

Фролов Никита Андреевич

«Синтез и антибактериальная активность биспиридиниевых солей на основе бифенила и дифенилового эфира»

Шифр специальности 1.4.3 Органическая химия

Химические науки

Шифр диссертационного совета 24.1.092.01

Федеральное государственное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук
119991, Москва, Ленинский проспект, 47

Тел.: (499) 137-13-79

E-mail: sci-secr@ioc.ac.ru

Дата размещения полного текста диссертации на сайте Института <http://zioc.ru/>
1 октября 2021 года

Дата приема к защите
4 октября 2021 года

Дата размещения автореферата на сайте ВАК <https://vak.minobrnauki.gov.ru>
7 октября 2021 года

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Н. Д. ЗЕЛИНСКОГО
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИОХ РАН)**



На правах рукописи

ФРОЛОВ НИКИТА АНДРЕЕВИЧ

**СИНТЕЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ
БИСПИРИДИНИЕВЫХ СОЛЕЙ НА ОСНОВЕ БИФЕНИЛА И
ДИФЕНИЛОВОГО ЭФИРА**

1.4.3 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в лаборатории химии углеводов и биоцидов им. акад. Н. К. Кочеткова №21 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Верещагин Анатолий Николаевич,
д.х.н., заведующий лабораторией химии углеводов и биоцидов им. акад. Н. К. Кочеткова №21 Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Коршун Владимир Аркадьевич,
д.х.н., заведующий лабораторией молекулярного дизайна и синтеза Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

Попков Сергей Владимирович,
к.х.н., доцент, заведующий кафедрой химии и технологии органического синтеза Российского химико-технологического университета имени Д. И. Менделеева

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН

Защита диссертации состоится «8» декабря 2021 г. в 12:30 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.092.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН по адресу: 119991 Москва, Ленинский проспект, 47.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН и на официальном сайте Института <http://zioc.ru>.

Автореферат разослан « » октября 2021 г.

Ваш отзыв в двух экземплярах, заверенный гербовой печатью, просим направлять по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 47, ученому секретарю Диссертационного совета ИОХ РАН.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
24.1.092.01 ИОХ РАН
доктор химических наук



Г. А. Газиева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Четвертичные аммониевые соли (ЧАС) являются одним из наиболее часто используемых классов дезинфицирующих средств, которые находят применение в больницах, для обработки воды, текстильной, лакокрасочной и пищевой промышленности, благодаря их относительно низкой токсичности для человека и животных и широкого спектра противомикробного действия. Среди них четвертичные соли пиридиния и биспиридиния представляют важную группу химических веществ, широко применяемых в качестве биоцидов и обладающих сильным разрушающим действием даже при очень низких концентрациях на широкий спектр грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов и некоторых вирусов. Данные соли могут применяться в медицинских целях при контакте с кожей человека (обработка кожи, ран, повязок, хирургических и зубоврачебных инструментов и пр.).

Современная пандемия COVID-19 увеличила спрос на дезинфицирующие средства, с целью сдерживания распространения инфекции. Однако, повсеместное использование антисептических средств может привести к развитию бактериальной резистентности, что ставит под угрозу их эффективность в будущем. Таким образом, создание новых высокоэффективных антисептиков и дезинфектантов, обладающих широким спектром противогрибкового, антибактериального и противовирусного действия при низкой токсичности и экономичности производства, является крайне актуальной задачей на текущий момент.

Диссертационная работа направлена на разработку и развитие методов синтеза новых типов биспиридиниевых солей (БПС), обладающих антибактериальной активностью, на основе которых впоследствии станет возможным расширить спектр медицинских препаратов отечественного производства.

Цель работы – разработка методов синтеза и получение нового класса БПС, содержащих новые типы двухвалентных нелинейных спейсеров на основе ароматических структур, и обладающих высокой антибактериальной и противогрибковой активностью.

В соответствии с поставленной целью в работе решались следующие задачи:

- разработка методов синтеза целевых БПС из доступных «бивалентных» ароматических структур (бифенил, дифениловый эфир, терфенил и производные фенола);
- изучение физико-химических свойств полученных соединений с использованием спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии, ИК-спектроскопии, хроматографического анализа и т. д.;
- проведение микробиологического анализа полученных веществ на грамположительных и грамотрицательных патогенных бактериях (в том числе на мультирезистентных клинических штаммах и бактериальных биопленках) и грибах, изучение зависимости активности от структуры БПС, выявление соединений-лидеров и составление лекарственных композиций на их основе.

Научная новизна и практическая значимость работы заключаются в следующем:

- Разработаны подходы к синтезу БПС с нелинейными спейсерами на основе «бивалентных» ароматических систем (бифенила, дифенилового эфира, терфенила,

диоксибензолов), соединенных с пиридиновым ядром в *орто*-, *мета*- и *пара*-положениях по отношению к атому азота, а также с различной длиной алкильной цепи, варьирующей от 7 до 16 атомов углерода. Изучены их физико-химические и микробиологические свойства.

- Расширен класс катионных биоцидов (а именно бис-четвертичных аммониевых соединений) 74 соединениями, 80% из которых обладают широким спектром антибактериального и противогрибкового действия. Соединения-лидеры показали большую активность одновременно с меньшей токсичностью по сравнению с современными коммерческими антисептиками и дезинфектантами. Также на основе полученных биспиридиновых солей были разработаны и исследованы новые варианты лекарственных композиций, которые смогут впоследствии заменить существующие коммерческие санитайзеры.

- Проведен анализ зависимости микробиологической активности от структуры полученных веществ. Установлен ряд закономерностей: 1) При удалении заряженных атомов азота друг от друга биоцидное действие увеличивалось. Так, активность росла у *мета*-замещенных солей в ряду спейсеров: фенил, БФ, терфенил (ТФ). Однако, соединения-лидеры среди всех полученных биспиридиновых солей с различными замещениями были примерно одинаковы по значениям минимальной ингибирующей концентрации (МИК) для всех спейсеров. 2) Самой высокой активностью по отношению к бактериям обладали *пара*-замещенные пиридиновые соли, в то время как *мета*- и *орто*-аналоги были менее эффективны в качестве биоцидов. 3) Оптимальный промежуток длины хвоста составил от 8 до 11 атомов углерода в цепи и варьировался в зависимости от длины биспиридиновой платформы – чем больше длина, тем меньше хвост. 4) Противоион не оказывал существенного влияния на активность, но бромиды были самыми удобными в получении.

Публикации. По результатам проведенных исследований опубликовано 5 статей и 1 обзор в ведущих международных журналах, получен 1 патент, а также 8 тезисов докладов на российских и международных научных конференциях.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на Fifth International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing» (Москва, Россия, стендовый доклад), VIII Молодежной конференции ИОХ РАН (Москва, Россия, 1 устный доклад, 2 стендовых доклада), XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Москва, Россия, 3 стендовых доклада), Catalysis and Organic Synthesis ICCOS-2019 (Москва, Россия, стендовый доклад).

Структура и объем работы. Материал диссертации изложен на 188 страницах и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка сокращений и списка литературы. Библиографический список состоит из 150 наименований.

Личный вклад автора. Личный вклад соискателя заключается в получении, выделении и очистке всех обсуждаемых в диссертации соединений. Автор принимал участие в установлении строения полученных соединений с помощью физико-химических и спектральных методов анализа, обрабатывал и интерпретировал полученные результаты. Соискатель производил поиск, анализ и обобщение литературных данных,

участвовал в постановке задач, обсуждении полученных результатов и написании статей, обзоров и патентов.

Автор искренне благодарит всех коллег, выступивших соавторами представленных в работе публикаций. Особую благодарность автор выражает научному руководителю д.х.н. А. Н. Верещагину за возможность заниматься научной деятельностью и ценные советы, к.х.н. К. А. Карпенко, к.х.н. Е. А. Савериной, инж.-иссл. Т. М. Ильясову, инж.-иссл. А. В. Кансузяну за продуктивный научный диалог, К. Хэнсфорду (CO-ADD, Брисбен) и Е. В. Детушевой (ГНЦ ПМБ, Оболенск) за помощь с выполнением микробиологических исследований, к.х.н. Е. Д. Даевой и к.х.н. М. И. Стручковой за регистрацию спектров ЯМР, инж.-иссл. А.Н. Фахрутдинову за обучение работе на ЯМР спектрометре, зав. аспирантурой И. В. Веселу за помощь в процессе обучения и отзывчивость.

Основная часть работы выполнена при поддержке грантов РНФ 17-73-20260 и РФФИ 19-33-90066, за что автор искренне признателен Фондам.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Целью диссертационной работы являлась разработка методов синтеза и получение класса биспиридиновых солей (БПС), содержащих новые типы двухвалентных нелинейных спейсеров на основе ароматических структур, и обладающих высокой антибактериальной и противогрибковой активностью.

Ранее нашей научной группой были разработаны и изучены *мета*-замещенные БПС с новым нелинейным ароматическим спейсером (1,4-диоксобензолом), которые показали себя как эффективные вещества с высокой антибактериальной активностью (рис. 1). Обнаруженная эффективность дала толчок для дальнейшего исследования подобных структур, а конкретно симметричных БПС с различными ароматическими спейсерами.

Нами были выбраны следующие ароматические спейсеры для исследования зависимости микробиологической активности от структуры: бифенил (БФ), дифениловый эфир (ДФЭ), терфенил (ТФ) и производные диоксибензола (рис. 2).

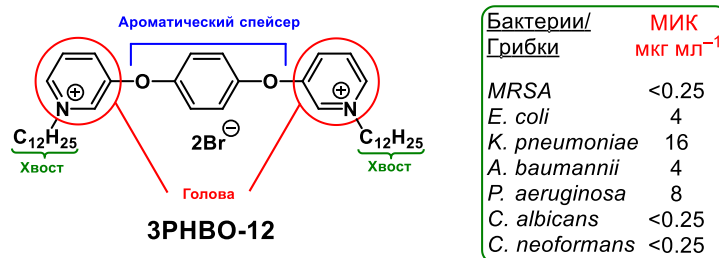


Рисунок 1. БПС на основе 1,4-диоксобензола.

