

**ADENOZYNO-5'-O-(N-ACYLOSULFAMOILOWE)
POCHODNE JAKO POTENCJALNE LEKI
PRZECIWGRUŻLICZE**

**5'-O-[N-(ACYL)SULFAMOYL]ADENOSINE
DERIVATIVES AS POTENTIAL ANTITUBERCULOSIS
DRUGS**

Katarzyna Kulik^{1*}, Janina Baraniak²

¹ *Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk,
Zakład Chemii Bioorganicznej
ul. Sienkiewicza 112, 90-262 Łódź*

² *Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Instytut Chemii i Ochrony Środowiska,
Akademia im. Jana Długosza,
Al. Armii Krajowej 13/15, 42-200 Częstochowa
e-mail: kpieta@cbmm.lodz.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Projektowanie nowych leków przeciwgruźliczych ukierunkowane na mykobaktyny
2. Mimetyki acyloadenyłanu
 - 2.1. Synteza analogów adenozyiny modyfikowanych w pozycji 5' grupą aminoacylosulfamoilową
3. Badanie zależności pomiędzy aktywnością a modyfikacją w obrębie domeny cukrowej, aryłowej oraz nukleozasadowej
4. Synteza konformacyjnie usztywnionych pochodnych Sal-AMS
5. Analogi mające na celu polepszenie parametrów farmakokinetycznych Sal-AMS

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr Katarzyna Kulik ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2005 roku i w tym samym roku rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi. Stopień naukowy doktora uzyskała w 2013 roku. Jej zainteresowania naukowe dotyczą głównie projektowania, syntezy i badanie wybranych właściwości biologicznych modyfikowanych nukleozydów o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym i przeciwwirusowym.

Dr hab. Janina Baraniak po ukończeniu studiów na Wydziale Chemii Politechniki Łódzkiej rozpoczęła pracę w CBMM PAN w Łodzi pod kierunkiem Prof. Wojciecha Steca, gdzie w 1986 roku uzyskała stopień naukowy doktora a w 2005 roku stopień doktora habilitowanego. Głównym przedmiotem zainteresowań naukowych jest chemia modyfikowanych nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów. Prowadzone badania są skoncentrowane nad syntezą związków o potencjalnych właściwościach terapeutycznych jak i istotnym znaczeniu poznawczym nakierowanym na badania mechanistyczne procesów biochemicznych. Jest promotorem dwóch prac doktorskich i współautorką 68 publikacji. Od 2006 roku pracuje w Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*), the etiological agent of tuberculosis (TB), is the leading bacterial cause of infectious disease mortality. The current WHO-approved treatment for TB involves a three- or four-drug regimen comprising isoniazid, rifampin, pyrazinamide, and/or ethambutol for a minimum of 6 months. While these first-line agents remain useful in treating susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains, the emergence of multidrug resistant tuberculosis demands the development of new drugs [1].

Iron acquisition is an essential process for *M. tuberculosis* as well as almost all other microorganisms. However, this essential micronutrient is highly sequestered in a mammalian host. In response to iron starvation, *Mtb* produces small-molecule iron chelators, a pair of related peptidic siderophores known as mycobactin and carboxymycobactins that vary by the appended lipid residue termed siderophores [4, 5, 7, 8]. Because mycobactins are critical for growth and virulence of *M. tuberculosis*, they have emerged as attractive targets for the development of anti-TB agents [4].

Biosynthesis of mycobactin is initiated by the aryl acid adenylation enzyme MbtA which activates salicylic acid forming an acyladenylate intermediate (Sal-AMP). MbtA is also responsible for loading the acyladenylate intermediate onto the thiolation domain of MbtB-SH – the enzyme taking part in the next step of biosynthesis process [10].

Given the documented importance of many siderophores for virulence and lack of human aryl acid adenylation enzymes homologues, several analogues possessing stable linkers as bioisosteres of the labile acyl phosphate function have been synthesized as the potent enzyme inhibitors [13]. The initial lead compound 5'-O-[N-(salicyl)sulfamoyl]adenosine (Sal-AMS) has emerged as a promising inhibitor of MbtA and was shown to possess promising whole-cell activity toward *M. tuberculosis*.

Keywords: 5-O-[N-(acyl)sulfamoyl]adenosine derivatives, antituberculosis drugs, *Mycobacterium tuberculosis*, acyl adenylates

Słowa kluczowe: adenozyjno-5'-O-(N-acylosulfamoilowe) pochodne, leki przeciwgruźlicze, prątek gruźlicy, acyloadenyłany

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Boc	– grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
CBr ₄	– tetrabromometan
CDI	– 1,1'-karbonylodiimidazol
DBU	– 1,8-diazabicyklo[5.4.0]-undecen-7
DIAD	– azodikarboksylan diizopropylu
HIV	– ludzki wirus niedoboru odporności
Mtb	– prątek gruźlicy
NaN ₃	– azydek sodu
PPh ₃	– trifenylfosfina
TFA	– kwas trifluoroetanowy
Sal-AMS	– 5'-O-[<i>N</i> -(salicylo)sulfamoilo]adenozyna
MbtA	– enzym katalizujący reakcję adenylowania podczas biosyntezy mykobaktyn
MbtB-SH	– białko uczestniczące w biosyntezie mykobaktyn

WPROWADZENIE

Gruźlica będąca chorobą zakaźną jest wywołana przez prątką gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*), który występuje zarówno w formie utajonej, jak i aktywnej. Utajone bakterie mogą trwać w ustroju nawet przez lata, nigdy nie namnażając się i nie powodując choroby. Na aktywną postać choroby zapadają najczęściej osoby z osłabionym układem odpornościowym.

Mtb atakuje człowieka już od ponad 500 tys. lat i z powodu tej choroby zmarło wielu wybitnych ludzi (np. Fryderyk Chopin), gdyż dopiero odkrycie w 1943 roku streptomycyny stanowiło przełom w walce z tą chorobą. Jakkolwiek streptomycyna miała wiele działań niepożądanych to okazała się pierwszym skutecznym lekiem na gruźlicę. Następnie w połowie ubiegłego wieku opracowano kolejne środki przeciwpłatkowe, które kompensowały wady streptomycyny. Zalicza się do nich leki bakteriobójcze i wyjąławiające (izoniazyd, rifampicyna, pirazynamid, streptomycyna) oraz leki bakteriostatyczne (kwas *p*-aminosalicylowy, cykloseryna). Choć stwarza to możliwość dużej kombinacji w leczeniu wielolekowym, to nie jest równoznaczne z dowolnym zestawem leków [1]. Stosowanie tych leków sprawiło, że na początku lat siedemdziesiątych XX wieku wielu ekspertów uznało, że gruźlica została prawie całkowicie wyparta. Tymczasem obecnie prątek gruźlicy jest wśród czynników zakaźnych drugim po HIV najgroźniejszym zabójcą uśmiercającym rocznie ponad 2 mln osób [2]. Zresztą zakażenie wirusem HIV zwiększa podatność na gruźlicę a w przypadku osób z utajoną formą gruźlicy ryzyko rozwinięcia się aktywnej postaci choroby wzrasta nawet 50 krotnie.

