

Широкомасштабний скринінг сполук 4-фенілкумаринового та ізофлавоноїдного рядів з використанням мікроорганізмів

О. М. Живолуп, С. М. Ярмолук, М. М. Гаразд, Я. Л. Гаразд¹,
В. В. Шилін¹, О. С. Огороднійчук¹, В. П. Хиля²

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

¹ Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
253660, Київ, вул. Мурманська, 1

² Київський університет імені Тараса Шевченка
252033, вул. Володимирська, 64

Salmonella typhimurium LT2, *Escherichia coli* та *Candida albicans* були використані для дослідження понад трьохсот сполук 4-фенілкумаринового та ізофлавоноїдного рядів. Було виявлено два структурних хімічних фрагменти 7-(1-R₁-2-R₂-1-он-етил)-О-4-фенілкумарин та 2-R₄-3-R₅-6-R₈-R₃-7-R₁О-хромон з бактерицидною та протидріжджовою активністю.

Вступ. Значення органічного синтезу у справі пошуку і розвитку нових фармацевтичних засобів важко переоцінити. Останніми роками як перспективний шлях отримання сполук потрібної біологічної активності застосовують метод комбінаторного синтезу рядів хімічних сполук — комбінаторних бібліотек [1]. Питання про вибір вихідної (базової) сполуки чи сполук для створення комбінаторних рядів у кожному випадку вирішується окремо і не існує загального підходу (алгоритму) до цієї проблеми [2].

Суть методу полягає в отриманні шляхом комбінації однотипних хімічних реакцій колекції великих рядів хімічних структур. Комбінаторні бібліотеки — це колекції тисяч, десятків і навіть сотень тисяч структур. Для синтезу, очищення, підтвердження структури та біологічного скринінгу використовують високопродуктивні роботизовані комплекси.

Щодо методів, які застосовуються для аналізу

біологічної активності хімічних сполук, то, попри величезну їхню різноманітність, вони зводяться до двох груп: ті, в яких використовуються ізольовані компоненти біологічних систем, і системи з цілісними біологічними об'єктами (мікроорганізми чи культури клітин). Методи аналізу, що базуються на реєстрації дії хімічних сполук на цілісні мікроорганізми чи культури клітин, значно переважають першу групу як з точки зору інформативності (зокрема щодо проникності та стійкості хімічної сполуки в реальних біологічних об'єктах), так і з точки зору їхньої вартості і доступності [3].

Протягом тривалого часу ми проводимо синтез сполук ізофлавоноїдної будови та кумаринів, які, як відомо, мають різнобічну біологічну активність [4, 12]. Нещодавно нами синтезовано ряд аміноацильних похідних 4-фенілкумарину та ізофлавонів, хімічні структури яких належать до пептидоміметиків — широкого класу сполук, що проявляють різнопланові біологічні активності.

З метою встановлення можливої біологічної (антимікробної) активності було проаналізовано дію основ Манніха, 7-О-аміноацильних похідних ізофлавоноїдів, N-(хромон-7-ілокси)-ацетатів та N-

© О. М. ЖИВОЛУП, С. М. ЯРМОЛУК, М. М. ГАРАЗД,
Я. Л. ГАРАЗД, В. В. ШИЛІН, О. С. ОГОРОДНІЙЧУК,
В. П. ХИЛЯ, 1998

(4-фенілкумарин-7-ілокси)-ацетатів амінокислот на життєздатність таких важливих потенційних патогенів, як *Salmonella typhimurium* LT2, *Escherichia coli* та *Candida albicans*.

Матеріали і методи. У мікробіологічному аналізі хімічних сполук на здатність до пригнічення життєдіяльності було використано:

S. typhimurium LT2 (*Salmonella Genetic Stock Centre*, Канада); *E. coli* (клінічний ізолят); *C. albicans* (клінічний ізолят).

Аналіз на твердому агаризованому середовищі було проведено традиційним методом дифузії з паперових дисків, змочених розчином досліджуваної сполуки [5]. Дію сполуки реєстрували та оцінювали за наявністю та за величиною навколо паперового диска зони, вільної від росту посіяних мікроорганізмів.