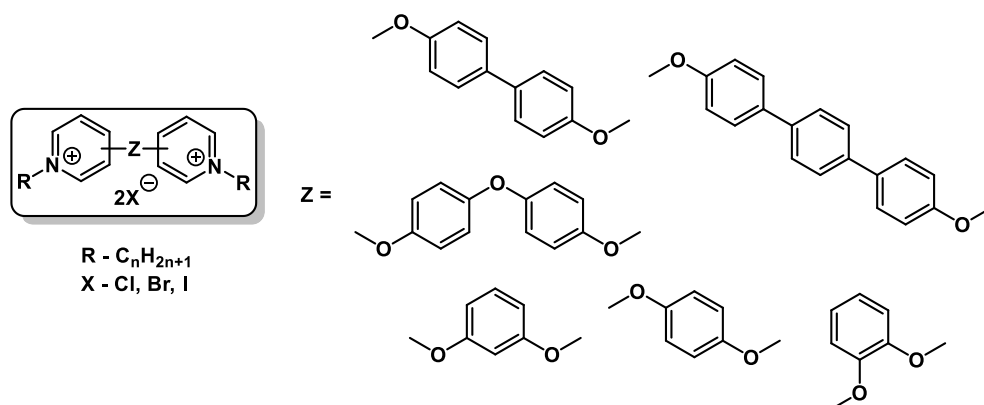


Рисунок 2. Новые ароматические спейсеры.

Логика выбора заключается в исследовании влияния введения дополнительных ароматических колец на активность соединений. Более того, были разработаны методики синтеза *пара*- и *орто*-замещенных БПС, что позволило подробнее изучить влияние конформации пиридиновых циклов на активность.

Для всех полученных соединений был проведен анализ на антибактериальную и противогрибковую активность, нефротоксичность и гемотоксичность. На основе первичных испытаний были выявлены соединения-лидеры. Далее они были протестированы на мультирезистентных клинических штаммах, бактериальных биопленках, образование бактериальной резистентности. Также на их основе были составлены лекарственные композиции и проведено сравнение с современными антисептическими препаратами.

1. Синтез и микробиологические исследования *мета*-замещенных биспиридиновых солей на основе бифенила, дифенилового эфира и терфенила.

На первом этапе диссертационного исследования был разработан подход к получению *мета*-замещенных БПС:

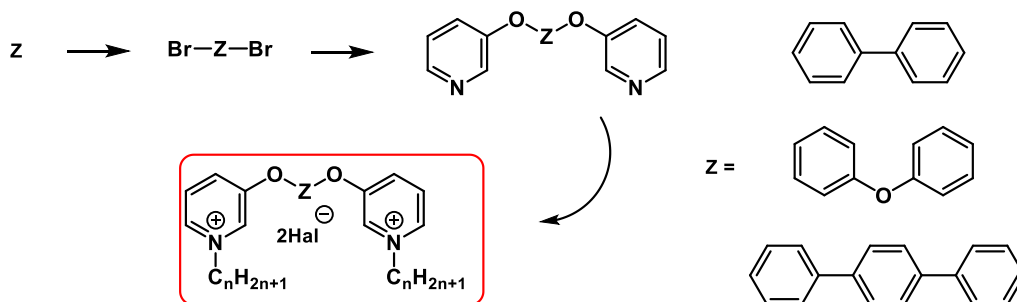


Схема 1. Синтез *мета*-замещённых БПС на основе БФ, ДФЭ и ТФ.

Нами был предложен трехстадийный метод синтеза новых БПС:

1. Бромирование коммерчески доступных бифенила (БФ), дифенилового эфира (ДФЭ) и терфенила (ТФ).
2. Сочетание дибромпроизводных ароматических структур с 3-гидропиридином посредством реакции по типу Ульмана.
3. Кватернизация полученных платформ галогеналканами по реакции Меншуткина.

На первой стадии за основу реакции была взята методика получения дибромпроизводного **4** с использованием брома и пероксида водорода в хлористом метиле и воде (схема 2).

Общая схема реакции

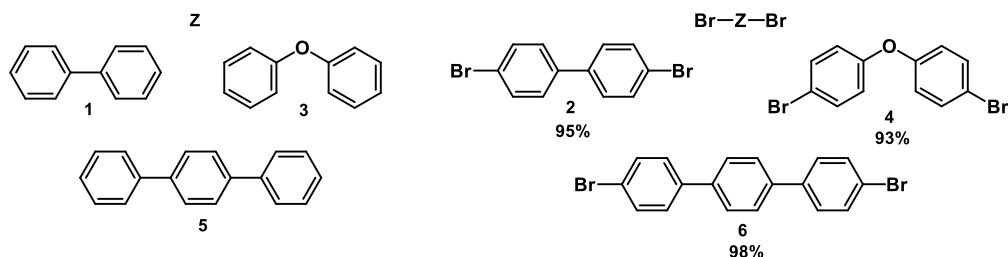
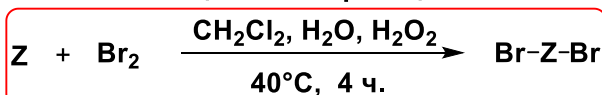


Схема 2. Бромирование БФ, ДФЭ и ТФ.

Перекись водорода в реакции отвечает за процесс регенерации брома из образующегося в процессе бромоводорода, что позволяет избежать использования большого избытка брома. Вода обеспечивает полноту и высокую скорость протекания реакции. Отсутствию воды увеличивает время процесса почти вдвое и уменьшает выход на 20%.

На второй стадии дибромпроизводные подвергаются конвертации в бипиридиниевые платформы посредством кросс-сочетания с использованием элементарной меди. Данный процесс является частным случаем реакции Ульмана, которая заключается во взаимодействии арилгалогенидов с медными катализаторами (в том числе и порошковой медью) при высокой температуре (~200°C).

В нашем случае для получения бипиридиниевых платформ **7-9** в качестве основания использовался карбонат калия, а в роли нуклеофильного агента – 3-гидроксипиридин (схема 3).

Общая схема реакции

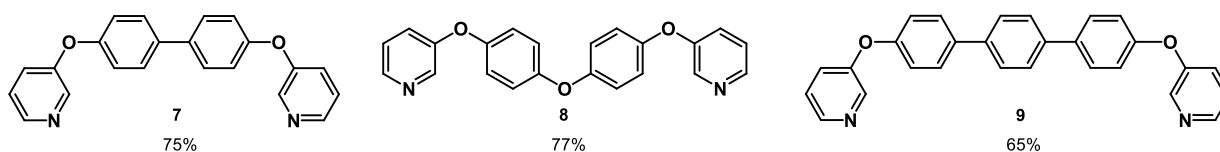
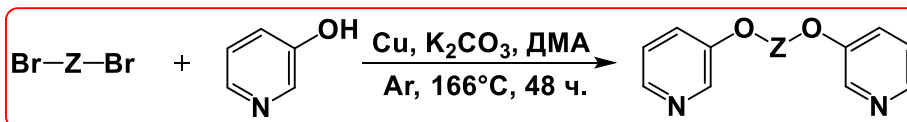


Схема 3. Реакция Ульмана.

Реакцию проводили в среде аргона в сухих условиях, с использованием диметилацетамида (ДМА) в качестве растворителя. Реакция проходила за 48 часов при температуре кипения ДМА (165°C). Мониторинг проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ). 3-гидроксипиридин использовался в небольшом избытке для полноты протекания реакции. Синтез осуществлялся с хорошими выходами (65-75%) за 48 часов.

Третьей стадией является реакция Меншуткина, протекающая по следующей схеме:

Общая схема реакции

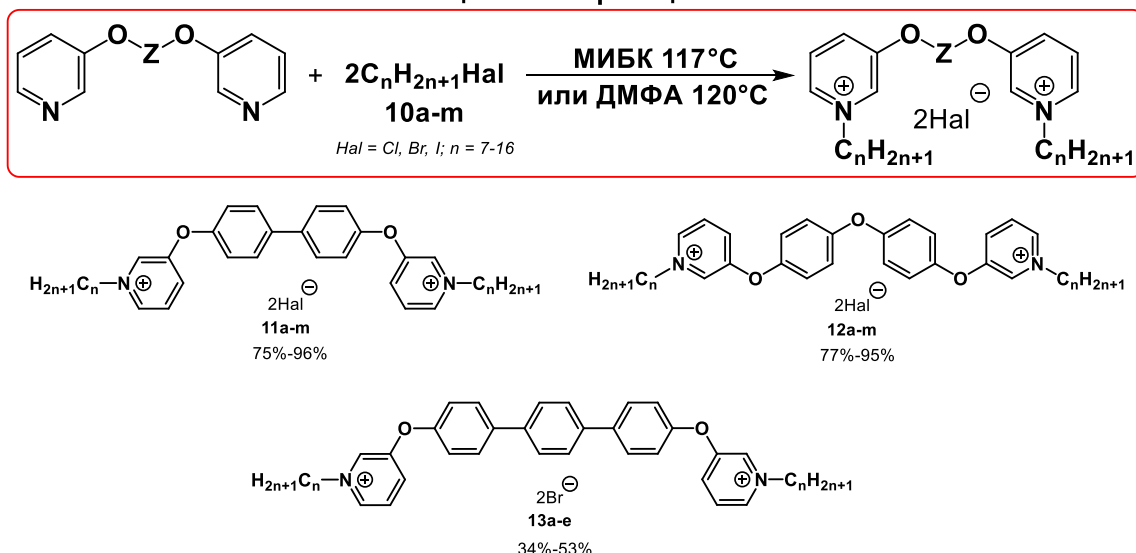


Схема 4. Реакция Меншуткина.

В качестве алкилирующих агентов использовались неразветвленные галогеналканы. Реакция проводилась в полярном высококипящем растворителе – метилизобутилкетоне (МИБК). Выбор обусловлен удобством выделения конечных продуктов. Целевые соли не растворяются в кетонах и выпадают в процессе реакции или при охлаждении, что облегчает процесс выделения до простой фильтрации и высушивания. Такой подход использовался нами ранее.

При алкилировании соединения **9** в МИБК образовывалось только моно-ЧАС. Это связано с низкой растворимостью платформы и недостаточно высокой температурой кипения растворителя. При замене растворителя на более высококипящий и полярный ДМФА выделить бис-ЧАС **13** удалось, но выходы составили всего 34-53%

Для всех полученных БПС были проведены микробиологические исследования в международной лаборатории CO-ADD (Community for Open Antimicrobial Drug Discovery) на базе Института молекулярной биологии университета Квинсленда (Австралия, г. Брисбен). Испытания представляли собой определение антибактериальной и противогрибковой активности, а также нефро- и гемотоксичности.