Właściwości biologiczne prątką gruźlicy powodują, że w odróżnieniu od wielu innych chorób zakaźnych gruźlica musi być leczona kilkoma lekami jednocześnie, na które prątki danego chorego są wrażliwe, i dostatecznie długo. Zbyt krótkie leczenie kilkoma, nawet najlepszymi lekami, powoduje ryzyko nawrotu choroby. Ponadto, chociaż dostępność dość dużej liczby leków stwarza możliwość dużej kombinacji w leczeniu wielolekowym, to nie jest równoznaczne z dowolnym zestawem leków.

Opracowane w latach sześćdziesiątych schematy terapeutyczne są skuteczne na zwykłe prątki jeżeli terapia jest kontynuowana przez okres 6–9 miesięcy [1]. Natomiast przedwczesne zakończenie leczenia skutkuje pojawieniem się szczepów opornych na antybiotyki. Oporność szczepów prątką na dwa z czterech leków pierwszego rzutu – izoniazyd i rymfapicynę – odnotowuje się w przypadku gruźlicy wielolekoopornej. Te przypadki gruźlicy są zwykle uleczalne, ale wymagają zastosowania preparatów drugiego rzutu, które są kosztowne i mają poważne działania niepożądane.

Niestety ostatnio pojawiły się hiperlekooporne szczepy prątków gruźlicy, niewrażliwe na niemal wszystkie znane leki przeciwpłatkowe. Do ich ewolucji i rozprzestrzeniania może dochodzić wtedy, gdy w leczeniu gruźlicy należałoby stosować leki drugiego rzutu. Biorąc pod uwagę, że większość tego typu zdarzeń dotyczy krajów Trzeciego Świata drogę terapię są najczęściej nie do zaakceptowania. Według

danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2008 roku gruźlicę hiperlekooporną odnotowano w 49 państwach.

Upowszechnienie się międzynarodowych podróży sprawiło, że gruźlica ponownie stanowi ogromny ogólnoswiatowy problem zdrowotny zarówno w krajach afrykańskich jak i wysoko rozwiniętych i w rzeczywistości ludzkość stanęła u progu największej epidemii.

Jakkolwiek modyfikacja istniejących leków w celu polepszenia ich parametrów terapeutycznych może stanowić istotne źródło nowych terapeutyków to w odniesieniu do szczepów opornych na niemodyfikowany lek istnieje zapotrzebowanie na leki, które będą inhibitorami nowych miejsc (ang. *target*) terapeutycznych. Tego typu podejście w projektowaniu leków spotyka się z coraz większym zainteresowaniem (ang. *target-based approach*) [3]. Kilka obiecujących specyfików ukierunkowanych na hamowanie syntezy ściany komórkowej bakterii, hamowanie replikacji DNA i syntezy białek znajduje się obecnie w różnych fazach badań klinicznych.

W projektowaniu nowych leków przeciwgruźliczych szczególnie interesujące podejście dotyczy inhibicji syntezy niskocząsteczkowych chelatorów żelaza, tzw. sideroforów [4].

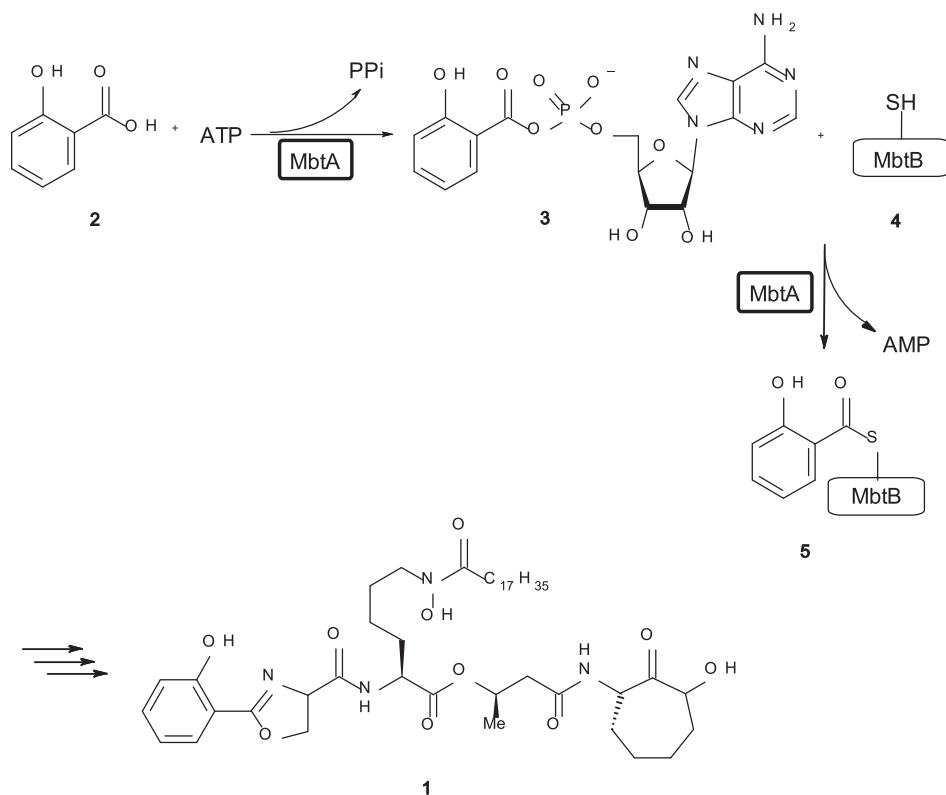
1. PROJEKTOWANIE NOWYCH LEKÓW PRZECIWGRUŻLICZYCH UKIERUNKOWANE NA MYKOBAKTYNY

Mycobacterium tuberculosis tak jak inne patogeny wymaga obecności jonów żelaza między innymi do syntezy niektórych enzymów [5]. Jednakże w organizmie człowieka żelazo jest trudno dostępne, gdyż w układzie krwionośnym ssaków glikoproteina gospodarza o właściwościach chelatujących żelazo tzw. transferyna wiąże żelazo i przekazuje je do komórek.

