-Pred и GUSAR было выполнено прогнозирование биологической активности и острой токсичности для шести ранее синтезированных нами 2N-алкилзамёщенных 5-амино-3-имино-1,2,4-тиадиазолинов. Экспериментальное тестирование показало наличие определенной антибактериальной активности у некоторых производных, которая, однако, уступала препарату сравнения амоксициллину. Полученные результаты будут использованы для конструирования и синтеза новых, потенциально более активных производных.

Таблица 3. Сравнительная оценка противомикробной активности алкилтиадиазолинов, алкилтриазола и амоксициллина по отношению к грамотрицательным и грамположительным штаммам бактерий

Соединение	Длина алкильной цепочки	*Escherichia coli*	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus saprophyticus*	*Staphylococcus epidermidis*
1	C_4H_9	10%*	12%	-**	-
2	C_7H_{15}	20%	-	-	-
3	C_8H_{17}	33%	-	35%	-
4	C_9H_{19}	20%	24%	-	-
5	$C_{10}H_{21}$	33%	-	43%	-
6	$C_{12}H_{25}$	30%	-	61%	-
Амоксициллин		100%	100%	100%	100%
91% этанол		0	0	0	0

Примечание: * – активность, выраженная в процентном отношении к активности амоксициллина; ** – активность не обнаружена.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ, № 19-03-00888.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Филимонов Д.А., Дружиловский Д.С., Лагунин А.А., Глориозова Т.А., Рудик А.В., Дмитриев А.В., Погодин П.В., Поройков В.В.* (2018) Biomedical Chemistry: Research and Methods, **1**(1), e00004. DOI:10.18097/bmcrm00004.
2. *Lagunin A.A., Zakharov A.V., Filimonov D.A., Poroikov V.V.* (2011) Molecular Informatics, **30**(2-3), 241-250.
3. Компьютерная программа Anti-Bac-Pred. http://way2drug.com/antibac/.
4. *Серов В.Н., Буралкина Н.А., Борисенко М.Ю., Мамедова Ф.Ш.* (2016) Медицинский совет, №2, 60-62.
5. *Михайлов А.В., Решетько О.В., Луцевич К.А.* (2007) Клин. микробиол. антимикроб. химиотер., **9**(1), 34-47.
6. *Потекаев Н.Н., Жукова О.В., Цыкин А.А., Сирмайс Н.С.* (2014) РМЖ “Медицинское обозрение”, **24**, 1790.
7. *Данилова Е.А., Исляйкин М.К.* (1994) Изв. вузов. Химия и хим. технология, **37**(2), 77-81.
8. *Islyaikin M.K., Danilova E.A., Kudrik E.V., Smirnov R.P., Budunova A.P., Kinzirskii A.S.* (1997) Pharm. Chem. J., **31**(8), 409-412.
9. *Данилова Е.А., Меленчук Т.В., Трухина О.Н., Исляйкин М.К.* (2010) Макрогетероциклы, **3**(1), 68-81.
10. *Danilova E.A., Kudayarova T.V., Islyaikin M.K., Koifman O.I.* (2018) Russ. J. Gen. Chem., **88**(9), 2000-2012.
11. *Jain A.K., Sharma S., Vaidya A., Ravichandran V., Agrawal R.K.* (2013) Chem. Biol. Drug Des., **81**(5), 557-576.
12. *Alya'a J.A.* (2018) Int. Res. J. Pharm., **9**(10), 5-12.
13. *Krchňák V., Holladay M.W.* (2002) Chem. Rev., **102**(1), 61-92.
14. *Pal M., Batchu V.R., Parasuraman K., Yeleswarapu K.R.* (2003) Org. Chem., **68**(17), 6806-6809.
15. *Unangst P.C., Shrum G.P., Connor D.T., Dyer R.D., Schrier D.J.* (1992) J. Med. Chem., **35**(20), 3691-3698.
16. *Omar A.A.E., Deeb A., Omar A.M., Lehmann J.* (2004) Bioorg. Med. Chem., **12**(18), 5107-5113.
17. *Castro A., Castano T., Encinas A., Porcal W., Carmen G.* (2006) Bioorg. Med. Chem., **14**, 1644-1652.
18. *Прошин А.Н., Бачурин С.О.* (2011) Пат. 2449997 РФ. Опуб. 10.05.2012. Бюлл. №13.
19. *Butina Yu.V., Kudayarova T.V., Danilova E.A., Semenishin N.N.* (2016) Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol., **59**(10), 36-40.
20. *Butina Yu.V., Danilova E.A., Kudayarova T.V.* (2016) Macroheterocycles, **9**(2), 206-210.
21. *Butina Yu.V., Kudayarova T.V., Danilova E.A.* (2018) Russ. J. Gen. Chem., **88**(6), 1120-1123.
22. *Butina Yu.V., Danilova E.A., Kudayarova T.V., Malyasova A.S.* (2018) Macroheterocycles, **11**(1), 59-66.
23. *Осолодкин Д.И., Шульга Д.А., Палюлин В.А., Зефиров Н.С.* (2010) Изв. АН. Сер. хим., **10**, 1932-1943.
24. *Лосенков И.С.* (2015) Клинико-патофизиологические особенности функционирования киназы гликогенсинтазы 3β при аффективных расстройствах (клинико-экспериментальное исследование). Дисс. канд. мед. наук, научно-исследовательский институт психического здоровья, Томск.
25. *Martinez A., Castro A., Dorronsoro I., Alonso M.* (2002) Med. Res. Rev., **22**(4), 373-384.
26. *Иванова С.А., Лосенков И.С., Бохан Н.А.* (2014) Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, **6**, 70-76.
27. *Martinez A., Alonso M., Castro A., Perez C., Moreno F.J.* (2002) J. Med. Chem., **45**(6), 1292-1299.
28. *Осолодкин Д.И.* (2011) Молекулярный дизайн потенциальных ингибиторов киназы гликогенсинтазы 3. Дисс. канд. хим. наук, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва.

Поступила в редакцию: 15. 01. 2019.
После доработки: 04. 03. 2019.
Принята к печати: 18. 03. 2019.

THE PREDICTION OF THE SPECTRUM OF BIOLOGICAL ACTIVITY AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF DIAMINOAZOLES

Yu.V. Butina[1]*, T.V. Kudayarova[2], E.A. Danilova[2], M.K. Islyaikin[2]

[1]Ivanovo State Medical Academy,
8 Sheremetev ave., Ivanovo, 153012 Russia; *e-mail: yuliya_butina@mail.ru
[2]Ivanovo State University of Chemistry and Technology, 7 Sheremetev ave., Ivanovo, 153000 Russia

The work is devoted to predicting and studying biological properties of N-substituted analogs of 3,5-diamino-1,2,4-thiadiazole, which, in their turn, include in the composition of many drugs that exhibit a wide range of pharmacological actions. For searching of new alternative drugs with an antibacterial activity, but lacking resistance of microorganism strains to them, a computer screening of 2N-alkyl-substituted 5-amino-3-imino-1,2,4-thiadiazolines previously synthesized by us was carried out. The prediction of the spectrum of biological activity, as well as the determination of the probable toxicity of these compounds, was performed using the freely available computer programs PASS, Anti-Bac-Pred, and GUSAR. The study of the antibacterial activity *in vitro* against gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*) and gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosae*) bacterial strains was performed by the disco-diffusion method. Experimental data roughly correspond to the predictions.

Key words: 3,5-diamino-1,2,4-thiadiazole; 2N-alkyl-thiadiazolines; computer prediction; PASS; GUSAR; biological activity