

УДК 615.038:579.873.21:547.823/824

# НОВІ ПОХІДНІ ГІДРАЗИДУ ІЗОНІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНІ ЗАСОБИ

Н.Б.Гончаренко, В.В.Благодатний\*, В.В.Ковалішин\*\*, І.М.Коперник\*\*,  
О.П.Козаченко\*\*, В.С.Броварець\*\*, Л.О.Метелиця\*\*

Клініко-діагностична лабораторія, Територіальне медичне об'єднання «Фтизіатрія», м. Київ

\* Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика

\*\* Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України

02660, м. Київ, вул. Мурманська, 5. E-mail: kopernik1@ua.fm

**Ключові слова:** QSAR; *Mycobacterium tuberculosis*; H37RV; HR; похідні ізоніазиду

Поява мультирезистентних штамів мікобактерії туберкульозу (*Mtb*) є стимулом до пошуку нових ефективних лікарських засобів. Незважаючи на появу сучасних протитуберкульозних препаратів, ізоніазид є ключовим та найбільш ефективним компонентом для всіх мультитерапевтичних схем лікування, рекомендованих ВОЗ. Описаний QSAR дизайн, синтез та оцінка *in vitro* протитуберкульозної активності ряду потенційних похідних ізоніазиду відносно штаму *Mtb* H37Rv та мультирезистентного штаму (HR). QSAR методологія була застосована з використанням штучних нейронних мереж. Прогнозуюча здатність регресійних моделей оцінювалася за допомогою методу ковзного аналізу та коефіцієнта перехресної оцінки  $q^2$ . За допомогою розробленої QSAR моделі проведено оцінку інгібіторної активності 440 віртуальних сполук проти *Mtb*, сім похідних ізоніазиду відібрано та синтезовано. У біологічних дослідженнях використано мультирезистентний штам *Mtb*, стійкий до ізоніазиду та рифампіцину. Усі синтезовані сполуки з високою передбаченою активністю продемонстрували антимікобактеріальний ефект по відношенню до штаму *Mtb* H37Rv. «Сполука-лідер» N1-(3-нітрофенілметиліден)-піридин-4-карбогідразид, що виявила активність відносно мультирезистентного штаму *Mtb* (HR), є об'єктом подальших досліджень як потенційний антимікобактеріальний агент.

**NEW DERIVATIVES OF ISONICOTINIC ACID HYDRASIDE AS POTENTIAL ANTITUBERCULAR AGENTS**  
N.B.Goncharenko, V.V.Blagodatnyi, V.V.Kovalishyn, I.M.Kopernyk, O.P.Kozachenko, V.S.Brovarets, L.O.Metytsia

**Key words:** QSAR; *Mycobacterium tuberculosis*; H37RV; HR; isoniazide derivatives

The appearance of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) is a stimulus for searching new and efficient antitubercular drugs. Despite the appearance of new antitubercular drugs, isoniazid is still the key and most effective component in all multitherapeutic regimens recommended by the WHO. This paper describes the QSAR design, synthesis and *in vitro* evaluation of the antitubercular activity of several potent isoniazid derivatives against *Mtb* strain (H37Rv) and resistant strain (HR). The QSAR method was applied using Artificial Neural Networks. The predictive ability of the regression model was estimated through leave-one-out cross-validation coefficient  $q^2$ . The inhibition activities of 440 virtual compounds against *Mtb* were evaluated by the QSAR model developed, and seven isoniazid derivatives were selected and synthesized. In the biological research the multidrug-resistant strain of *Mtb* with resistance to isoniazid and rifampicin was used. All compounds synthesized with the predicted high activity showed antimycobacterial activity against *Mtb* strain H37Rv. "The compound-leader" – N1-(3-nitrophenylmethylidene)-pyridine-4-carbohydrazide revealing the activity against multiresistant strain (HR) of *Mtb* is identified as an original object for further research as a potential antimycobacterial agent.

**НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ГИДРАЗИДА ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВOTУБЕРКУЛЕЗНЫЕ СРЕДСТВА**

Н.Б.Гончаренко, В.В.Благодатный, В.В.Ковалишин, И.М.Коперник, О.П.Козаченко, В.С.Броварець, Л.А.Метелиця

**Ключевые слова:** QSAR; *Mycobacterium tuberculosis*; H37RV; HR; производные изониазида

Появление мультирезистентных штаммов микобактерии туберкулеза (*Mtb*) является стимулом для поиска новых эффективных лекарственных средств. Несмотря на появление современных противотуберкулезных препаратов, изониазид является ключевым и наиболее эффективным компонентом для всех мультитерапевтических схем лечения, рекомендованных ВОЗ. Эта статья описывает QSAR дизайн, синтез и оценку *in vitro* противотуберкулезной активности ряда потенциальных производных изониазида против штамма H37Rv и мультирезистентного штамма *Mtb*. QSAR методология была использована с применением искусственных нейронных сетей. Прогнозирующая способность регрессионных моделей оценивалась с помощью метода скользящего анализа и коэффициента перекрестной оценки  $q^2$ . С помощью разработанной QSAR модели была проведена оценка ингибиторной активности 440 виртуальных соединений против *Mtb*, семь производных изониазида отобрано и синтезировано. В биологических исследованиях использовали мультирезистентный штамм *Mtb*, устойчивый к изониазиду и рифампицину. Все синтезированные соединения с высокой прогнозируемой активностью продемонстрировали антимикобактериальный эффект относительно штамма *Mtb* H37Rv. «Соединение-лидер» N1-(3-нитрофенілметиліден)-піридин-4-карбогідразид, проявившее активность относительно мультирезистентного штамма *Mtb* (HR), является объектом дальнейших исследований в качестве потенциального антимикобактериального агента.

Відомо, що характерною особливістю штамів *Mycobacterium tuberculosis* вважається їх надзвичайна мінливість та особливості структури клітинної оболонки, завдяки чому вони здатні швидко пристосовуватися до антибактеріальних препаратів. Складна будова клітинної мембрани мікобактерій є не тільки перешкодою для проникнення терапевтичних засобів, але й створює умови для існування цих мікроорганізмів у латентній формі та формує їх резистентність [1, 2]. Щільний зв'язок міколових кислот з арабіногалактаном та пептидогліканом клітинної стінки мікобактерій забезпечують їй наднизьку проникність, а ацильовані трегалози, відомі як корд-фактори або фактори вірулентності, індукують на її поверхні експресію цитокінів [3, 4].

Особливу небезпеку представляють мультирезистентні штами *M. tuberculosis*, що є стійкими одночасно до декількох лікарських засобів [5]. Інфекції, викликані такими штамми, мають гостро прогресуючий характер та погано піддаються лікуванню існуючими препаратами.

Зважаючи на те, що за останні 30 років не з'явилося жодного нового протитуберкульозного препарату з новим механізмом дії [6], пошук високоефективних антимікобактеріальних засобів є актуальним завданням сучасної фармацевтики та біоорганічної хімії.

Відомо, що за класифікацією протитуберкульозних препаратів Міжнародного союзу боротьби з туберкульозом до препаратів з високою ефективністю (1 група) відноситься ізоніазид як найбільш ефективний з препаратів гидразиду ізонікотинової кислоти при будь-якій формі та локалізації активного туберкульозу як у дорослих, так і у дітей [7].

Мета роботи – QSAR прогнозування та вивчення антимікобактеріальної активності нових сполук групи ізоніазиду проти культури штамів *Mycobacterium tuberculosis*.

Дана робота є продовженням досліджень, описаних у попередніх публікаціях [8, 9].

## Матеріали та методи

**QSAR моделювання.** Використана у роботі база даних сполук складалася з похідних ізоніазиду – інгібіторів *M. tuberculosis* (для штаму H37Rv)[9]. Активність сполук оцінювали за величиною MIK (мінімальна інгібуюча концентрація), яка варіювалася від 0,00328 до 2800,34 мкМ. Кожну молекулу моделювали за допомогою програми Chemaxon Standardizer [10]. 3D структури оптимізували за допомогою програми Chemaxon Standardizer та зберігали у SDF форматі. Дескриптори розраховували за програмою DRAGON [11]. Антимікобактеріальну активність зумовлював набір, сформований з найбільш значимих дескрипторів (1192 дескриптори).

Для побудови прогнозуючих QSAR моделей використовували метод асоціативних штучних нейронних мереж (ASNN-Associative Neural Networks) [12, 13]. Якість всіх моделей оцінювали за допомогою методу ковзного контролю (МКК, leave-one-out, LOO) [14].

Прогнозуючу здатність регресійних моделей оцінювали за допомогою коефіцієнта перехресної оцінки  $q^2$ , запропонованого Крамером та ін. [15].

$$q^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (O_i - Y_i)^2}{\sum_{i=1}^N (Y_i - Y_{mean})^2}, \quad (1)$$

де:  $O_i$  – розрахунковий вектор активності молекули  $i$ ;  $Y_i$  – цільовий вектор активності молекули  $i$ ;  $Y_{mean}$  – середнє значення  $Y_i$ ;  $N$  – кількість сполук.