Stąd też stężenie wolnych jonów żelaza w surowicy krwi oraz w płynach organizmu jest zbyt niskie, aby wspomóc wzrost bakterii i ich kolonizację. Aby zaspokoić zapotrzebowanie na ten pierwiastek wiele patogenów wytworzyło mechanizmy obejmujące syntezę i wydzielanie małych cząsteczkowych chelatorów żelaza zwanych sideroforami, których zadaniem jest wyciąganie żelaza z białek gospodarza [6]. *Mycobacterium tuberculosis* do wzrostu komórkowego wykorzystuje dwie klasy strukturalnie podobnych peptydowych sideroforów: mykobaktyny i karboksymykobaktyny, które różnią się wyłącznie resztą lipidową [7]. Absolutne wymagania patogenów dotyczące żelaza doprowadziły do badania możliwości specyficznego hamowania biosyntezy mykobaktyn, czego konsekwencją byłoby zahamowanie wzrostu i wirulencji *Mycobacterium tuberculosis*.

Pierwsze wzmianki o tym, iż na mykobaktyny może być ukierunkowane projektowanie potencjalnych chemoterapeutyków pochodzą z 1945 roku. Wykazano wówczas, iż związki chemiczne będące analogami mykobaktyn mogą pełnić rolę ich antagonistów [8].

Biosynteza mykobaktyny (1) jest inicjowana przez MbtA, enzym katalizujący adenylowanie kwasu salicylowego [9]. W pierwszym etapie karboksylowy atom tlenu kwasu salicylowego (2) atakuje α atom fosforu w cząsteczce ATP prowadząc do utworzenia acyloadenyłanu 3 i pirofosforanu (PPi; Schemat 1). Następnie MbtA również katalizuje przyłączenie związku 3 do białka MbtB-SH (4), w wyniku czego tworzy się związek pośredni 5, który stanowi substrat w wieloetapowym procesie syntezy mykobaktyny (1) [10].

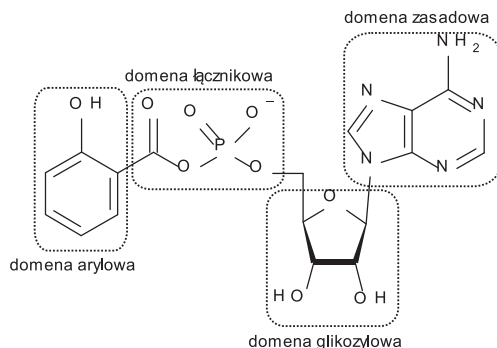


Schemat 1. Biosynteza mykobaktyn - mechanizm reakcji enzymatycznej katalizowanej przez MbtA
 Scheme 1. Biosynthesis of the mycobactins – enzyme reaction mechanism catalyzed by MbtA

Najintensywniej badanym etapem biosyntezy mykobaktyn jest mechanizm reakcji katalizowanej przez MbtA. Enzym ten nie posiada ssaczego homologu i stąd też stanowi idealny obiekt do projektowania potencjalnych inhibitorów. Analogi nukleozydów projektowane w celu hamowania aktywności tego enzymu powinny być stabilnymi związkami pośrednimi naśladującymi strukturalnie acyloadenyłan.

2. MIMETYKI ACYLOADENYLANU

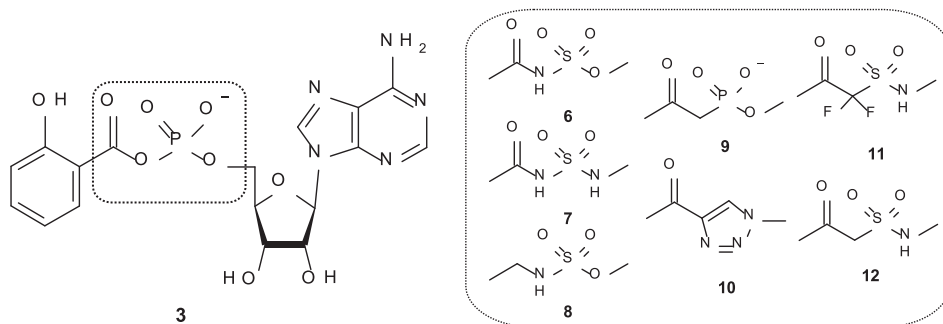
Intensywne badania dotyczące poszukiwania efektywnych inhibitorów MbtA były prowadzone niezależnie w trzech laboratoriach [11–13], przy czym szczególne badanie zależności pomiędzy budową a aktywnością (ang. *Structure Activity Relationships*, SAR) miały miejsce w zespole Aldricha [13]. W cząsteczce acyloadenylnu **3** wyróżniono cztery domeny: arylową, łącznikową, glikozylową oraz domenę nukleozasadową (Rys. 1). Do każdej z tych domen były wprowadzane zmiany strukturalne.



Rysunek 1. Poddawane modyfikacji domeny acyloadenylnu **3**

Figure 1. Modified acyl adenylate **3** domains

Region łącznikowy stanowił miejsce największej liczby modyfikacji. Zsyntezowano serię związków (Rys. 2), w których labilny acylofosforanowy łącznik zastąpiono takimi ugrupowaniami jak: acylosulfamoidowe (**6**), acylosulfamidowe (**7**), sulfaminowe (**8**), α -ketofosfonianowe (**9**) oraz acylotriazolowe (**10**) [13]. Przesłankę do wprowadzenia w obrębie cząsteczki potencjalnego inhibitora ugrupowania sulfonamidowego stanowił szeroki potencjał terapeutyczny sulfonamidów obejmujący leki przeciwzakazne, przeciwcukrzycowe oraz moczopędne.