Тестирование антибактериальной активности проводилось на грамположительной бактерии *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (Метициллинрезистентный стафилококк золотистый (MRSA)) и на грамотрицательных бактериях *Escherichia coli* - кишечная палочка (Ec), *Klebsiella pneumoniae* - клебсиелла пневмонии (Kp), *Acinetobacter baumannii* - акинетобактерия Бауманна (Ab), *Pseudomonas aeruginosa* - синегнойная палочка (Pa),

Тестирование противогрибкового действия проводилось на дрожжевых грибах *Candida albicans* (Ca) и *Cryptococcus neoformans* (Cn)

Цитотоксическое действие синтезированных соединений было изучено на человеческих эмбриональных клетках почек - Human embryonic kidney cells (Hk, HEK-293, ATCC CRL-1573), а гемолиз изучался на нормальных эритроцитах человека - Human red blood cells (Hm). В качестве образцов сравнения использовались широко известные коммерческие антисептики: моно-ЧАС – бензалкония хлорид (БАХ), мирамистин (МИР) и цетипиридиния хлорид (ЦПХ), бис-ЧАС – октенидина дигидрохлорид (ОКТ), бис-

бигуанид – хлоргексидина биглюконат (ХГ); и ранее полученное БПС на основе 1,4-диоксобензола – ЗРНВО-12 (рис. 1). Результаты исследований отображены в таблице 1.

Таблица 1. Микробиологические свойства новых *мета*-замещенных БПС.

Соединения	МИК (мкг/мл)							Цитотоксичность (мкг/мл)	
	Бактерии					Грибки		Hk	Hm
	MRSA	Ec	Kp	Ab	Pa	Ca	Cn		
11a: n=7, Br	0.5	1	>32	>32	>32	2	4	>32	>32
11b: n=7, I	0.5	1	>32	>32	>32	2	4	>32	>32
11c: n=8, Br	≤0.25	≤0.25	8	16	16	≤0.25	≤0.25	>32	>32
11d: n=8, I	≤0.25	0.5	8	16	32	1	2	21.8	22.9
11e: n=9, Br	≤0.25	0.5	8	4	4	≤0.25	0.5	5.2	11.1
11f: n=10, Br	≤0.25	1	8	2	4	≤0.25	≤0.25	3.11	16.9
11g: n=10, Cl	≤0.25	1	8	2	4	≤0.25	≤0.25	4.8	5.0
11h: n=10, I	≤0.25	2	32	8	8	≤0.25	0.5	12.1	6.1
11i: n=11, Br	≤0.25	4	32	8	8	≤0.25	≤0.25	8.1	4.7
11j: n=12, Br	≤0.25	8	>32	16	16	≤0.25	≤0.25	3.1	7.2
11k: n=12, I	2	32	32	>32	32	1	0.5	17.2	6.0
11l: n=14, Br	2	>32	>32	>32	>32	2	0.5	3.2	>32
11m: n=16, Br	8	>32	>32	>32	>32	8	4	>32	>32
12a: n=7, Br	1	2	16	>32	>32	1	8	>32	>32
12b: n=7, I	1	4	32	>32	>32	1	8	>32	>32
12c: n=8, Br	≤0.25	≤0.25	2	32	16	≤0.25	2	2.0	23.6
12d: n=8, I	≤0.25	0.5	8	16	32	≤0.25	2	4.3	>32
12e: n=9, Br	≤0.25	0.5	2	8	4	≤0.25	≤0.25	5.7	12.6
12f: n=10, Br	≤0.25	1	4	2	4	≤0.25	≤0.25	3.2	4.3
12g: n=10, Cl	≤0.25	2	4	2	4	≤0.25	≤0.25	8.1	4.5
12h: n=10, I	≤0.25	2	8	4	8	≤0.25	≤0.25	5.4	6.2
12i: n=11, Br	≤0.25	4	32	8	8	≤0.25	≤0.25	5.6	4.8
12j: n=12, Br	1	32	>32	16	16	≤0.25	≤0.25	4.2	4.9
12k: n=12, I	1	>32	32	>32	32	≤0.25	≤0.25	5.5	8.2
12l: n=14, Br	4	>32	>32	>32	>32	2	1	5.0	6.6
12m: n=16, Br	8	>32	>32	>32	>32	8	8	>32	>32
13a: n=7, Br	≤0.25	4	>32	16	32	≤0.25	≤0.25	0.5	0.6
13b: n=8, Br	≤0.25	≤0.25	16	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	<0.25	<0.25
13c: n=9, Br	≤0.25	4	>32	2	8	≤0.25	≤0.25	1.0	0.3
13d: n=10, Br	≤0.25	4	>32	16	16	≤0.25	≤0.25	0.8	1.6
13e: n=11, Br	≤0.25	>32	>32	>32	>32	≤0.25	≤0.25	11.7	0.7
ЗРНВО-12	≤0.25	4	16	4	8	≤0.25	≤0.25	3.4	4.1
БАХ	0.5	16	>32	>32	>32	0.5	1	2.8	3.4
ХГ	≤0.25	1	32	8	8	32	>32	>32	>32
МИР	8	32	32	32	32	32	>32	21.6	20.1
ЦПХ	≤0.25	16	>32	>32	32	≤0.25	≤0.25	1.5	2.7
ОКТ	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	1.1	4.1

 лучший результат в серии

 второй результат в серии

 высокая токсичность

Результаты микробиологического анализа *мета*-замещенных БПС с ароматическими спейсерами дали основу для нескольких выводов:

- Подавляющее большинство полученных соединений демонстрируют высокую антибактериальную активность против грамположительного золотистого стафилококка, превосходящих таковую у коммерческих моно-ЧАС (бензалкония хлорида и мирамистина).
- Активность на грамотрицательных бактериях коррелируется с длиной хвоста, имеющее свое оптимальное значение для каждой серии: БФ – С10, ДФЭ – С9, ТФ – С8.
- Эффективность бактериостатического действия на грамотрицательные штаммы резко снижалась при увеличении длины алкильного заместителя больше С12 для БФ и ДФЭ, и больше С10 для ТФ. Этот эффект встречался ранее при изучении микробиологической активности на *E. Coli*.
- В целом антибактериальная активность росла с увеличением количества ароматических ядер в спейсере. Так, активность для *мета*-замещенных БПС увеличивается в ряду спейсеров фенил<БФ<ТФ. Однако, наряду с активностью, растет и токсичность. Так, соединение **13b** обладает самым высоким уровнем активности и цитотоксичности среди всех протестированных *мета*-замещенных БПС.
- Целевые БПС обладают выраженным противогрибковым действием, превосходящее таковое у коммерческих алкильных моно-ЧАС.
- Были определены соединения-лидеры для каждой серии: **11c-g** (БФ), **12c-g** (ДФЭ), **13b** (ТФ). Данные соединения превосходили по активности образцы-сравнения бензалкония хлорид, мирамистин, цетилпиридиния хлорид и хлоргексидин. Однако, они уступали по активности октенидину. Стоит отметить, что несмотря на превосходящую активность октенидина, он обладает сравнительно большей цитотоксичностью и сложным синтезом.

Простота синтеза и высокая антибактериальная и противогрибковая активность новых БПС **11-13** является их несомненным преимуществом перед другими катионными биоцидами.

2 Синтез и микробиологические исследования *орто*- и *пара*-замещенных биспиридиниевых солей на основе бифенила и дифенилового эфира.

На втором этапе работы мы изучили влияние положения спейсера относительно пиридинового ядра на активность соединений. Исследование было нацелено на получение *орто*- и *пара*-замещений для представления полной зависимости структура-микробиологическая активность.

Учитывая синтетические схемы, разработанные нами на первом этапе, мы предприняли попытку применить данный подход для получения *орто*- и *пара*-замещенных БПС. Однако, уже на стадии замещения атомов брома на пиридиниевые кольца наблюдалось осмоление реакционной системы без следов продукта или даже полупродукта.

Это связано с изомеризацией 2- и 4-гидроксипиридина в условиях реакции на соответствующие пиридоны. Из-за чего образование анионов, необходимых для реакции,

затруднительно. 3-гидроксипиридин с другой стороны проявляет в большей мере свойства фенола и легко образует анион.

В связи с этим, нами был предложен обратный подход: сочетание гидроксильных платформ и галогенпиридинов. В этом случае синтез состоял всего из 2-х стадий (схема 5). Первая стадия – сочетание по типу реакции Ульмана, вторая – реакция алкилирования (Меншуткина).

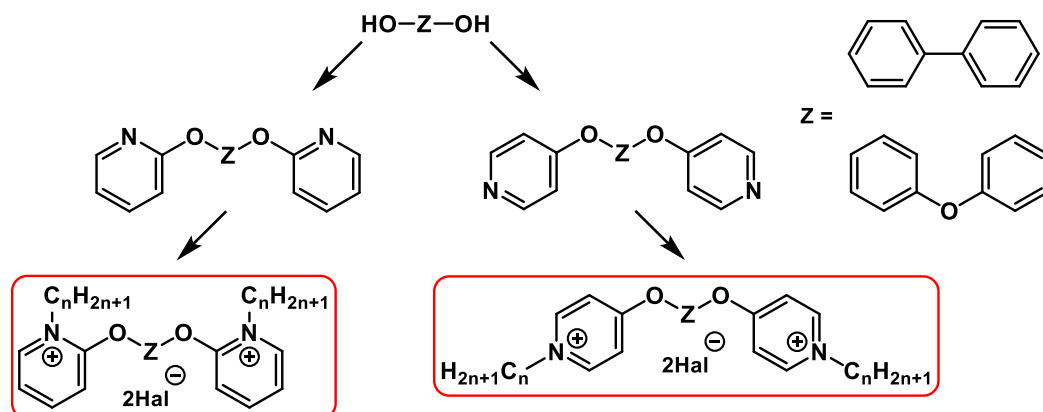


Схема 5. Синтез *орто*- и *пара*-замещённых БПС на основе БФ и ДФЭ.

В качестве катализатора на первой стадии (схема 6) использован комплекс на основе йодида меди, пиколиновой кислоты (лиганд) и диметилсульфоксида (ДМСО, растворитель). Благодаря действию каталитического комплекса, активация процесса не требует высоких температур, как для типичных реакций Ульмана.