Вплив хімічних сполук на ріст мікроорганізмів у рідкому живильному середовищі аналізували методом серійних (кратних) розведень [6] у 96-лункових імунологічних планшетах. У цьому дослідді дію хімічних сполук на життєдіяльність мікроорганізмів фіксували після 18 год інкубації при 37 °С (для ентеробактерій) чи 24 год при 29 °С (для дріжджів) за зміною оптичної густини на довжині хвилі 600 нм денситометром для 96-лункових планшетів (титерідером) TR-700. Для ентеробактерій використовували багате середовище LB [7]. Дріжджі культивували на середовищі Сабуро [8].

Для біологічних досліджень застосовували розчини хімічних сполук у DMSO. Проби на рідкому живильному середовищі містили досліджувані сполуки з концентраціями 5000, 1000, 200 і 50 μM . У біопробах на агаризованому середовищі використовували розчини хімічних сполук з вихідною концентрацією 50 μM .

Загалом було досліджено 318 сполук згаданих вище хімічних рядів.

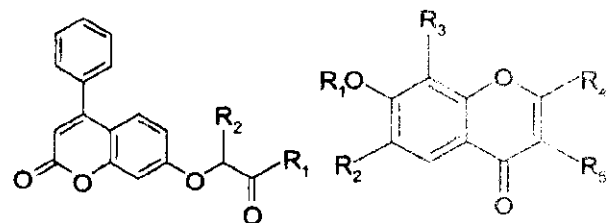
Оскільки наші інтереси були зосереджені лише на виявленні загальних закономірностей біологічної дії аналізованих рядів сполук, кількісні показники їхньої біологічної активності було формалізовано. Здатність до пригнічення росту мікроорганізмів у рідкому середовищі на 30 % і більше при концентрації аналізованої сполуки 200 μM позначали як добру (++)), при концентрації 1000 μM — як посередню (+), при 5000 μM — як слабку/відсутню (-). При концентрації 50 μM серед аналізованих сполук достовірної біологічної активності (пригнічення росту) не було виявлено.

Подібним чином здатність до пригнічення росту мікроорганізмів на агаризованому середовищі було позначено: як добру (++) при ширині стериль-

ної зони навколо паперового диска понад 3 мм, як посередню (+) при ширині зони 1—2 мм, як слабку або відсутню (-).

Результати і обговорення. За результатами проведених біопроб було виявлено декілька хімічних сполук зі здатністю до пригнічення росту ентеробактерій та патогенних дріжджів чи тих або інших окремо. Хімічні сполуки з суттєвою біологічною активністю наведено у табл. 1 і 2.

Аналіз отриманих результатів дозволяє встановити певні закономірності зв'язку залежності між структурою та біологічною (антимікробною) активністю хімічних сполук. На основі проведення біопроб на пригнічення життєздатності ентеробактерій *S. typhimurium*, *E. coli* та патогенних дріжджів *C. albicans* можна виділити два «біологічно активних структурних фрагменти» — А і Б. Фрагмент А — спільний структурний фрагмент групи похідних 4-фенілкумарину (табл. 1), фрагмент Б об'єднує групу біологічно активних ізофлавоноїдів (табл. 2):



Фрагмент А

Фрагмент Б

Речовини, що містять фрагмент А (табл. 1), характеризуються в цілому як антибактеріальною, так і протидріжджовою активністю. Амінокислотні похідні 4-фенілкумарину мають переважно (сполуки 267, 271, 272) або виключно (сполуки 265, 266) антибактеріальну дію. Якщо $R_2 = \text{H}$, то спостерігається максимальна активність (пригнічення росту) у відношенні до ентеробактерій. При заміні R_2 на об'ємніший замісник (CH_3) згаданий ефект різко падає. Важлива також природа замісника R_1 . Заміна в R_1 карбоксильної групи на амідну (сполука 286) призводить до повної втрати впливу на ріст ентеробактерій і в той же час різко підвищує здатність до пригнічення росту патогенних дріжджів *C. albicans*.