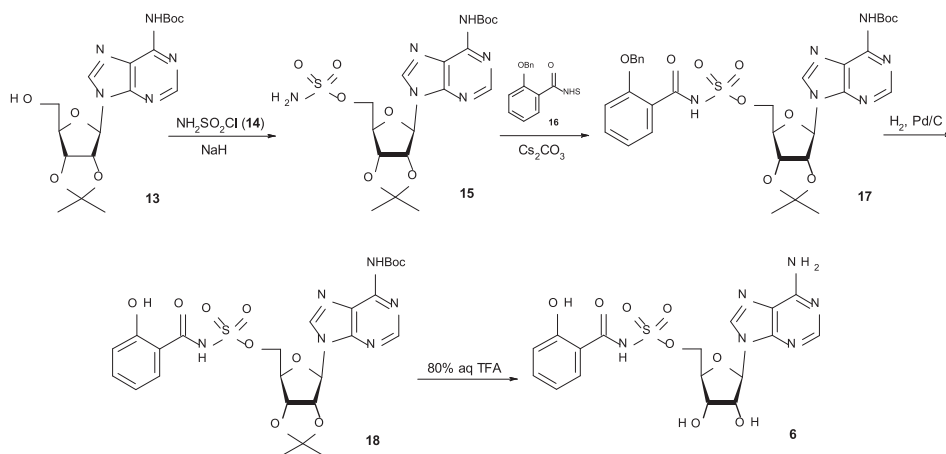
Rysunek 2. Struktura inhibitorów Mbt modyfikowanych w obrębie domeny łącznikowej

Figure 2. Structure of Mbt inhibitors with linker modifications

Wśród zsyntezowanych związków pochodne kwasu salicylowego posiadające łącznik acylosulfamoilowy (**6**) oraz acylosulfamidowy (**7**) okazały się najsilniejszymi inhibitorami MbtA wykazując aktywność przeciwgruźliczą na poziomie submikromolarnym wobec wszystkich komórek *M. tuberculosis*, co jest porównywalne z aktywnością izoniazydu stosowanego obecnie w terapii gruźlicy.

2.1. SYNTEZA ANALOGÓW ADENOZYNY MODYFIKOWANYCH W POZYCJI 5' GRUPĄ AMINOACYLOSULFAMOILOWĄ

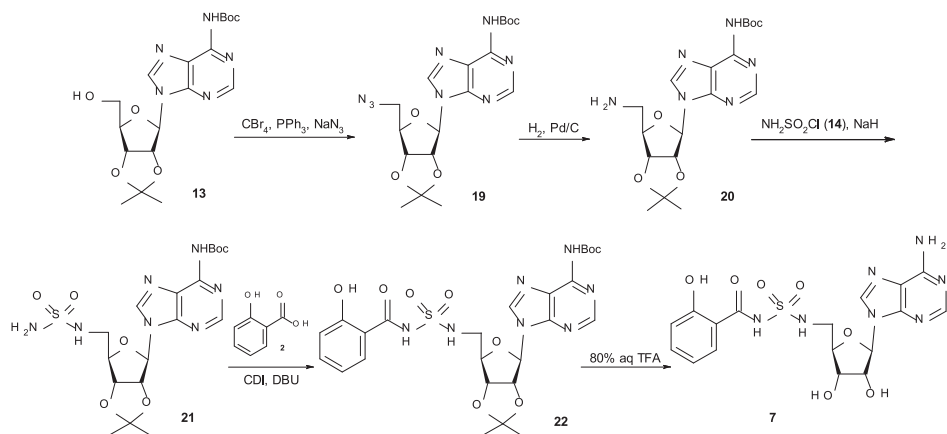
Pierwszy etap syntezy związku **6** polegał na reakcji chlorku sulfamoilowego (**14**) z *N*⁶-Boc-2',3'-*O*-izopropylidenoadenozyną (**13**, Schemat 2). Otrzymana w ten sposób 5'-sulfamoilowana pochodna **15** pod działaniem estru *N*-hydroksybensztynowego kwasu *O*-benzylu-salicylowego (**16**) wobec węgłanu cezu została przekształcona w związek **17**. Następnie usunięcie grupy benzylowej (katalityczne uwodornienie, związek **18**) i *t*-butylokarbaminianowej oraz izopropylidenujowej za pomocą kwasu trifluorooctowego dało sulfamoilową pochodną adenozyiny (**6**, Sal-AMS).



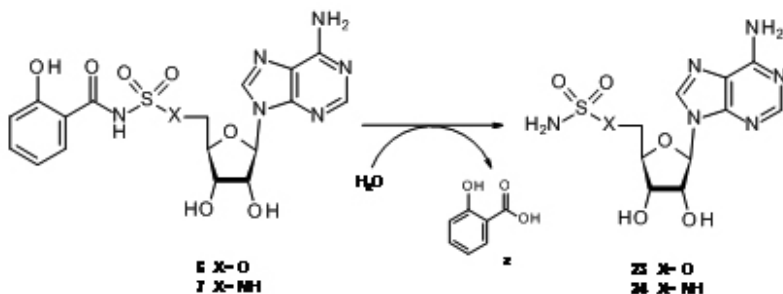
Schemat 2. Synteza 5'-*O*-sulfamoilowej pochodnej adenozyiny (**6**, Sal-AMS)

Scheme 2. Synthesis of 5'-*O*-sulfamoyl adenosine derivative (**6**, Sal-AMS)

W syntezie acylosulfamidowej pochodnej adenozyiny (**7**) jako substrat wykorzystano również *N*⁶-Boc-2',3'-*O*-izopropylidenoadenozynę (**13**), która w warunkach reakcji Appella (Ph_3P , CBr_4 , NaN_3) została przekształcona w odpowiednią azydo pochodną **19** (Schemat 3). Katalityczne uwodornienie **19** prowadziło do aminy **20** a następcze jej sulfamoilowanie dało sulfamid **21**, który z kolei w reakcji z kwasem salicylowym wobec CDI i DBU został przekształcony w związek **22**. Przeprowadzone finalnie usunięcie grup ochronnych z **22** za pomocą TFA dało pożądaną pochodną **7**.