Общая схема реакции

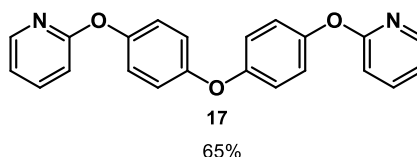
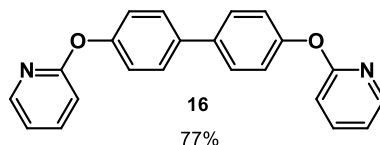
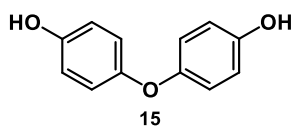
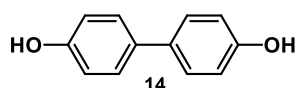
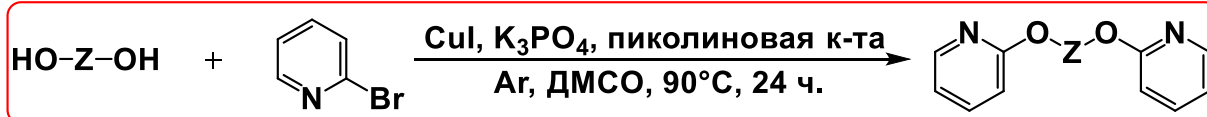


Схема 6. Синтез *орто*-замещённых бипиридиновых платформ на основе БФ и ДФЭ.

В процессе мониторинга реакции по ТСХ не было обнаружено полупродукта. Это дает основание для теории одновременного замещения обеих гидроксильных групп. При использовании двух эквивалентов 2-бромпиридина и нагреве при 90°C в течении суток, реакция воспроизводилась с выходом 77%. Уменьшение количества эквивалентов меди и лиганда по сравнению с изначальной методикой вызывало падение выхода на 15-20%. Увеличение температуры пагубно сказывалось на процесс, также приводя к уменьшению выхода продукта **16** до 48%.

Для получения *para*-замещённых бипиридиниевых платформ использовали коммерчески доступный 4-хлорпиридина гидрохлорид (схема 7). Его применение обусловлено труднодоступностью и дороговизной 4-бромпиридина.

Общая схема реакции

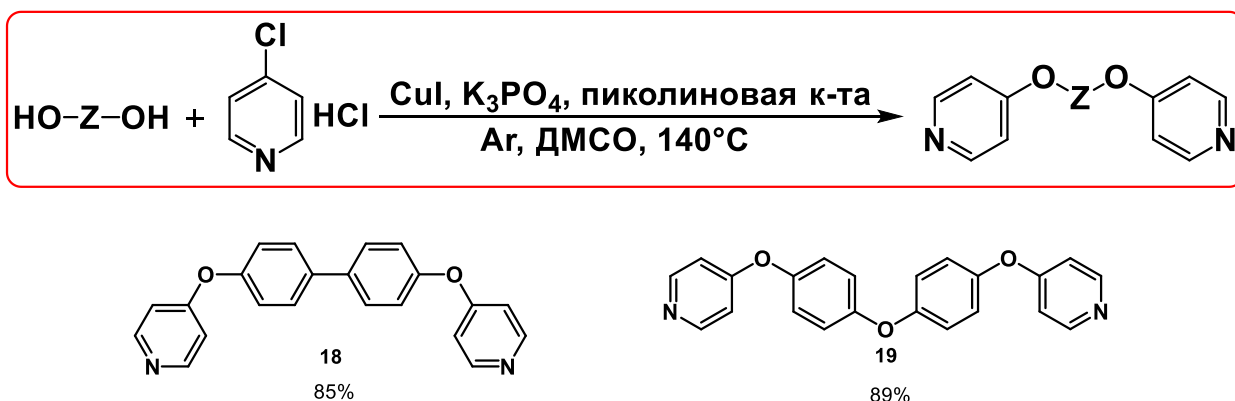


Схема 7. Синтез *para*-замещённых бипиридиниевых платформ на основе БФ и ДФЭ.

Оптимальные условия для получения *орто*-платформ **16** и **17** не привели к получению искоемых *para*-соединений **18** и **19**. По мониторингу с помощью ТСХ полная конвертация исходных диолов наблюдалась только после 72 часов в ДМСО при нагреве в 140°C, выход при этом составил 85%.

N-Алкилирование полученных платформ проводили в ацетонитриле (схема 8). Замена растворителя связана с осмолением и очень низкими выходами БПС при работе в МИБК и ДМФА. Несмотря на невысокую температуру кипения, ацетонитрил является одним из самых часто применяемых растворителей в реакциях Меншуткина.

Общие схемы реакций

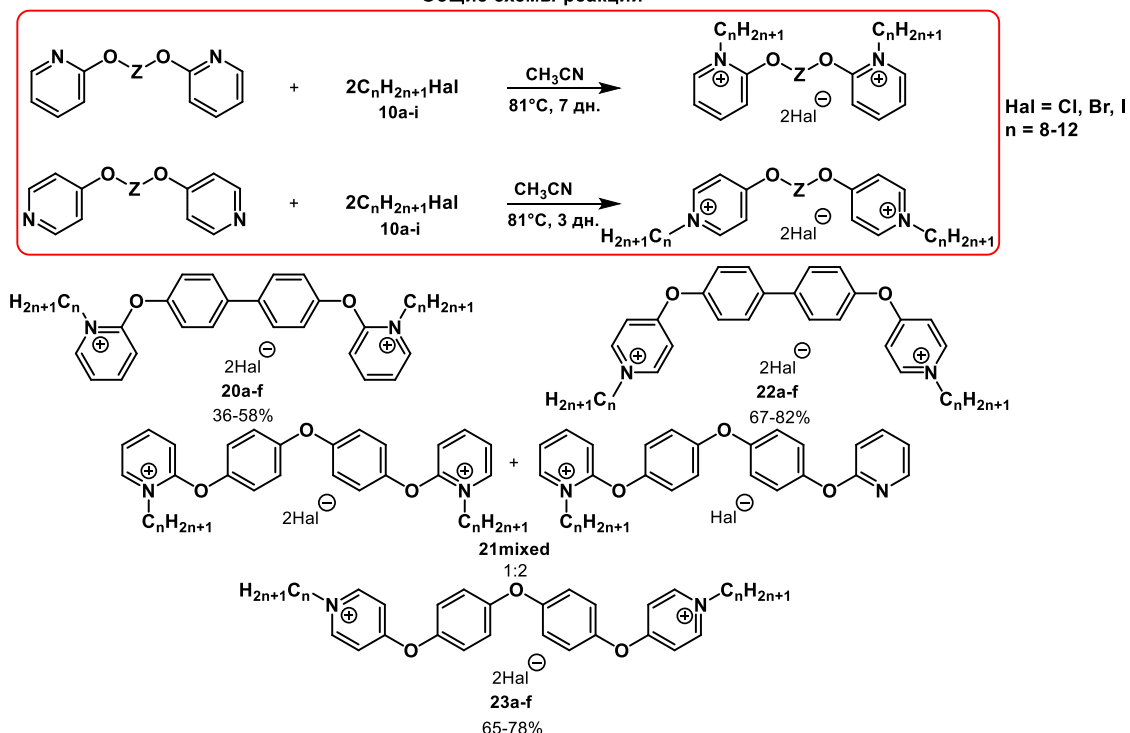


Схема 8. Алкилирование *орто*- и *para*-замещённых бипиридиниевых платформ на основе БФ и ДФЭ.

Учитывая выделенные зависимости на первом этапе исследования, диапазон длины алкильной цепи был сокращен с C7-C16 до C8-C12. Из-за стерического затруднения *орто*-платформ и низкой температуры кипения ацетонитрила время реакции было увеличено до 7 суток, при этом наблюдалось значительное снижение выхода до 36-58% (**20a-f**). Для *пара*-соединений в тех же условиях образование БПС достигалось спустя 3 суток с выходами 65-82% (**22a-f** и **23a-f**). Алкилирование платформы **17** протекало не селективно. В результате кипячения в течение недели образовывались смеси моно-ЧАС и целевых БПС в примерном соотношении 2 к 1 (**21mixed**). Увеличение избытка галогеналканов, как и большее время кипячения не приводило к селективному образованию БПС. Разделение моно- и ди-производных методом флеш-хроматографии не увенчалось успехом, наблюдался распад целевого продукта. Как и на первом этапе все полученные БПС исследовались на микробиологическую активность (таблица 2).

Таблица 2. Микробиологические свойства *орто*-замещенных БПС с БФ и ДФЭ спейсером.

Соединения	МИК (мкг/мл)							Цитотоксичность (мкг/мл)	
	Бактерии					Грибки		Hk	Hm
	MRSA	Ec	Kp	Ab	Pa	Ca	Cn		
20a: n=8, Br	≤0.25	2	8	16	16	2	1	14.6	15.2
20b: n=8, I	≤0.25	4	16	32	16	4	8	19.3	18.4
20c: n=10, Br	≤0.25	16	32	16	16	≤0.25	≤0.25	12.4	2.7
20d: n=10, I	0.5	32	32	32	32	0.5	≤0.25	7.8	5.7
20e: n=12, Br	2	32	>32	>32	32	1	≤0.25	0.9	2.9
20f: n=12, I	1	32	>32	>32	32	0.5	0.5	3.1	2.7
21mix: n=10, Br	2	>32	>32	>32	>32	2	4	24.6	>32
22a: n=8, Br	≤0.25	≤0.25	16	16	16	1	1	1.6	27.0
22b: n=8, I	≤0.25	≤0.25	16	16	16	1	1	>32	>32
22c: n=10, Br	≤0.25	8	16	4	8	≤0.25	≤0.25	4.8	7.2
22d: n=10, I	≤0.25	8	32	16	16	≤0.25	1	14.4	>32
22e: n=12, Br	0.5	>32	>32	>32	>32	0.5	≤0.25	13.6	>32
22f: n=12, I	1	32	>32	>32	32	2	0.5	16.6	>32
23a: n=8, Br	≤0.25	≤0.25	8	16	32	≤0.25	2	2.8	17.9
23b: n=9, Br	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	4	1.2	11.9
23c: n=10, Cl	≤0.25	4	32	16	16	≤0.25	≤0.25	8.5	26.0
23d: n=10, Br	≤0.25	≤0.25	4	≤0.25	4	≤0.25	16	0.4	≤0.25
23e: n=10, I	≤0.25	≤0.25	32	≤0.25	4	≤0.25	32	3.2	0.6
23f: n=11, Br	≤0.25	4	>32	16	16	≤0.25	32	0.5	≤0.25
ЗРНВО-12	≤0.25	4	16	4	8	≤0.25	≤0.25	3.4	4.1
БАХ	0.5	16	>32	>32	>32	0.5	1	2.8	3.4
ХГ	≤0.25	1	32	8	8	32	>32	>32	>32
МИР	8	32	32	32	32	32	>32	21.6	20.1
ЦПХ	≤0.25	16	>32	>32	32	≤0.25	≤0.25	1.5	2.7
ОКТ	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	1.1	4.1

 лучший результат в серии
 второй результат в серии
 высокая токсичность

На основе полученных результатов установили следующие закономерности:

- Все полученные соли **20-23** обладают выраженной активностью против грамположительного *MRSA*.
- Орто-соединения менее активны, чем прочие и практически не проявляют антибактериальных свойств на грамотрицательных штаммах.
- Пара-производные на основе ДФЭ спейсера оказались самыми эффективными БПС из всех исследованных образцов. Так соединение **23b** проявляло активность сравнимую с октенидином, но являлось менее токсичным как на эмбриональных клетках почек, так и на эритроцитах.