Таблиця 1
Результати біологічного аналізу сполук, які містять фрагмент А

| Номер сполуки | Замісник | | <i>C. albicans</i> | | <i>E. coli</i> | | <i>S. typhimurium</i> | |
|---------------|--------------------|-----------------|--------------------|------|----------------|------|-----------------------|------|
| | R ₁ | R ₂ | Рідке | Агар | Рідке | Агар | Рідке | Агар |
| 265 | NLeu* | H | - | - | + | ++ | | ++ |
| 266 | Met | H | - | - | + | + | | + |
| 267 | Gly | H | + | + | + | + | | + |
| 271 | Phe | H | + | + | + | + | | + |
| 272 | Glu | H | + | + | + | + | | + |
| 282 | NLeu* | CH ₃ | + | + | - | + | | + |
| 284 | Met | CH ₃ | + | + | - | + | | + |
| 286 | ProNH ₂ | CH ₃ | + | + | - | - | | - |

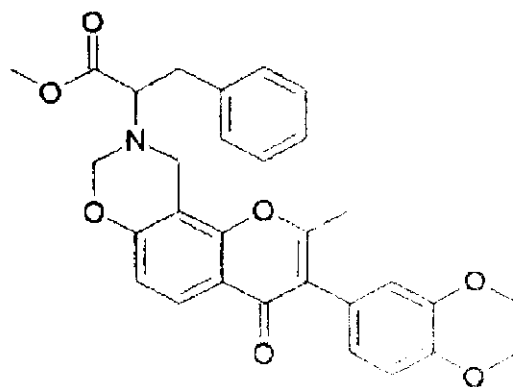
*Норлейцин.

Другою групою хімічних сполук, що показали суттєву біологічну активність, були похідні ізофлавоноїдів (табл. 2). Як і у випадку похідних 4-фенілкумарину, сполуки на основі фрагменту Б виявляють як сумісну пригнічуючу дію на ентеробактерії та дріжджі, так і здатність впливати на організми кожної групи окремо. З аналізу біологічної активності сполук цього ряду можна зробити припущення, що найсуттєвіший вплив на здатність та характер біологічної дії мають замісники R₁ та R₂. Загальна ознака сполук з високою біологічною активністю — ацильний тип R₁ (сполуки 69, 72, 76, 141, 112, 116, 155, 157, 228, 205, 230, 207, 211) або повна його відсутність (R₁ = H) (сполуки 53, 58, 54, 56, 187). Якщо R₁ — алкіл (сполуки 235, 241), то це викликає різке зниження здатності пригнічувати ріст як ентеробактерій, так і дріжджів *C. albicans*.

Окремим випадком сполук з замісником R₁ є група N-заміщених аміноацильних похідних хрому — сполуки 113, 172, 103, 129. У цій групі дві останні різко відрізняються повною відсутністю здатності до пригнічення обраних мікроорганізмів. Пояснити таку різку відмінність у властивостях згаданих сполук можна тим, що, на відміну від Cbz- та Tos-блокованих аміноацильних похідних (сполуки 103, 129), Вос-захищені сполуки 113, 172 лабільніші і, очевидно, в умовах культурального середовища (рН 6,5—4,5) можливе деблокування їхньої аміногрупи.

Замісники по R₂ у випадку високої антимікробної активності повинні мати N-аміноацилме-

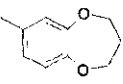
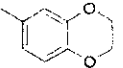
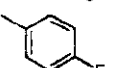
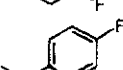
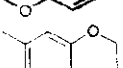
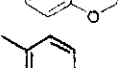
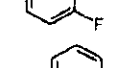
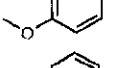
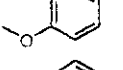
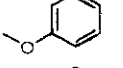
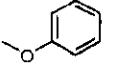
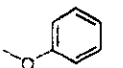
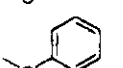
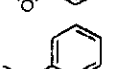
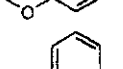
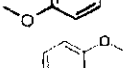
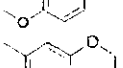
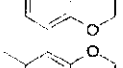
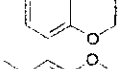
тильну природу (сполуки 52, 53, 54, 56, 58) або бути взагалі відсутніми (R₂ = H). У випадку заміни по R₃ карбоксильної групи на складноефірну (сполука 59) спостерігається повна втрата антимікробної активності. До таких же наслідків призводить одночасне заміщення карбоксильної групи R₂ та оксигрупи R₁ (сполука 60):



Сполука 60

Природа R₂, на наш погляд, не має суттєвого впливу на антимікробну активність аналізованих похідних ізофлавоноїдів. Можна припустити тільки негативний вплив на розчинність аліфатичного за-

Таблиця 2
Результати біологічного аналізу сполук, які містять фрагмент Б.