Schemat 3. Synteza 5'-*O*-acylosulfamidowej pochodnej adenozy (7)Scheme 3. Synthesis of 5'-*O*-acylsulfamide adenosine derivative (7)

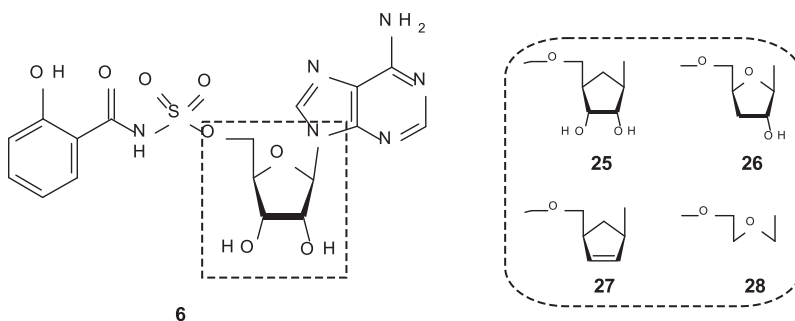
Jakkolwiek aktywność pochodnych **6** i **7** potwierdzała zaproponowaną przez Aldricha koncepcję projektowania potencjalnych inhibitorów MbtA to hydroliza tych związków mogła prowadzić do uwalniania 5'-*O*-(sulfamoilo)adenozyny (**23**) bądź jej aminowej pochodnej **24**, związków posiadających silne właściwości cytotoksyczne (Schemat 4) [14]. Ponadto analogi **6** i **7** w fizjologicznym pH występują w formie zjonizowanej co wyraźnie zmniejsza ich biodostępność przy podaniu doustnym. Aldrich zsyntezował związki, w których centralny atom azotu łącznika acylosulfamidowego zastąpiono atomem węgla (**11**, **12**, Rys. 2) [15]. Jednakże badanie właściwości inhibitorowych otrzymanych β -ketosulfonamidów **11** i **12** wobec MbtA wykazały, iż są one mniej aktywne w porównaniu do związków **6** i **7**.

Schemat 4. Hydroliza 5'-*O*-sulfamoilowej i 5'-*O*-acylosulfamidowej pochodnej adenozy (6, 7)Scheme 4. Hydrolysis of 5'-*O*-sulfamoyl and 5'-*O*-acylsulfamide adenosine derivatives (6, 7)

3. BADANIE ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY AKTYWNOŚCIĄ A MODYFIKACJĄ W OBRĘBIE DOMENY ARYLOWEJ, CUKROWEJ ORAZ NUKLEOZASADOWEJ

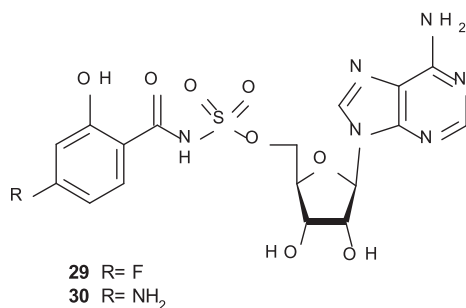
5'-O-[N-(salicylo)sulfamoilo]adenozyna (**6**, Sal-AMS) posłużyła Aldrichowi jako struktura wiodąca w badaniu zależności pomiędzy aktywnością a modyfikacją w obrębie domeny cukrowej, arylowej oraz nukleozasadowej. Badanie aktywności związków modyfikowanych w pierścieniu cukrowym wykazało, iż obecność atomu tlenu w pozycji 4' (**25**, zastąpienie atomu tlenu grupą metylenową) oraz 3' (**26**, zastąpienie grupy hydroksylowej atomem wodoru) pierścienia rybofuranozy nie jest niezbędnym elementem struktury inhibitora, podczas gdy brak tlenu w pozycji 2' oraz modyfikacje zmniejszające (**27**) lub zwiększające (**28**) elastyczność cząsteczki wpływają negatywnie na aktywność związku (Rys. 3) [16]. Karbocykliczny analog **25**, okazał się wyjątkowo aktywnym związkiem. Autorzy tłumaczą ten fakt wzrostem trwałości spowodowanym wyeliminowaniem mniej stabilnego chemicznie i enzymatycznie oraz bardziej hydrofilowego wiązania glikozydowego.

Natomiast modyfikacje w obrębie reszty arylowej inhibitora wykazały, iż obecność grupy benzoilowej jest niezbędna dla aktywności tych związków [17].



Rysunek 3. Struktura inhibitorów *Mbt* modyfikowanych w obrębie domeny glikozydowej
Figure 3. Structure of *Mbt* inhibitors with glycosyl modifications

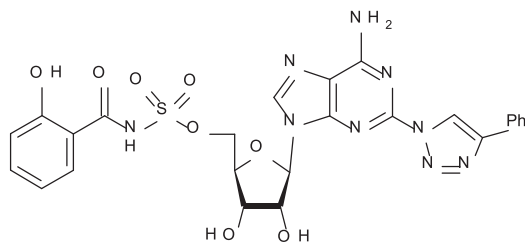
Zsyntezowano również serię związków zawierających różne podstawniki w pierścieniu aromatycznym fragmentu salicylowego oraz analogi, w których grupa hydroksylowa w pozycji *ortho* została zastąpiona innymi podstawnikami, a także związki, w których fragment salicylowy zastąpiono innymi grupami heterocyklicznymi, cykloalkilowymi, alkilowymi oraz aminoacylowymi.



Rysunek 4. Struktura inhibitorów *Mbt* modyfikowanych w obrębie domeny arylovej
 Figure 4. Structure of *Mbt* inhibitors with aryl modifications

Badania właściwości inhibitorowych tych związków wykazały, iż obecność funkcji hydroksylowej oraz atomu fluoru w pozycji C-2 pierścienia aromatycznego bardzo korzystnie wpływa na aktywność zaś obecność małych podstawników w pozycji C-4 nie obniża aktywności w porównaniu z niemodyfikowanymi acyloadenylianami. W otrzymanej serii związków pochodna zawierająca resztę 4-fluorosalicylową (**29**, Rys. 4) okazała się być najaktywniejszym związkiem natomiast analog *p*-aminosalicylowy **30** był wyjątkowo selektywnym inhibitorem, o aktywności 16-krotnie większej w warunkach niskiego stężenia jonów żelaza w stosunku do aktywności obserwowanej przy wysokim stężeniu tych jonów. Ma to istotne znaczenie, gdyż synteza sideroforów zachodzi według dwóch alternatywnych procesów biochemicznych zależnych od stężenia jonów żelaza. Obydwa te procesy przebiegają z udziałem pochodnych o strukturze acyloadenylianów, stąd też selektywność inhibitora jest istotnym elementem oceny aktywności związków [18].