3 Синтез и микробиологические исследования биспиридиновых солей на основе диоксибензолов.

Ранее сотрудниками нашей группы была синтезирована БПС на основе 1,4-дигидроксифенола, которая обладает высокой антибактериальной и противогрибковой активностью (рис. 1). На третьем этапе диссертационного исследования мы изучали синтез и микробиологические свойства новых БПС на основе 1,2-, 1,3- и 1,4-диоксибензолов в качестве спейсеров (схема 9). В качестве исходных компонентов использовали *орто*-, *мета*- и *пара*-дибром- и дигидроксифенолы.

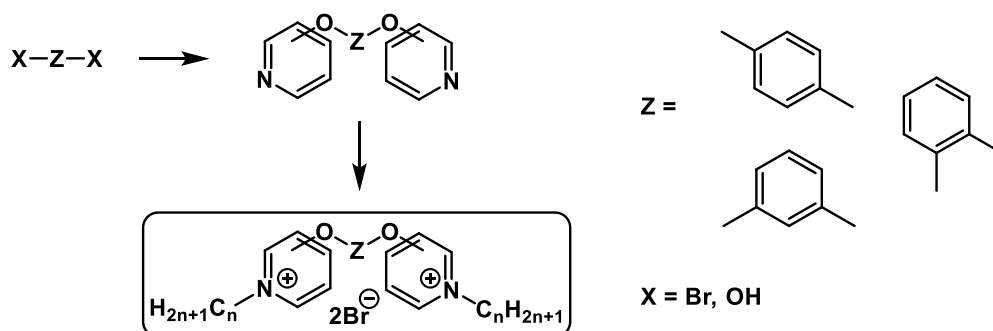


Схема 9. Общая схема синтеза БПС на основе диоксибензолов.

Синтез БПС являлся двухстадийным. Мы использовали методики, разработанные на первом и втором этапах исследования (рис. 3).

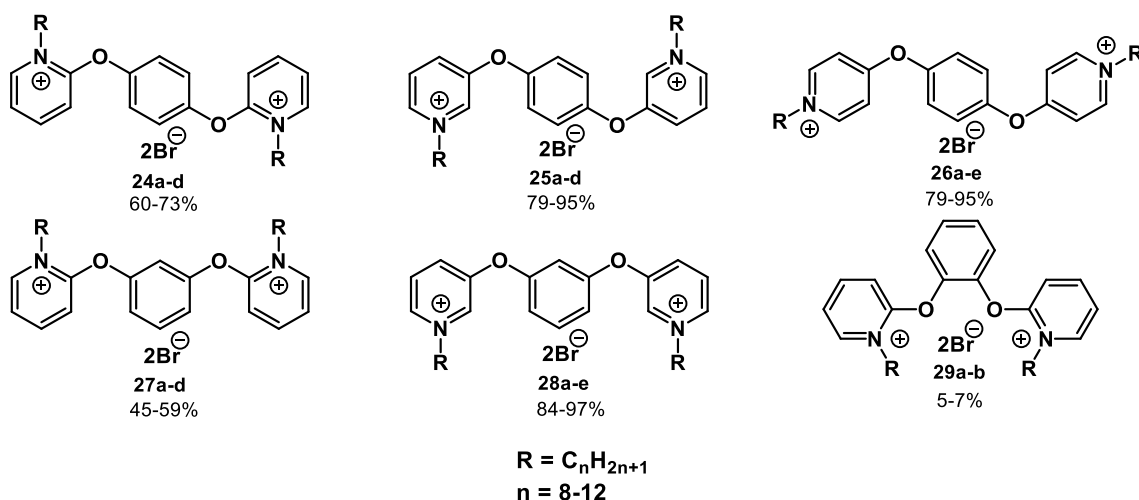


Рисунок 3. БПС на основе диоксибензолов

Таким образом, были получены шесть изомерных серий БПС на основе диоксибензолов в качестве спейсеров. Для всех полученных солей проведены

бактериостатические, фунгистатические, нефролитические и гемолитические исследования. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3. Микробиологические свойства БПС на основе диоксibenзолов.

Соединения	МИК (мкг/мл)							Цитотоксичность (мкг/мл)	
	Бактерии					Грибки		Hk	Hm
	MRSA	Ec	Kp	Ab	Pa	Ca	Cn		
24a: n=8, Br	≤0.25	≤0.25	>32	>32	>32	1	≤0.25	>32	>32
24b: n=10, Br	≤0.25	≤0.25	4	≤0.25	16	≤0.25	≤0.25	12.1	0.25
24c: n=11, Br	≤0.25	1	32	4	32	≤0.25	≤0.25	0.8	5.7
24d: n=12, Br	≤0.25	32	>32	16	>32	≤0.25	≤0.25	1.7	10.3
25a: n=9, Br	≤0.25	≤0.25	32	>32	>32	≤0.25	32	>32	>32
25b: n=10, Br	≤0.25	≤0.25	≤0.25	8	16	≤0.25	>32	11.9	15.0
25c: n=11, Br	≤0.25	≤0.25	4	2	2	≤0.25	32	9.8	8.3
25d: n=12, Br	≤0.25	4	16	16	4	≤0.25	≤0.25	3.4	2.5
26a: n=8, Br	≤0.25	≤0.25	>32	>32	>32	>32	2	>32	>32
26b: n=9, Br	≤0.25	≤0.25	32	32	32	4	≤0.25	11.4	>32
26c: n=10, Br	≤0.25	≤0.25	16	32	4	≤0.25	≤0.25	4.3	>32
26d: n=11, Br	≤0.25	≤0.25	≤0.25	4	≤0.25	≤0.25	≤0.25	>32	8.3
26e: n=12, Br	≤0.25	≤0.25	32	8	>32	≤0.25	≤0.25	>32	>32
27a: n=8, Br	≤0.25	≤0.25	>32	>32	>32	>32	≤0.25	>32	>32
27b: n=9, Br	≤0.25	≤0.25	8	32	32	16	≤0.25	26.7	>32
27c: n=10, Br	≤0.25	≤0.25	16	2	32	≤0.25	≤0.25	23.9	>32
27d: n=12, Br	≤0.25	8	>32	8	>32	≤0.25	≤0.25	3.6	5.3
28a: n=8, Br	4	16	>32	>32	>32	1	≤0.25	>32	>32
28b: n=9, Br	≤0.25	≤0.25	32	>32	>32	8	≤0.25	>32	>32
28c: n=10, Br	≤0.25	≤0.25	2	16	32	8	≤0.25	17.4	17.4
28d: n=11, Br	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	5.6	0.5
28e: n=12, Br	≤0.25	8	32	4	8	≤0.25	≤0.25	12.7	5.4
29a: n=8, Br	≤0.25	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
29b: n=11, Br	≤0.25	4	>32	>32	2	≤0.25	≤0.25	>32	>32
БАХ	0.5	16	>32	>32	>32	0.5	1	2.8	3.4
ХГ	≤0.25	1	32	8	8	32	>32	>32	>32
МИР	8	32	32	32	32	32	>32	21.6	20.1
ЦПХ	≤0.25	16	>32	>32	32	≤0.25	≤0.25	1.5	2.7
ОКТ	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	1.1	4.1

	лучший результат в серии
	второй результат в серии
	высокая токсичность

На основе полученных результатов установлены следующие закономерности:

- Все полученные соли обладают выраженной активностью против грамположительного *MRSA*.
- Соединения с C8 и C9 (кроме **28a**) хвостом проявляли селективное действие против *E. Coli* среди всех грамотрицательных штаммов.
- *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* являются более устойчивыми к полученным БПС, чем остальные грамотрицательные бактерии. Только соединения **24b**, **25c**, **26d**, **28d** и ОКТ проявили сравнительно высокую активность против этих штаммов.

- Большинство БПС проявляли высокую противогрибковую активность со значениями МИК 0.25 мкг/мл. За исключением соединений **25a-c**, не показавших активности на штамме *Candida neoformans*, и других малоактивных БПС с хвостом C8 (**26a**, **27a** и **29a**).
- В целом, полученные БПС обладают меньшим уровнем цитотоксичности по сравнению с широко использующимися ЧАС и с БПС на основе ароматических спейсеров с более чем одним ароматическим ядром.
- Синтезированные БПС **26d** и **28d** с C11 алкилом являются самыми эффективными соединениями среди этой серии, превосходя по своим свойствам такие антисептики как бензалкония хлорид, хлоргексидин, мирамистин и цетилпиридиния хлорид, и обладающие сравнимой активностью с октенидином. При этом, БПС **26d** менее токсично.

4. Микробиологические исследования соединений-лидеров среди новых биспиридиновых солей.

Среди всех синтезированных в работе биспиридиновых солей нами были отобраны соединения-лидеры на основании первичных микробиологических исследований (антибактериальной и противогрибковой активности, цитотоксичности), а также простоты методов синтеза (рис. 4).

Критерии отбора были следующими: низкая токсичность по сравнению с соединениями эталонами, легко осуществимый синтез с высокими выходами, высокая микробиологическая активность. Исходя из сформированных критериев, некоторые серии не были представлены в списке соединений-лидеров. Так, БПС с ТФ спейсером несмотря на высокую активность являются крайне токсичными и сложными в получении. Некоторые высокоактивные соединения, такие как **23d**, **23e**, **23f** и **24b** также не попали в список из-за высокой токсичности.