| Номер сполуки | Замісник | | | | | <i>C. albicans</i> | | <i>E. coli</i> | |
|---------------|---------------|----|---------------------------------------|-----------------|---|--------------------|------|----------------|------|
| | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | Рідке | Агар | Рідке | Агар |
| 52 | H | H | -CH ₂ -Pro | CH ₃ |  | ++ | - | - | - |
| 53 | H | H | -CH ₂ -Pro | CH ₃ |  | ++ | - | - | - |
| 54 | H | H | -CH ₂ -Leu | CH ₃ |  | ++ | - | - | - |
| 56 | H | H | -CH ₂ -Phe | H |  | ++ | - | - | - |
| 58 | H | H | -CH ₂ -Phe | H |  | ++ | - | - | - |
| 59 | H | H | -CH ₂ -PheOCH ₃ | COOH |  | - | - | - | - |
| 69 | HCl · Gly | H | H | H |  | - | - | + | ++ |
| 72 | HCl · Val | H | H | H |  | - | - | + | ++ |
| 76 | HCl · Met | H | H | H |  | - | + | + | ++ |
| 103 | CbzLeu | H | H | CF ₃ |  | - | - | - | - |
| 112 | HCl · Val | H | H | CF ₃ |  | ++ | + | - | + |
| 113 | BocLeu | H | H | CF ₃ |  | + | + | - | - |
| 116 | HCl · Ile | H | H | CF ₃ |  | ++ | + | - | + |
| 129 | TosAbu | H | H | CF ₃ |  | - | - | - | - |
| 141 | HCl · Gly | H | H | H |  | + | - | + | ++ |
| 155 | HCl · Met | H | H | CH ₃ |  | ++ | - | - | - |
| 157 | HCl · Trp | H | H | CH ₃ |  | ++ | - | - | - |
| 172 | BocTyr OBz | H | H | CF ₃ |  | + | + | - | - |
| 187 | H | H | H | CH ₃ |  | ++ | + | - | + |

Закінчення табл. 2

| Номер сполуки | Замісник | | | | | <i>C. albicans</i> | | <i>E. coli</i> | | <i>S. typhimurium</i> | |
|---------------|------------------------|----|----|-----------------|----|--------------------|------|----------------|------|-----------------------|------|
| | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | Рідке | Агар | Рідке | Агар | Рідке | Агар |
| 205 | HCl · Gly | H | H | H | | + | ++ | - | - | - | - |
| 207 | HCl · Gly | Pr | H | H | | + | ++ | - | - | - | - |
| 211 | HCl · Tyr | Pr | H | H | | ++ | + | - | + | - | - |
| 228 | HCl · Trp | H | H | CF ₃ | | ++ | + | - | - | - | - |
| 230 | HCl · Val | H | H | CH ₃ | | ++ | ++ | - | + | - | - |
| 235 | -CH ₂ COOH | H | H | CH ₃ | | - | - | - | - | - | - |
| 241 | -CH ₂ COLeu | H | H | CH ₃ | | - | - | - | - | - | - |

Примітка. Cbz — бензилоксикарбоніл; Boc — трет-бутилоксикарбоніл; Tos — тозил (*n*-метилфенілсульфоніл); Abu — γ -аміномасляна кислота; Bz — бензил; Pr — пропіл.

місника у цьому положенні. Різноманітність замісників по R₅ дозволяє припустити, що їхній вплив на антимікробну активність сполук незначний, можливо, і відсутній. Серед похідних хромонів з високою антимікробною активністю замісники по R₃ були як гідрофобні ароматичні, так і основні гетероцикли.

Ряд похідних, де R₄ = H, CH₃, CF₃, відзначається високою антимікробною активністю. В той же час залежно від природи замісника R₄ спостерігається специфічність пригнічення росту тієї чи іншої групи мікроорганізмів. У випадку R₄ = H відмічено переважно чи виключно антибактеріальна дія сполук 69, 72, 76, 141. Якщо R₄ = CF₃ біологічні (антимікробні) властивості сполук різко змінюються на протидріжджові (сполуки 112, 113, 116). Описаний вплив спостерігається за умови, що R₃ = H. У випадку, коли R₃ — N-аміноацилметиленовий залишок, їхня біологічна дія стає виключно протидріжджовою.