W przypadku modyfikacji nukleozasady brak azotu w pozycji N-1 lub N-3 w obrębie pierścienia purynowego nie miał wpływu na aktywność związków, podczas gdy usunięcie azotu N-7 prowadziło do wyraźnego zmniejszenia właściwości inhibitorowych [19]. Wbrew oczekiwaniom duże przestrzennie podstawniki w pozycji C-2 oraz małe alkilowe grupy dołączone do azotu w pozycji N-6 puryny, w przeciwieństwie do modyfikacji w miejscu C-8, nie zmniejszały aktywności otrzymanych pochodnych acyloadenylianowych. Przeprowadzone przez grupę Aldricha symulacje dynamiki molekularnej enzymu MbtA odpowiedzialnego za adenylowanie kwasu salicylowego wykazały znaczną plastyczność kieszeni wiążącej nukleozyd pozwalając tym samym na wiązanie pochodnych Sal-AMS, których pozycję C-2 puryny modyfikowano dużymi podstawnikami takimi jak 1,2,3-triazole podstawione w pozycji 4 [20]. Pochodna fenylotriazolowa **31** (Rys. 5) okazała się najlepszym kandydatem na lek przeciwgruźliczy i charakteryzowała się najkorzystniejszymi właściwościami inhibitorowymi, wysoką selektywnością, brakiem cytotoksyczności oraz zwiększoną lipofilowością ułatwiającą wnikanie przez błony komórkowe.

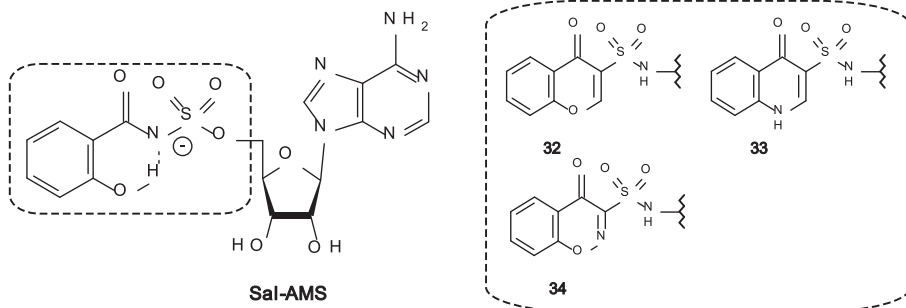


31

Rysunek 5. Struktura inhibitora Mbt modyfikowanego w obrębie domeny zasadowej grupą 1,3,2- triazolową
 Figure 5. Structure of Mbt inhibitors with nucleobase modifications by means of 1,3,2- triazole moiety

4. SYNTEZA KONFORMACYJNIE USZTYWNIONYCH POCHODNYCH SAL-AMS

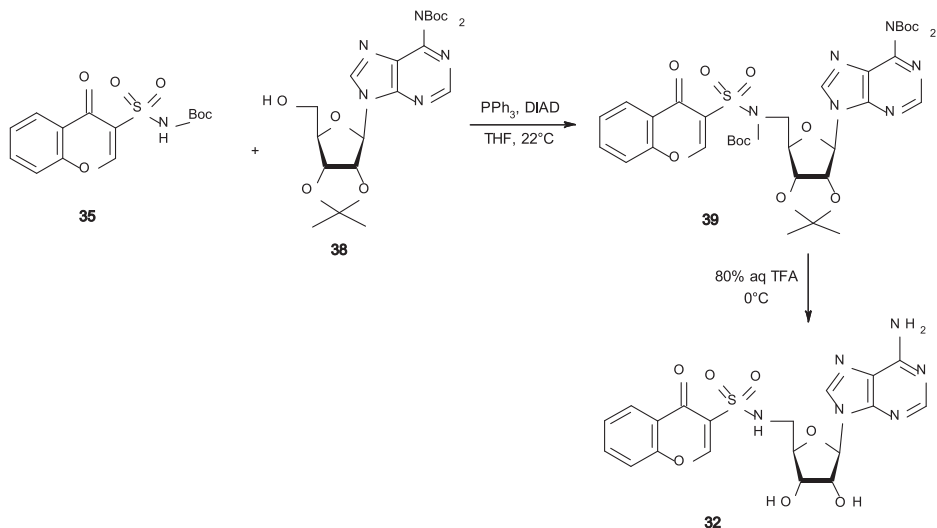
Jednakże wstępne badania farmakokinetyczne wykazały, że Sal-AMS i jego analogi charakteryzują się słabą biodostępnością przy podaniu doustnym [21]. Wobec danych literaturowych mówiących o tym, że biodostępność zwiększa się wraz z ograniczeniem rotacji wokół wiązań [22] w zespole Aldricha zsyntezowano konformacyjnie usztywnione analogi **32–34** (Rys. 6). Związki te mimikują hipotetyczną konformację Sal-AMS związanego z enzymem MbtA i powinny wykazywać większą biodostępność będącą skutkiem usunięcia dwóch wiązań i ujemnie zjonizowanego ugrupowania sulfaminianowego.



Rysunek 6. Konformacyjnie ograniczone analogi 5'-O-[N-(salicylo)sulfamoilo] adenozyzny (**32–34**)
 Figure 6. Conformationally constrained analogues of 5'-O-[N-(salicyl)sulfamoyl] adenosine (**32–34**)

Strategia syntezy tych związków polegała na kondensacji bicyklicznych-3-sulfonamidów (**35–37**) z N^6,N^6 -bis(*tert*-butoksykarbonylo)-2,3' izopropylidenoadenozyną (**38**) w warunkach reakcji Mitsunobu (PPh_3 , DIAD). Wprowadzenie na grupę egzaminową N-6 dwóch reszt *tert*-butoksykarbonylowych eliminowało konkurencyjną reakcję cyklizacji pomiędzy atomem N-3 puryny i rybozy C-5', gdyż protekcja N-6 grupy aminowej obniża nukleofilowość N-3 atomu.

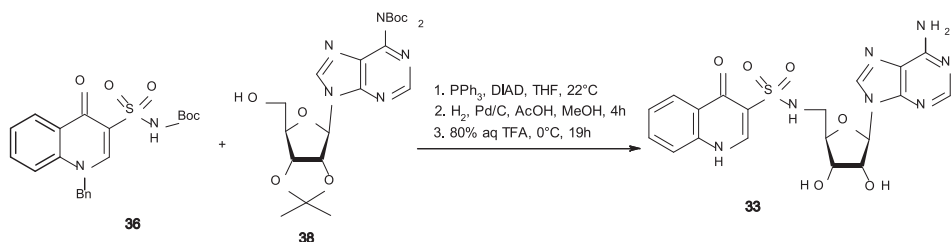
I tak w wyniku reakcji bicyklicznego sulfonamidu **35** z **38** (Schemat 5) otrzymano z wydajnością 80% związek **39**, który po potraktowaniu 80% kwasem TFA (usunięcie grup ochronnych) został przekształcony w pożądaną analog **32**.