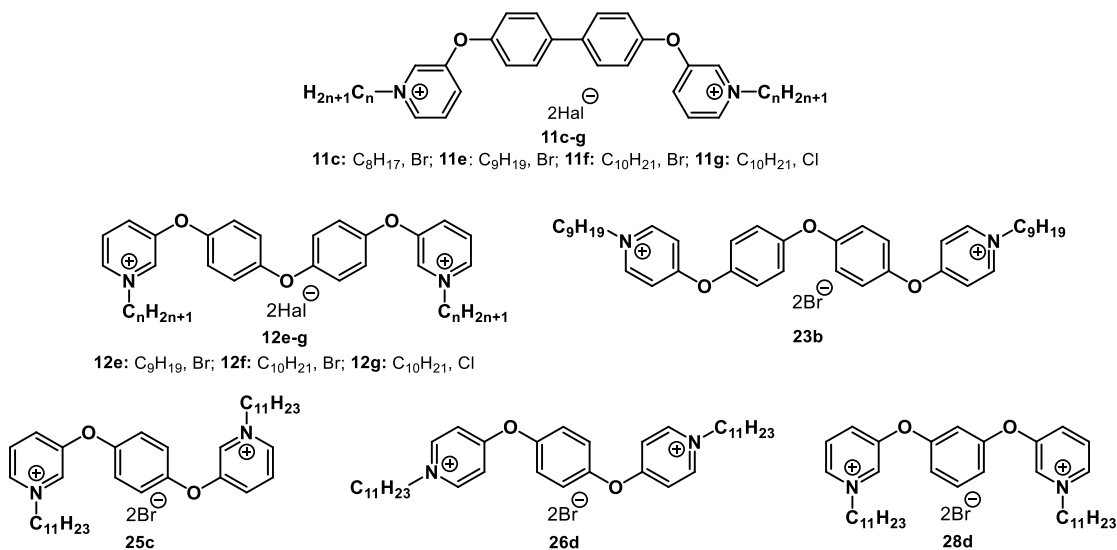


Рисунок 4. Соединения-лидеры.

Среди *орто*-замещенных БПС не было соединений-лидеров, так как они проявили меньшую эффективность против грамотрицательных бактерий по сравнению с остальными типами солей. Однако, в качестве продолжения тематики исследования БПС с

ароматическими спейсерами, *орто*-замещенные соли на основе 2,7-диоксинафтола показали многообещающие результаты (схема 10). Это открытие может послужить основанием для дальнейшего изучения данного класса.

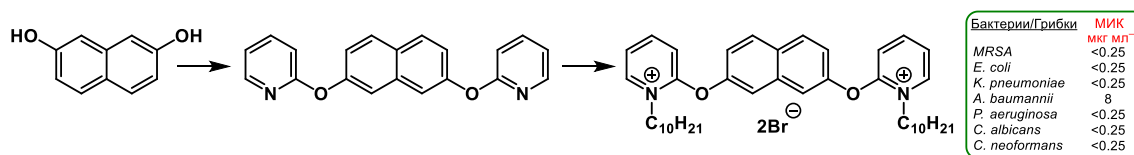


Схема 10. *Орто*-БПС на основе 2,7-диоксинафтола.

Среди всех синтезированных в работе бис-ЧАС были выбраны 11 соединений-лидеров и сформулированы следующие зависимости структура БПС – биологическая активность:

- Синтезированные БПС более активные, чем коммерческие моно-ЧАС на всех штаммах бактерий и грибов. Это подтверждает теорию, что бис-ЧАС с двумя длинными алкильными цепями являются более эффективными биоцидами, чем моно-ЧАС с одной такой цепью.
- С увеличением расстояния между заряженными атомами азота, самыми активными соединениями в серии становятся БПС с менее длинными хвостами. Так, для диоксибензолных БПС оптимальная длина алкильной цепи – C11, для БФ и ДФЭ – C9, для ТФ – C8. Однако, это утверждение справедливо только для действия против грамотрицательных бактерий. Активность на грамположительном *MRSA* для всех серий БПС была одинаково высокой.
- *Пара*-замещенные БПС обладают превосходящими микробиологическими свойствами среди всех образцов (соединения **23b**, **26d**). Стоит отметить, что введение дополнительного кольца (БФ, ДФЭ) не сильно влияет на общую активность, но увеличивает токсичность.
- Противоион не сильно влияет на микробиологические свойства БПС. Однако, бромиды самые удобные для получения среди галоген-анионов.

Для трех соединений-лидеров (**11e**, **11f**, **12f**) были проведены дополнительные микробиологические исследования. Было изучено бактериостатическое и бактерицидное действие против референс (или библиотечных) штаммов, а также мультирезистентных клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий (таблица 4).

Работа проводилась совместно с Государственным Научным Центром Прикладной Микробиологии и Биотехнологии (ГНЦ ПМБ, Россия, г. Оболensk). Клинические штаммы были получены в отделе молекулярной микробиологии ГНЦ ПМБ из клинических образцов при исследовании случаев сепсиса. В качестве образцов сравнения использовались следующие известные антисептики: бензалкония хлорид (БАХ), мирамистин (МИР), цетилпиридиния хлорид (ЦПХ) и октенидин (ОКТ). Результаты исследований подтверждают, что полученные БПС активны также и на мультирезистентных клинических штаммах. Соединение **11e** было сравнимо по активности с октенидином, уступая ему в одно-два разбавления на отдельных штаммах. Коммерческие моно-ЧАС показали очень слабое антибактериальное действие даже при высоких концентрациях. За исключением ЦПХ, который обладал умеренной активностью против клинических штаммов.

Таблица 4. Микробиологическая активность *мета*-замещенных БПС на основе БФ и БФЭ против референс и клинических бактериальных штаммов.

Соединения	МИК/МБК (мкг/мл)									
	Референс штаммы					Клинические штаммы				
	<i>Sa</i>	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Ab</i>	<i>Pa</i>	<i>Sa</i>	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Ab</i>	<i>Pa</i>
11e: n=9, Br	0.5	4	8	16	16	0.5	4	4	16	16
	4	8	8	16	63	4	16	8	16	16
11f: n=10, Br	1	8	16	16	16	1	8	16	32	250
	8	8	63	16	16	4	8	63	63	500
12f: n=10, Br	1	16	16	16	16	1	16	16	16	8
	8	32	16	16	16	4	63	16	16	63
БАХ	125	4	500	н/а	н/а	125	500	500	н/а	н/а
	250	8	500	н/а	н/а	500	н/а	500	н/а	н/а
МИР	125	250	н/а	н/а	н/а	125	250	н/а	н/а	н/а
	500	500	н/а	н/а	н/а	500	н/а	н/а	н/а	н/а
ЦПХ	4	8	63	32	500	2	8	8	16	32
	16	8	250	125	н/а	16	63	16	32	125
ОКТ	0.5	0.5	4	32	8	0.5	2	2	32	32
	2	0.5	8	125	16	2	4	4	125	63

лучший результат в серии второй результат в серии

н/а не активен в концентрации 500 мкг/мл

Также проводились исследования на способность к разрушению бактериальных биопленок (таблица 5).

Таблица 5. Микробиологическая активность *мета*-замещенных БПС на основе БФ и БФЭ против бактериальных биопленок.

Соединения	МИК/МБК (мкг/мл)									
	Референс штаммы					Клинические штаммы				
	<i>Sa</i>	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Ab</i>	<i>Pa</i>	<i>Sa</i>	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Ab</i>	<i>Pa</i>
11e: n=9, Br	8	16	16	32	125	8	16	16	32	125
	16	16	32	125	500	8	32	125	125	500
11f: n=10, Br	4	16	16	250	125	8	32	16	32	250
	16	16	250	250	н/а	16	32	250	500	500
12f: n=10, Br	8	16	32	63	125	8	16	32	32	250
	16	16	125	500	н/а	16	63	250	500	н/а
БАХ	н/а	250	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а
	н/а	250	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а
МИР	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а
	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а
ЦПХ	16	16	63	250	н/а	8	125	63	250	н/а
	63	63	250	500	н/а	32	250	500	500	н/а
ОКТ	4	8	16	250	125	4	16	16	32	250
	8	16	63	250	500	8	125	125	250	250

лучший результат в серии

второй результат в серии

н/а не активен в концентрации 500 мкг/мл

Биопленки - это совокупность микробных клеток, которые необратимо связаны с поверхностью и заключены в матрицу, состоящую в основном из полисахаридного материала. Подавляющее большинство бактериальных клеток (более 95%) находятся в форме биопленок. В подобном состоянии резистентность микроорганизмов к воздействию биоцидов гораздо выше, чем в виде планктонных клеток. Таким образом, по данным национальных институтов здоровья США 80% инфекционных заболеваний в теле человека вызваны биопленками.

Для подавления роста и разрушения биопленок потребовались большие концентрации, но полученные БПС **11e** и **11f** всё еще демонстрировали сравнимую активность с октенидином и превосходящую по отношению к коммерческим моно-ЧАС (бензалкония хлоридом, мирамистином и цетилпиридиния хлоридом).

Соединения-лидеры (**11e**, **11f**, **12f**) также тестировались на образование резистентности. Бактериальная резистентность – это способность штаммов бактерий обретать устойчивость против воздействия биоцидных агентов любой природы при длительном воздействии.

Для изучения появления резистентности грамположительные и грамотрицательные патогенные бактерии (*E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*) инкубировали вместе с образцами БПС в субингибирующих концентрациях в течение длительного времени. Каждые несколько суток в период инкубации отбирали пробу штамма и пересеивали. На получившейся новой колонии определяли уровень минимальной бактерицидной концентрации (МБК) БПС и фиксировали ее изменение по сравнению с исходным значением. Процедуру повторяли до тех пор, пока концентрация не перестанет меняться после нескольких пересевов. Рост МБК по сравнению с изначальным показателем констатирует об адаптации микроорганизма к действию дезинфектанта. В качестве соединения эталона использовался коммерческий БПС – октенидина дигидрохлорид (ОКТ). На основе полученных данных построили график в сети координат МБК/время инкубации (рис. 5-8). Выход графика на плато соответствует окончанию эксперимента и свидетельствует о прекращении выработки резистентности микроорганизмами.

Грамположительный штамм *S. aureus* вырабатывал резистентность против всех испытуемых БПС после 20-25 дней инкубации. В то время как МБК для **11e**, **11f** и **октенидина** увеличилась в 8 раз, для соединения **11f** концентрация выросла только в 4 раза. Однако, активность **октенидина** оставалась самой высокой спустя 40 дней со значением МБК 4 мг/л (рис. 5).