**Біологічні дослідження.** При вивченні протитуберкульозної активності похідних ізоніазиду використовували «класичний» штам *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) та мультирезистентний штам (HR) зі стійкістю до ізоніазиду та рифампіцину.

## Експериментальна частина

QSAR модель було розроблено виключно на основі навчального набору, а її якість підтверджено шляхом прогнозування інгібіторної активності сполук з тестового набору даних [16]. Процес навчання ASNN проводили на наборі даних 400 сполук. Для тестування QSAR моделі використовували 184 сполуки. Після побудови загальної моделі (на основі всіх 1192 дескрипторів) за допомогою методів відбору дескрипторів [17, 18] створено QSAR модель на основі 62 дескрипторів. Точність прогнозу, отримана для навчальної вибірки даних, складала  $q^2 = 0,77 \pm 0,01$ , тоді як для тестового набору  $q^2 = 0,71 \pm 0,01$ .

На рисунку графічно представлено співвідношення експериментально отриманого значення  $-\lg(\text{MIK})$  до його передбаченого значення для навчального та тестового наборів даних.

Як видно з рисунка, для сполук з тестового набору різниця між експериментальним та передбаченим значеннями активності лежить в межах 1-2  $\lg(\text{MIK})$ . Для решти сполук з тестового набору (174 з 184) різниця між експериментальним та передбаченим значеннями активності лежить у межах 1  $\lg(\text{MIK})$ , що свідчить про високу прогнозуючу здатність розробленої QSAR моделі.

Віртуальний набір з 440 сполук, що були частково досліджені у попередній роботі [8], проаналізовано за допомогою розробленої нами QSAR моделі. Інгібіторна активність всіх сполук була передбачена в межах 1,7-3,7 мкМ, що свідчить про приблизно однакову активність сполук проти штаму H37Rv *M. tuberculosis*. Сполуки 1-7 з найвищою передбаченою активністю відібрано для синтезу та подальшого біологічного тестування. Син-

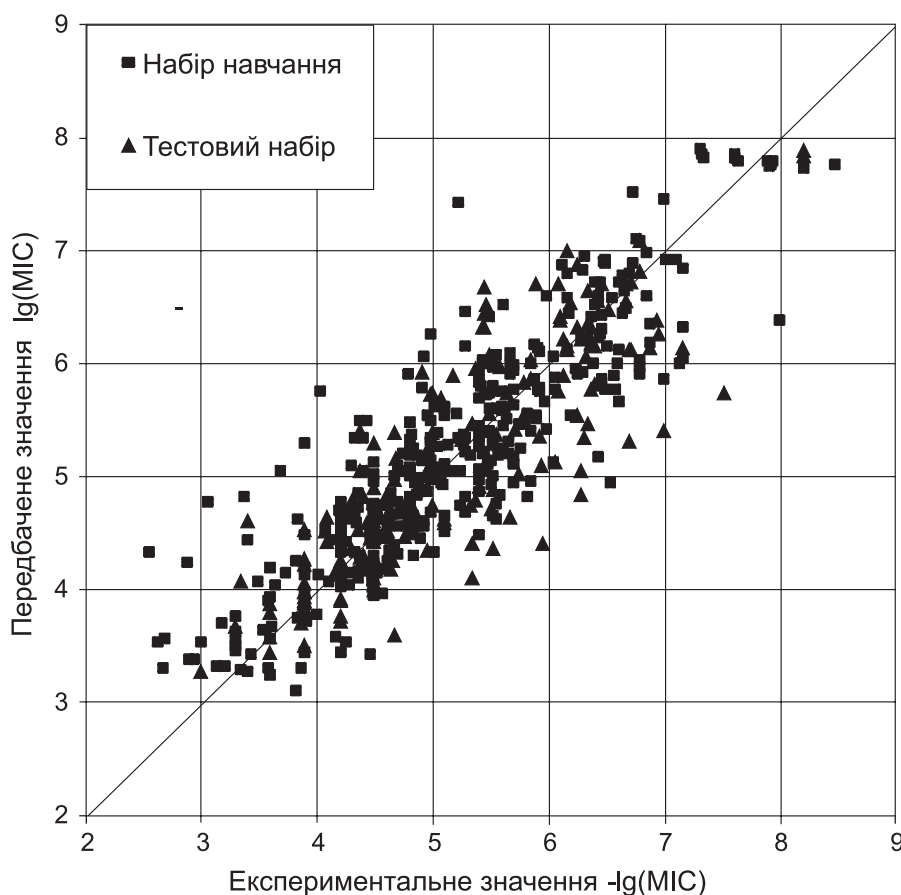
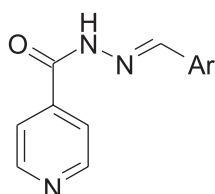


Рис. Співвідношення експериментально отриманого значення  $-\lg(\text{MIC})$  до його передбаченого значення для навчального та тестового наборів даних.