Schemat 5. Synteza kromonowej pochodnej Sal-AMS (**32**)

Scheme 5. Synthesis of chromone derivative of Sal-AMS (**32**)

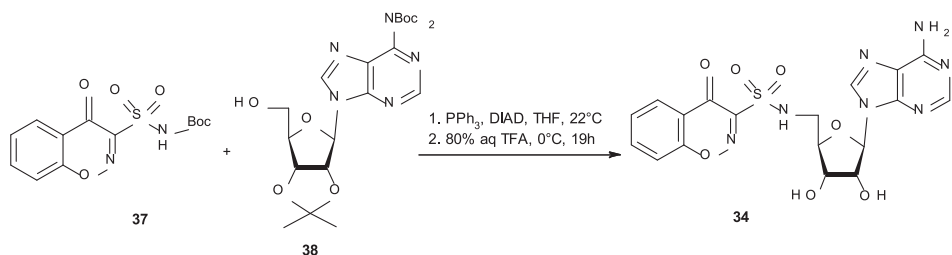
Przeprowadzona w analogiczny sposób reakcja sulfonamidu **36** z **38** prowadziła do pożądanego analogu **33** (Schemat 6) a reakcja pomiędzy sulfonamidem **37** i blokowaną adenozyzną **38** dawała analog **34** (Schemat 7).



Schemat 6. Synteza chinolonowej pochodnej Sal-AMS (**33**)

Scheme 6. Synthesis of quinolonone derivative of Sal-AMS (**33**)

Badanie powinowactwa związków **32–34** względem enzymu MbtA pokazało, że obecność ujemnego ładunku w związku **6** jest koniecznym warunkiem, gdyż analogi **32** i **34** nie posiadające w pierścieniu heterocyklicznym atomów ulegających jonizacji nie wiązały się z enzymem.



Schemat 7. Synteza benzoksazynowej pochodnej Sal-AMS (34)

Scheme 7. Synthesis of benzoxazinone derivative of Sal-AMS (34)

Natomiast dla związku **33** zawierającego w pozycji N-1 grupę NH to powinowactwo było 18-krotnie mniejsze niż dla Sal-AMS (**6**). Prawdopodobnie jest to generalna zależność wszystkich enzymów katalizujących reakcje adenylowania [15, 23]. Niestety związek **33** nie wykazywał żadnej aktywności inhibitorowej zarówno przy niskim stężeniu jonów żelaza jak i przy wysokim stężeniu tych jonów. Autorzy tłumaczą to zredukowaną akumulacją związku w komórkach.

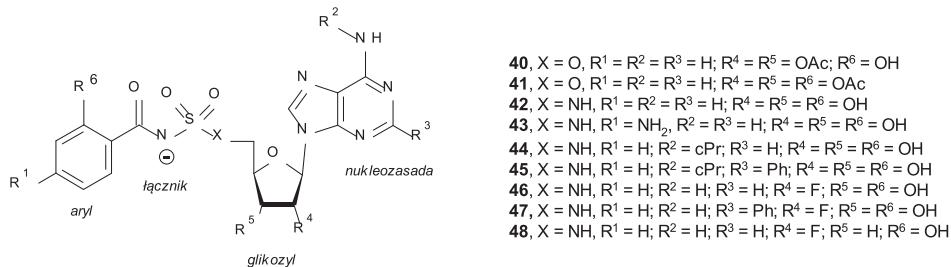
5. ANALOGI MAJĄCE NA CELU POLEPSZENIE PARAMETRÓW FARMAKOKINETYCZNYCH SAL-AMS (6)

Dalsze badania prowadzone w laboratorium Aldricha miały na celu poprawę parametrów farmakokinetycznych takich jak biodostępność, biologiczny okres półtrwania, zmiana stężenia w czasie, wchłanianie i eliminacja inhibitora Sal-AMS (**6**). W tym celu zsyntezowano analogi będące prolekami (**40–41**; Rys. 7), analogi zwiększające pKa reszty sulfaminianowej (**42–43**), analogi modulujące lipofilowość polarnego nukleozydu (**44–45**), analogi zawierające w reszcie nukleozydowej atomy fluoru (**46–48**).

Proleki **40–41** zawierające grupy acetylowe maskujące polarne grupy hydroksylowe w prototypowym inhibitorze **6** charakteryzowały się bardzo małą biodostępnością prawdopodobnie wskutek powolnej hydrolizy grup maskujących.

Wobec tego, że ładunek ujemny grupy sulfaminianowej jest warunkiem koniecznym aktywności tych związków a z drugiej strony ulegający jonizacji acylosulfonylowy łącznik potencjalnych inhibitorów może utrudniać ich przechodzenie przez błonę komórkową zespół Aldricha zsyntezował analogi **42–43** zwiększające pKa acylosulfonylowego atomu azotu. Analog **42** wykazywał tylko 3-krotnie lepszą biodostępność w porównaniu z **6**. Wprowadzenie w pozycję *para* reszty salicylowej grupy aminowej (**43**) prowadziło do znacznej utraty biodostępności. Ostatecznie Aldrich założył, że wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe tworzące się pomiędzy sulfonylowym atomem azotu i *orto*-fenolową grupą reszty salicylowej [25] częściowo obniża polarność poprzez delokalizację ładunku.

Również analogi **44–45** nie charakteryzowały się zadawalającymi parametrami farmakokinetycznymi. Natomiast analogi **46–48** zawierające atom fluoru przy C-2' atomie posiadały najkorzystniejsze parametry farmakokinetyczne, przede wszystkim zwiększał się okres półtrwania tych związków.



Rysunek 7. Struktura analogów mających na celu polepszenie parametrów farmakokinetycznych inhibitora Sal-AMS (**6**)

Figure 7. Structure of analogs designed to improve pharmacokinetic parameters of Sal-AMS (**6**) inhibitor

Atom fluoru jest często uważany jako izosteryczny w odniesieniu do atomu wodoru i w chemii nukleozydów fluoropochodne są od wielu lat syntezowanymi i badanymi związkami. Zastąpienie 2' lub 3' hydroksylowej grupy atomem fluoru powoduje niewielkie zmiany strukturalne ale znacznie zmienia stereoelektronowe własności cząsteczki cukru [26]. Te zmienione własności mogą kontrolować równowagę konformacyjną i reszta cukru może przyjąć konformację North (C3'-endo cukier) lub South (C2'-endo cukier) [27], mogą stabilizować wiązanie glikozydowe [28] jak również zwiększać lipofilowość związku [29].