Метою проведеного експерименту було визначення перспективності окремих хімічних фрагментів, рядів для подальшого направлено синтезу на їхній основі хімічних комбінаторних бібліотек. Отримані нами початкові антимікробні концентрації,

що перевищують терапевтичні концентрації поширених антибіотиків (10—200 μ M [9, 11]) і сучасних антибактеріальних та протигрибкових (протидріжджових) засобів (починаючи з одиниць μ M [10, 11]), на наш погляд, цілком достатні для масового скринінгу та пошуку «drug candidate» і «lead».

Висновки. В результаті проведеного біологічного аналізу ми знайшли два перспективних хімічних фрагменти, а саме — фрагменти А і Б, які можуть бути використані як основа для подальшої модифікації з метою підвищення ефективності і специфічності бактерицидної та протидріжджової дії похідних 4-фенілкумарину та ізофлавоноїдів. Сполуки, що містять як фрагмент А, так і фрагмент Б виявили здатність до пригнічення росту і ентеробактерій *S. typhimurium* та *E. coli*, і дріжджів *C. albicans*.

Слід зазначити, що застосований нами підхід з використанням мікроорганізмів є досить цілісним та інформативним, оскільки враховує процеси біодеградації та проникності аналізованих сполук в клітину. Тестові системи з використанням ізолюваних компонентів біологічних систем позбавлені таких переваг.

А. М. Живолуп, С. Н. Ярмолук, М. М. Гаразд, Я. Л. Гаразд,
Б. В. Шилин, А. С. Огородничук, В. П. Хиля

Широкомасштабный скрининг соединений

4-фенилкумаринового и изофлавоноидного рядов с использованием микроорганизмов

Резюме

Salmonella typhimurium LT2, *Escherichia coli* и *Candida albicans* были использованы для исследования более трехсот соединений 4-фенилкумаринового и изофлавоноидного рядов. Определены два структурных химических фрагмента 7-(1-R₁-2-R₂-1-он-этил)-О-4-фенилкумарин и 2-R₄-3-R₅-6-R₂-8-R₃-7-R₁-О-хромон с бактерицидным и антидрожжевым действием.

A. M. Zhyvolup, S. M. Yarmoluk, M. M. Garazd, Y. L. Garazd,
B. V. Shilin, A. S. Ogorodnychuk, V. P. Khilya

The high scale screening of compounds of the series of isoflavonoids and 4-phenylcoumarins with the use of microorganisms

Summary

In order to investigate antimicrobial activity of more than 300 compounds of the series of isoflavonoids and 4-phenylcoumarins *Salmonella typhimurium* LT2, *Escherichia coli* and *Candida albicans* were used. Two structural chemical fragments 7-(1-R₁-2-R₂-1-он-ethyl)-O-4-phenylcoumarin and 2-R₄-3-R₅-6-R₂-8-R₃-7-R₁-O-chromone possessing antibactericidal and anticandidal effects were determined.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hogan, Jr., J. C. Combinatorial chemistry in drug discovery // *Nature Biotechnol.*—1997.—15, N 4.—P. 328—330.
2. Fergusson A. M. Designing chemical libraries for lead discovery // *J. Biomol. Screen.*—1996.—1, N 2.—P. 65—73
3. Klein R. D., Geary T. G. Recombinant microorganisms as tools for high throughput screening for nonantibiotic compounds // *Ibid.*—1997.—2, N 1.—P. 41—49.
4. Казаков А., Хиля В. П., Межерский В. В., Липкев Д. Природные и модифицированные изофлавоноиды.— Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1985.—С. 181
5. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований.—М.: Медицина, 1978.—392 с.
6. Утевский Н. Л. Микробиология с техникой микробиологических исследований.—М.: Медицина, 1975.—472 с.
7. Миккер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.—М. Мир, 1976.—436 с.
8. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов в клетках.—М.: Мир, 1984.—240 с.
9. Страчунский Л. С., Козлов С. Н. Антибиотики: клиническая фармакология: руководство для врачей.—Смоленск: Ами Пресс, 1994.—207 с.
10. Франклин Т., Слоу Дж. Биохимия антимикробного действия.—М.: Мир, 1984.—240 с.
11. Кулага В. В., Романенко И. М., Черномордик А. Б. Кандиды и их лечение.—Киев: Здоровье, 1985.—125 с.
12. Максютин Н. П., Комиссаренко П. Ф., Прокопенко А. П. и др. Растительные лекарственные средства.—Киев: Здоровье, 1985.—280 с.

Надійшла до редакції 09.10.97