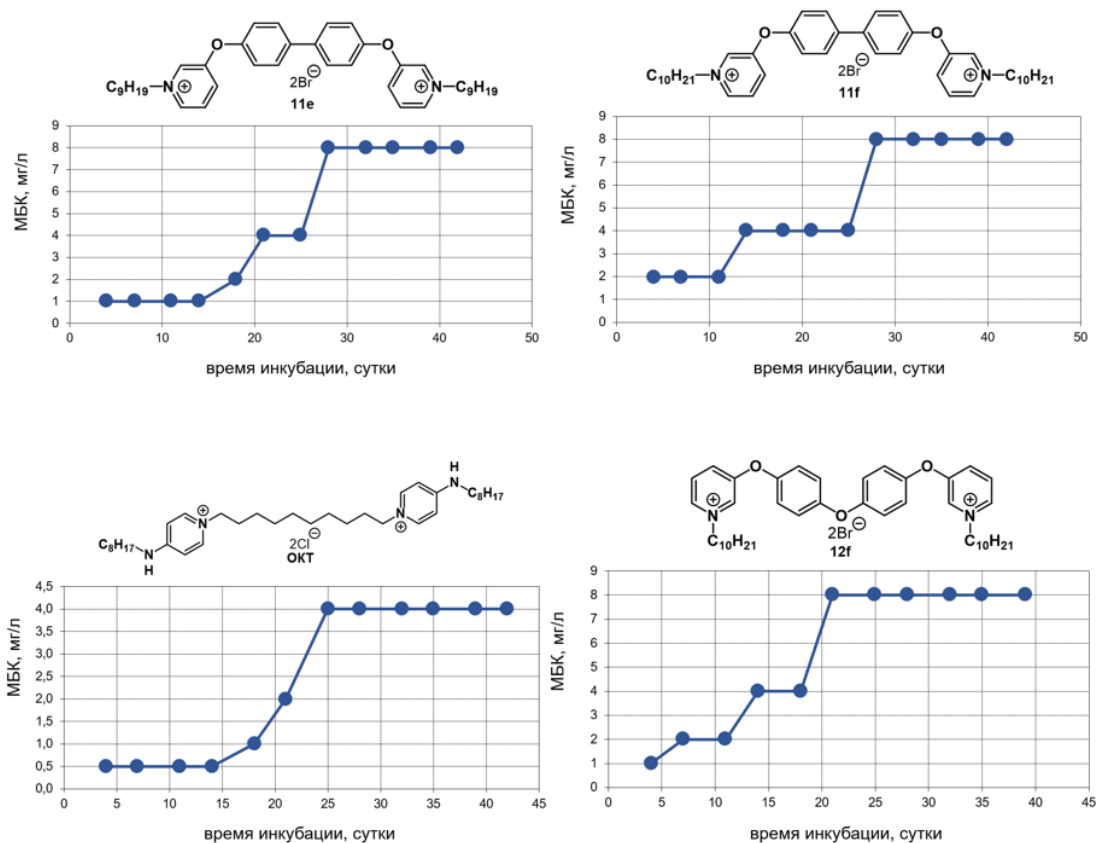


Рисунок 5. Селекция устойчивости штамма *S. Aureus* ATCC 4300 по отношению к БПС.

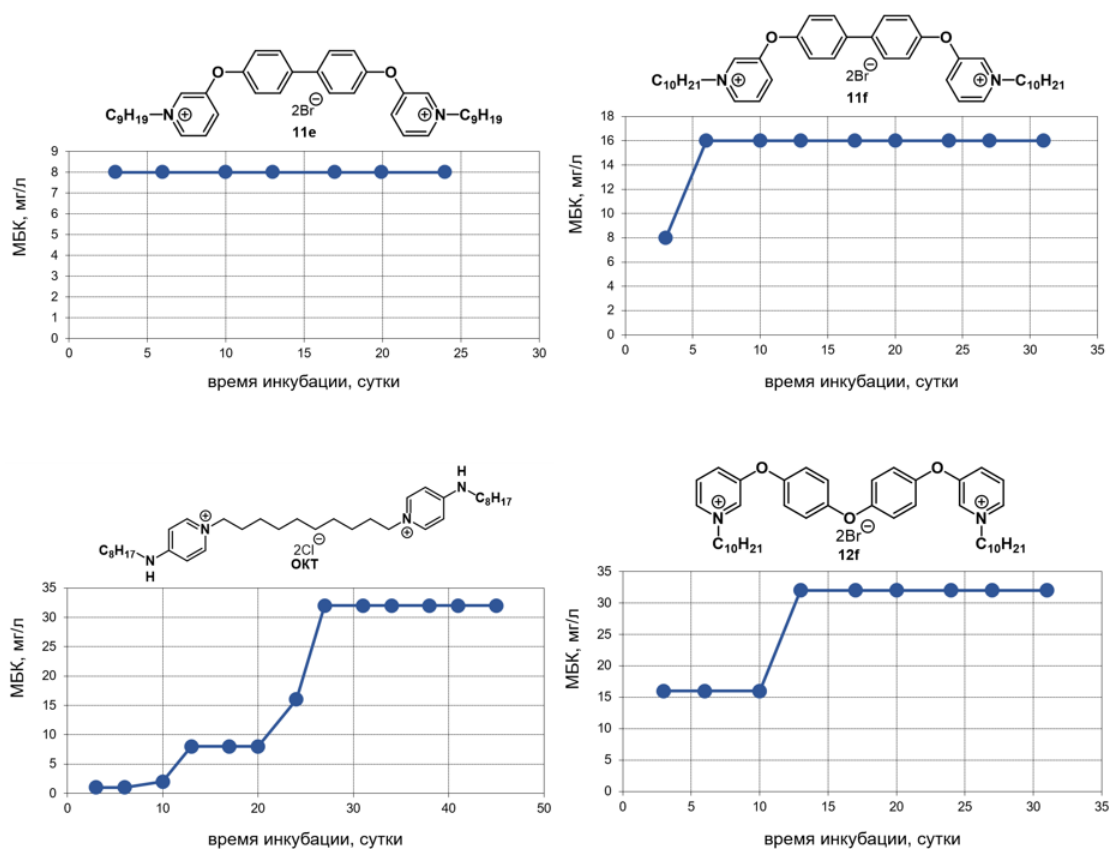


Рисунок 6. Селекция устойчивости штамма *E. Coli* ATCC 25922 по отношению к БПС.

Грамотрицательный штамм *E. Coli* обрел устойчивость к коммерческому БПС октенидину, увеличив порог МБК в 64 раза за 25 дней инкубации. Против образцов **11f** и **12f** МБК возросла всего в 2 раза (до 16 мг/л и 32 мг/л соответственно). Для соединения **11e** за 25 дней исследования резистентность не проявлялась вовсе, и показатели эффективности оставались на прежнем уровне (рис. 6).

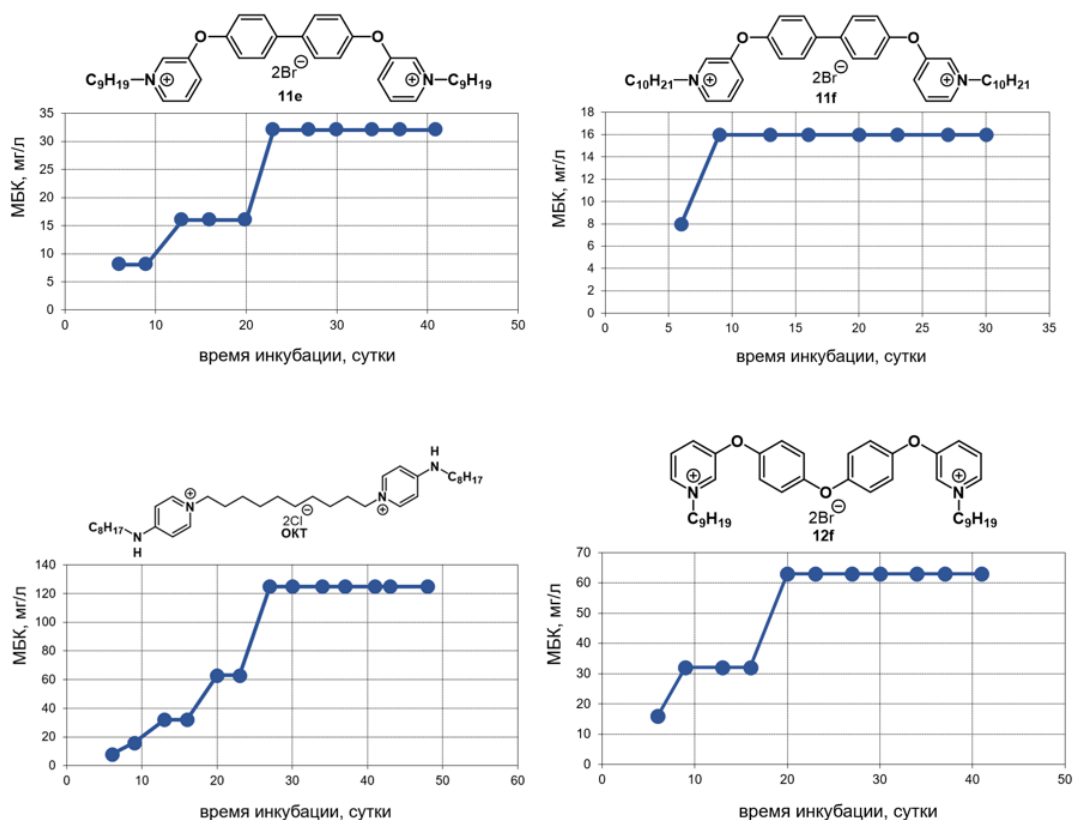


Рисунок 7. Селекция устойчивости штамма *K. pneumoniae* ATCC 700603 по отношению к БПС.

K. pneumoniae начинал вырабатывать резистентность ко всем БПС в первые 10 дней инкубации. Изначальная МБК октенидина выросла в 16 раз: с 8 мг/л до 125 мг/л в течение месяца. Для новых бис-ЧАС **11e** и **12f** МБК увеличивалась в 4 раза, достигнув показателей в 32 мг/л и 63 мг/л соответственно. Соединение **11f** спустя месяц эксперимента сохранило МБК на уровне 16 мг/л, что в 2 раза больше по сравнению с изначальным показателем (рис. 7).

Бактерии *P. aeruginosa* оказались самыми устойчивыми среди всех исследуемых штаммов. Уже за первые 20 суток эксперимента все бис-ЧАС почти потеряли свою активность при показателе МБК в 250 мг/л.

Таблица 6. Микробиологическая активность лекарственных композиций на основе новых БПС и соединений-эталонов.