Stąd też w zespole Aldricha zsyntezowano serię analogów Sal-AMS (**6**) systematycznie wprowadzając w pozycję przy C2' i C3' atomy fluoru [30]. Okazało się, że fluorowana cząsteczka cukru może przyjmować obydwie konformacje. Badanie aktywności fluorowanych pochodnych pokazało, że największą aktywność przeciwgruźliczą wykazuje związek **47**, który był 2-krotnie bardziej aktywny niż Sal-AMS (**6**). Jednakże w porównaniu do **6** nie następowała poprawa biodostępności. Stąd też zsyntezowano serię estrowych proleków **47**, wprowadzając na grupę 3'-hydroksylową łańcuch alkilowy zawierający od dwóch do dwunastu atomów węgla [31]. Jest to powszechnie stosowana strategią mającą na celu zwiększenie biodostępności po podaniu doustnym, polegająca na tym, że wszechobecne w organizmie esterazy hydrolizują ugrupowanie estrowe i uwalniają docelowy lek. Niestety żaden z otrzymanych proleków nie charakteryzował się lepszymi parametrami niż związek **47**.

PODSUMOWANIE

Najsilniejsze inhibitory MbtA spośród związków otrzymanych przez zespół Aldricha posiadały większą aktywność niż część leków obecnie stosowanych w leczeniu gruźlicy. Stąd też należy przypuszczać, że pochodne Sal-AMS mogą być szeroko wykorzystywane wobec patogenów syntezujących siderofory na drodze reakcji katalizowanej przez enzymy adenylationowe. Prawdopodobnie Mtb koduje przynajmniej 67 enzymów katalizujących proces adenylationa, które mogą stanowić potencjalne miejsce oddziaływania z syntezowanymi pochodnymi Sal-AMS. Dalsze badania w tym kierunku są nadal prowadzone w zespole Aldricha [31].

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] World Health Organization, *Tuberculosis handbook*, WHO: Geneva, 1998 (WHO/TB/98.253).
- [2] *Global Tuberculosis Report*, WHO: Geneva, 2014.
- [3] Y. Zhang, M. Amzel, *Current Drug Targets*, 2002, **3**, 131.
- [4] M. Luo, E.A. Fadeev, J.T. Groves, *Nature Chem. Biol.*, 2005, **1**, 149.
- [5] J.H. Crosa, C.T. Walsh, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002, **66**, 223.
- [6] M. Miethke, M.A. Marahiel, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2007, **71**, 413.
- [7] A. F.Vergne, A.J. Walz, M.J. Miller, *Nat. Prod. Rep.*, 2000, **17**, 99.
- [8] G.A. Snow, *Bacteriol. Rev.*, 1970, **34**, 99.
- [9] L.E.N. Quadri, J. Sello, T.A. Keating, P.H. Weinerb, C.T. Walsh, *Chem. Biol.*, 1998, **5**, 631.
- [10] S.S. Chavadi, K.L. Stirrett, U.R. Edupuganti, O. Vergnolle, G. Sadhanandan, E. Marchiano, C. Martin, W.G. Qiu, C.E. Soll, L.E. Quadri, *J. Bacteriol.*, 2011, **193**, 5905.
- [11] J.A. Ferreras, J.S. Ryu, F. Di Lello, D.S. Tan, L.E. Quadri, *Nat. Chem. Biol.*, 2005, **1**, 29.
- [12] M. Miethke, P. Bissere, C.L. Beckering, D. Vignard, J. Eustache, M.A. Marahiel, *FEBS*, 2006, **273**, 409.
- [13] R.V. Somu, H. Boshoff, C. Qiao, E.M. Bennett, C.E. Barry, C.C. Aldrich, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 31.
- [14] A. Bloch, C. Coutsogeorgopoulos, *Biochemistry*, 1971, **10**, 4394.
- [15] J. Vannada, E.M. Bennett, D. Wilson, H.I. Boshoff, C.E. Barry, C.C. Aldrich, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 4707.
- [16] R.V. Somu, D.J. Wilson, E.M. Bennett, H.I. Boshoff, L. Celia, B.J. Beck, C.E. Barry, C.C. Aldrich, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 7623.
- [17] Ch. Qiao, A. Gupte, H.I. Boshoff, D.J. Wilson, E.M. Bennett, R.V. Somu, C.E. Barry, C.C. Aldrich, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 6080.
- [18] J.A. Ferreras, J.S. Ryu, F. Di Lello, D.S. Tan, L.E. Quadri, *Nat. Chem. Biol.*, 2005, **1**, 29.
- [19] J. Neres, N.P. Labello, R.V. Somu, H.I. Boshoff, D.J. Wilson, J.Vannada, L. Chen, C.E. Barry, E.M. Bennett, C.C. Aldrich, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 5349.
- [20] A. Gupte, H.I. Boshoff, D.J. Wilson, J. Neres, N.P. Labello, R.V. Somu, Ch. Xing, C.E. Barry, C.C. Aldrich, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 7495.
- [21] C.A. Engelhart, C.C. Aldrich, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 7470.
- [22] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.-Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 2615.
- [23] M. Ikeuchi, M.E. Meyer, Y. Ding, J. Hiratake, N.G. Richards, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 6641.

- [24] K.M. Nelson, K. Viswanathan, S. Dawadi, B.P. Duckworth, H.I. Boshoff, C.E. Barry, C.C. Aldrich, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 5459.
- [25] N.P. Labello, E.M. Bennett, D.M. Ferguson, C.C. Aldrich, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 7154.
- [26] C. Thibaudeau, J. Plavec, J. Chattopadhyaya, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 4967.
- [27] J.J. Barchi, L.-S. Jeong, S.A. Siddiqui, V.E. Marquez, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1997, **34**, 11.
- [28] W. Zhou, G. Gumina, Y. Chong, J. Wang, R.F. Schinazi, C.K. Chu, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 3399.
- [29] J.C. Biffinger, H.W. Kim, S.G. DiMagno, *Chem. Bio. Chem.*, 2004, **5**, 622.
- [30] S. Dawadi, K. Viswanathan, H.I. Boshoff, C.E. Barry, C.C. Aldrich, *J. Org. Chem.*, 2015, **80**, 4835.
- [31] S. Dawadi, S. Kawamura, A. Rubenstein, R. Rimmel, C.C. Aldrich, *Bioorg. Med. Chem.*, 2016, **24**, 1314.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 czerwca 2016