1-7

Ar = 4-EtC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (1); 3-O<sub>2</sub>NC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (2); 3-H(O)CC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (3);  
4-H(O)CC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (4); 4-MeO(O)CC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (5); 2-MeC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (6);  
3-MeC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (7)

Схема

тез сполук **1-7** проводили за відомими методами [19, 20, 21, 22] (схема).

Культивування штамів *Mycobacterium tuberculosis* проводили на стандартному поживному середовищі Левенштейна-Йенсена методом пропорцій за Канетті [23]. Суспензію культури стандартизували за бактеріальним стандартом мутності (1 McF). Інкубацію бактеріальної суспензії проводили впродовж 6 тижнів при температурі +37°C.

Результати дослідження протитуберкульозної активності синтезованих сполук представлено в таблиці.

Дані таблиці свідчать, що синтезовані похідні ізоніазиду виявили активність як по відношен-

Таблиця

QSAR прогноз та антимікобактеріальна активність похідних ізоніазиду

Сполука	Чинна концентрація сполуки, М	Прогноз інгібіторної активності, $\lg(\text{MIC})$	Чутливість досліджених штамів <i>M. tuberculosis</i> до дії сполук	
			H37Rv	HR
1	5·10 <sup>-4</sup> 5·10 <sup>-5</sup>	-6,33	Ч Ч	Ч Ч*
2	5·10 <sup>-4</sup> 5·10 <sup>-5</sup>	-6,41	Ч Ч	Ч Ч
3	5·10 <sup>-4</sup> 5·10 <sup>-5</sup>	-6,38	Ч Ч	Ч Ч*
4	5·10 <sup>-4</sup> 5·10 <sup>-5</sup>	-6,57	Ч Ч	Ч Ч*
5	5·10 <sup>-4</sup> 5·10 <sup>-5</sup>	-6,38	Ч Ч	Р Р
6	5·10 <sup>-4</sup> 5·10 <sup>-5</sup>	-6,24	Ч Ч	Р Р
7	5·10 <sup>-4</sup> 5·10 <sup>-5</sup>	-6,32	Ч Ч	Р Р

Примітка: Ч – культура чутлива; Ч\* – культура частково чутлива; Р – культура резистентна.

ню до «класичного» штаму (H37Rv), так і по відношенню до мультирезистентного штаму *M. tuberculosis* (HR). Зокрема, високу активність продемонструвала сполука **2**. У чинних концентраціях  $5 \cdot 10^{-4}$  та  $5 \cdot 10^{-5}$  М сполука **2** інгібувала ріст не лише чутливого, а й мультирезистентного штаму мікобактеріальної культури. Сполуки **1**, **3** та **4** у концентрації  $5 \cdot 10^{-4}$  М також пригнічували ріст штаму HR *M. tuberculosis*. При зниженні їх концентрації до  $5 \cdot 10^{-5}$  М активність сполук частково зменшувалася. Всі досліджені сполуки пригнічували ріст мікобактеріальної культури штаму H37Rv.

Отримані результати біологічного дослідження антимікобактеріальної активності синтезованих похідних ізоніазиду підтвердили прогноз активності, отриманий за допомогою QSAR моделі (таблиця).

За результатами QSAR моделювання та біологічного тестування синтезованих похідних ізоніазиду визначено «сполуку-лідера» (**2**) – N<sup>1</sup>-(3-нітрофенілметиліден)піридин-4-карбогідрозид, що виявила активність проти мультирезистентного штаму (HR) *M. tuberculosis*.