Композиция	МИК/МБК (мкг/мл)			
	Референс штаммы		Клинические штаммы	
	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>
11e+ФЭ/Н ₂ O	2	4	2	2
	2	8	2	4
11f+ФЭ/Н ₂ O	2	2	4	4
	2	4	4	4
12f+ФЭ/Н ₂ O	2	4	4	8
	4	4	4	16
БАХ+ФЭ/Н ₂ O	16	16	16	32
	16	16	32	32
ОКТ+ФЭ/Н ₂ O	2	1	2	2
	2	1	4	4
ФЭ/Н ₂ O	32	63	63	125
	32	125	63	250
11e+ИП/Н ₂ O	2	2	2	2
	2	2	2	2
11f+ИП/Н ₂ O	2	4	2	4
	2	4	2	8
12f+ИП/Н ₂ O	2	2	2	2
	2	4	2	2
БАХ+ИП/Н ₂ O	8	8	16	32
	4	16	125	32
ОКТ+ИП/Н ₂ O	4	1	4	2
	4	1	4	4
ИП/Н ₂ O	32	32	32	32
	32	63	32	125
11e+П/ИП/Н ₂ O	2	2	2	4
	2	2	2	4
11f+П/ИП/Н ₂ O	2	2	4	2
	2	2	4	2
12f+П/ИП/Н ₂ O	2	1	2	2
	2	1	2	2
БАХ+П/ИП/Н ₂ O	16	16	16	16
	16	16	16	32
ОКТ+П/ИП/Н ₂ O	1	1	2	2
	1	1	2	8
П/ИП/Н ₂ O	32	63	63	125
	32	125	63	125



лучший результат в серии

второй результат в серии

одинаковый показатель с индивидуальным веществом

На основе полученных данных выявлены следующие закономерности:

- Все лекарственные композиции на основе новых БПС (**11e**, **11f**, **12f**) эффективны против грамотрицательных штаммов *E. Coli* и *K. pneumoniae*.
- «Пустые» композиции (без ЧАС) проявляют гораздо меньшую активность, чем в комбинации с активными компонентами.
- Среди композиций самой активной является комбинация ЧАС со смесью спиртов пропанол/изопропанол/вода (2:1:2 по объему), которая немного превосходит по антибактериальным свойствам комбинация ЧАС с 63.5% раствором изопропанола. Феноксизтанол в используемой концентрации оказался менее эффективным. Так, значения МБК для **11e** на референс штамме *K. pneumoniae* и **12f** на клиническом штамме *K. pneumoniae* не отличались от уровня МБК индивидуальных веществ.
- Все лекарственные композиции на основе новых БПС (**11e**, **11f**, **12f**) превосходили по антибактериальной активности на грамотрицательные штаммы коммерчески доступный бензалкония хлорид (**БАХ**) в тех же комбинациях. Соединения **11e** и **12f** в смеси с 63.5% изопропанолом оказывали большую активность против референс и клинического штаммов *E. coli* и клинического штамма *K. pneumoniae* по сравнению с октенидином (**ОКТ**) в той же композиции. Бис-ЧАС **12f** в комбинации со смесью спиртов пропанол/изопропанол/вода (2:1:2 по объему) было сравнимо по микробиологической активности с октенидином (**ОКТ**) в той же комбинации.

Таким образом, нами были разработаны новые лекарственные композиции на основе биспиридиновых солей, проявляющих широкий спектр антибактериальной и противогрибковой активности, превосходящие по своим микробиологическим свойствам коммерчески доступные антисептические препараты.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны подходы к синтезу новых *мета*-, *орто*- и *пара*-замещенных биспиридиновых солей на основе нелинейных ароматических спейсеров (фенил, бифенил, дифениловый эфир, терфенил) с варьирующейся длинной алкильной цепи, изучены их физико-химические и микробиологические свойства.

2. На основе полученных данных установлены соединения-лидеры среди всех серий синтезированных биспиридиновых солей, обладающие выраженными биоцидными свойствами одновременно с низкой цитотоксичностью по сравнению с современными коммерческими антисептиками.

3. Выделены тренды зависимости микробиологической активности от структур веществ на основе следующих критериев: влияние длины алкильной цепи, противоиона биспиридиновых солей, количества колец в ароматическом спейсере, структуры спейсера, положения замещения в пиридиновом кольце. Установлены следующие закономерности: оптимальная длина хвоста для лучшей активности составляет от 8 до 11 углеродов в цепи и зависит от длины спейсера между головками пиридина; при увеличении количества ароматических ядер спейсера в *мета*-замещенных биспиридиновых солях

активность против патогенных грамотрицательных бактерий растет; самыми эффективными соединениями против широкого спектра бактерий и грибов являются *пара*-замещенные биспиридиновые соли; противоион не сильно влияет на активность молекулы, но бромиды оптимальные и самые удобные для синтеза.

4. Зафиксирована высокая активность полученных биспиридиновых солей на мультирезистентных клинических штаммах и бактериальных биопленках, превосходящая таковую у широко используемого антисептика бензалкония хлорида.

5. Обнаружена низкая резистентность *E. coli* и *A. baumannii* к биспиридиновым солям с бифенилом и дифениловым эфиром в роли спейсера. Соединения-лидеры сохраняли свою эффективность после 40 дней инкубации.

6. На основе получившихся соединений созданы лекарственные композиции в комбинации с различными спиртами (феноксизтанолом, пропанолом, изопропанолом) по аналогии с коммерчески доступными антисептиками и протестированы на грамотрицательных бактериальных штаммах. Установлено, что действующее вещество в смеси с водным раствором изопропанола и пропанола оказывает более выраженное биоцидное действие по сравнению с индивидуальными веществами.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. A. N. Vereshchagin, **N. A. Frolov**, V. Y. Konyuhova, K. A. Hansford, M. P. Egorov / Synthesis and microbiological properties of novel bis-quaternary ammonium compounds based on 4,4'-oxydiphenol spacer // *Mendelev Communications*, **2019**, 29(5), 523-525. Doi: 10.1016/j.mencom.2019.09.015

2. A. N. Vereshchagin, A. M. Gordeeva, **N. A. Frolov**, P. I. Proshin, K. A. Hansford, M. P. Egorov / Synthesis and Microbiological Properties of Novel Bis-Quaternary Ammonium Compounds Based on Biphenyl Spacer // *European Journal of Organic Chemistry* **2019**, 26, 4123-4127. Doi: 10.1002/ejoc.201900319

3. A. N. Vereshchagin, **N. A. Frolov**, V. Y. Konyuhova, E. O. Dorofeeva, K. A. Hansford, M. P. Egorov / Synthesis and biological evaluation of novel bis-quaternary ammonium compounds with p-terphenyl spacer // *Mendelev Communications* **2020**, 30(4), 424-426. Doi: 10.1016/j.mencom.2020.07.006

4. A. N. Vereshchagin, **N. A. Frolov**, V. Y. Konyuhova, E. A. Kapelistaya, K. A. Hansford, M. P. Egorov / Investigations into the structure–activity relationship in gemini QACs based on biphenyl and oxydiphenyl linker // *RSC Advances* **2021**, 11(6), 3429-3438. Doi: 10.1039/D0RA08900A

5. A. N. Vereshchagin, **N. A. Frolov**, K. S. Egorova, M. M. Seitkalieva, V. P. Ananikov / Quaternary Ammonium Compounds (QACs) and Ionic Liquids (ILs) as Biocides: From Simple Antiseptics to Tunable Antimicrobials // *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22(13), 6793. Doi: 10.3390/ijms22136793

6. **N. A. Frolov**, K. A. Fedoseeva, K. Hansford, A. N. Vereshchagin / Novel phenyl based bis-quaternary ammonium compounds as broad-spectrum biocides // *ChemMedChem*, Accepted, **2021**. Doi: 10.1002/cmdc.202100284

7. A. N. Vereshchagin, **N. A. Frolov**, M. P. Egorov / Dimeric pyridinium quaternary salts, having biocidal action // RU2689419, **2019**.

8. **Frolov N.A.**, Vereshchagin A.N. Synthesis of new bis-pyridinium salts with diphenyl and diphenyl ether spacer // Book of Abstracts of the Fifth International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing». Vol. 1, p. 136. Poster presentation. Moscow, RUDN University, 22–26 April **2019**.

9. **Фролов Н. А.**, Верещагин А. Н. Синтез новых замещенных биспиридиновых солей с нелинейными спейсерами // VIII Молодежная конференция ИОХ РАН: Сборник тезисов докладов: 22-23 мая 2019 г., Москва. – Москва: МАКС Пресс, **2019**. – с. 42. Устный доклад.

10. Капелистая Е. А., **Фролов Н. А.**, Верещагин А. Н. Получение новых орто-замещенных биспиридиновых солей на основе бифенила и бифенилового эфира // VII Молодежная конференция ИОХ РАН: Сборник тезисов докладов: 22-23 мая 2019 г., Москва. – Москва: МАКС Пресс, **2019**. – с. 111. Стендовый доклад.

11. Конюхова В. Ю., **Фролов Н. А.**, Верещагин А. Н. Синтез солей биспиридиния на основе бифенила и бифенилового эфира с антибактериальной активностью // VIII Молодежная конференция ИОХ РАН: Сборник тезисов докладов: 22-23 мая 2019 г., Москва. – Москва: МАКС Пресс, **2019**. – с. 119. Стендовый доклад.

12. Капелистая Е. А., **Фролов Н. А.**, Верещагин А. Н., «Синтез орто-замещенных биспиридиновых солей на основе бифенила и бифенилового эфира». Тезисы XXI Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Часть 3, том 5, Секция 10, с. 180. Медицинская химия: фундаментальные и прикладные аспекты. Стендовый доклад. Санкт-Петербург, 9-13 сентября **2019** г. ISBN - 978-5-6043248-4-4.

13. Конюхова В. Ю., **Фролов Н. А.**, Верещагин А. Н., «Синтез биспиридиновых солей на основе бифенила и бифенилового эфира с антимикробной активностью». Тезисы XXI Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Часть 3, том 5, Секция 10, с. 187. Медицинская химия: фундаментальные и прикладные аспекты. Стендовый доклад. Санкт-Петербург, 9-13 сентября **2019** г. ISBN - 978-5-6043248-4-4.

14. **Фролов Н. А.**, Верещагин А. Н., «Синтез новых пара-замещенных биспиридиновых солей на основе бифенила и бифенилового эфира». Тезисы XXI Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Часть 3, том 5, Секция 10, с. 258. Медицинская химия: фундаментальные и прикладные аспекты. Стендовый доклад. Санкт-Петербург, 9-13 сентября **2019** г. ISBN - 978-5-6043248-4-4.

15. **Frolov N. A.**, Konyuhova V. U., Vereshchagin A. N. Synthesis of new meta-substituted bis-pyridinium salts with aromatic spacers // Catalysis and Organic Synthesis ICCOS-2019. Book of abstracts: Moscow, Russia. September 15-20, **2019**. – p. 124. Poster presentation.