#### Література

1. Petrenko V. M. *Ukrayns'kyj Pul'monologichnyj zhurnal – Ukrainian Pulmonology Journal*, 2007, No.3, pp.35-39.
2. World Health Organization. *Global Tuberculosis Control: WHO Report 2012*, Geneva: World Health Organization, WHO/CDS/CPC/TB/99.259.
3. Panin I. V., Dobin V. L., Kochetkova G. V., Zamurueva E. V. *Mezhdisciplinarnye aspektydifferencial'noj diagnostiki s lechenija bol'nyh tuberculezom*, 2012, pp.54-55.
4. Cubillos-Ruiz A., Morales J., Zambrano M. M. *Bio. Med. Central. Research Notes*, 2008, doi:10.1186/1756-0500-1-110.
5. Levyc'ka N. A., Bajora Y. I., Nikolaevs'kyj V. V., Asmolov O. K. *Ukrayns'kyj Pul'monologichnyj zhurnal – Ukrainian Pulmonology Journal*, 2003, No.4, pp.17-19.
6. Ostroverha Y. A., Berenazhna L. V., Koval' J. B., Lozyns'ka H. R., Romanec' O. M. *Profilaktyka tuberkul'ozu. Metodichnyj posibnyk. L'viv*, 2012, p.168.
7. Strachunskij L. S., Belousov Y. B., Kozlov C. N. *Prakticheskoe rukovodstvo po nfekcionnoj himioterapii*. Smolensk, 2002, p.586.
8. Kovalishyn V., Kopernyk I., Chumachenko S., Shablykin O., Kondratyuk K., Pil'o S., Prokopenko V., Brovarets V., Metelytsia L. *Computational Biology and Bioinformatics*, 2014, Vol. 2, No.2, pp.25-32.
9. Kovalishyn V., De Sousa J. A., Ventura C., Leitao R. E., Martins F. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2011, Vol. 107, pp.69-74.
10. <https://www.chemaxon.com/>, (accessed in January, 2014).
11. [http://www.taletе.mi.it/products/dragon\\_description.htm](http://www.taletе.mi.it/products/dragon_description.htm) (accessed in March 2014).
12. Tetko I. V. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* Vol., 2002, No.42, pp.717-728.
13. Kovalishyn V., Tanchuk V., Charochkina L., Semenuta I., Prokopenko V. *Journal of Molecular Graphics and Modeling*, 2012, Vol. 32, pp.32-38.
14. Tetko I. V., Villa A. E. P. *Neural Networks*, 1997, No.10, pp.1361-1374.
15. Cramer R. D., Patterson D. E., Bunce J. D. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, Vol. 110, No.18, pp.5959-5967.
16. Tropsha A. *Mol. Inf.*, 2010, No.29, pp.476-488.
17. Tetko I. V., Villa A. E. P., Aksenova T. I. et al. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1998, Vol. 38, pp.676-684.
18. Kovalishyn V., Tetko I. V., Luik A. I., Kholodovych V. V., Villa A. E. P., Livingstone D. J. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, 1998, No.38, pp.651-659.
19. Lo Monte F., Kramer T., Gu J., Brodrecht M., Pilakowski J., Fuertes A., Dominguez J.M., Plotkin B., Eldar-Finkelmann H., Schmidt B. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, Vol. 61, pp.26-40.
20. Rao V. S., Chandra Sekhar K. V. G. *Synthetic Communications*, 2004, Vol. 34, No.12, pp.2153-2157.
21. Martins F., Santos S., Ventura C., Elvas-Leitao R., Santos L., Vitorino S., Reis M., Miranda V., Correia H., Aires-De-Sousa J., Kovalishyn V., Latino D., Ramos J., Viveiros M. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, Vol. 81, pp.119-138.
22. Sah, Peoples. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 1954, Vol. 43, pp.513-514.
23. Todoriko L. D., Eremenchuk I. V., Chornous V. O., Grozav A. M. *Pul'monologichnyj zhurnal – Ukrainian Pulmonology Journal*, 2012, No.1, pp.8-12.
24. Rafiq Y., Jabeen K., Hasan R. *PLOS ONE Journal Information*, 2012, doi:10.1371/journal.pone.0050551, <http://www.plosone.org/>

Надійшла до редакції 26.12.2014 р.

Хоча гідрозид ізонікотинової кислоти широко використовують для лікування туберкульозу, у 70% випадків до нього швидко формується резистентність [24]. Тому подальше використання запропонованої QSAR моделі антимікобактеріальної активності є актуальним та перспективним підходом для пошуку нових потенціальних протитуберкульозних засобів серед похідних ізоніазиду.

#### Висновки

Проведений QSAR аналіз дозволив з високою точністю відібрати 7 сполук серед похідних ізоніазиду з найвищим прогнозованим рівнем антимікобактеріальної активності для цілеспрямованого синтезу та біологічної оцінки. Всі синтезовані сполуки, як і передбачалось, виявили високу протитуберкульозну активність. Ідентифікована «сполука-лідера» – N<sup>1</sup>-(3-нітрофенілметиліден)піридин-4-карбогідрозид з високою активністю проти мультирезистентного штаму (HR) *M. tuberculosis* є оригінальним об'єктом для поглиблених досліджень як потенційний антимікобактеріальний агент.