

УДК 547.639 + 615.281

АНТИМІКРОБНА ТА ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ КАЛІКСАРЕНІВ

Р.В.Родік

Інститут органічної хімії НАН України

02660, м. Київ, вул. Мурманська, 5. E-mail: manli@ioch.kiev.ua

Ключові слова: каліксарени; бактерицидна активність; протівірусна активність; фунгіцидна дія; протитуберкульозна активність

Каліксарени – це перспективний клас макроциклічних сполук, який широко використовується у дизайні біологічно активних речовин. Серед каліксаренів є сполуки з антитромботичною та протипухлинною дією, блокатори аніонних каналів та модулятори катіонних pomp, селективні інгібітори ферментів та сполуки, що моделюють їх дію. В останні роки інтенсивно досліджується антимікробна та протівірусна активність каліксаренів. В даному огляді систематизовані дані по бактерицидній, фунгіцидній, протитуберкульозній та протівірусній активності модифікованих каліксаренів. Наведені дані про механізми дії різних типів каліксаренів на біооб'єкти. Встановлено, що основою антимікробної дії більшості каліксаренів є взаємодія з компонентами зовнішньої мембрани або клітинної стінки. Функціоналізація каліксаренової платформи фармакофорними групами, які чинять антимікробну дію, не завжди призводить до збільшення очікуваної активності. Найбільшу антибактеріальну дію мають полікатіонні каліксарени, в той час як поліаніонні макроцикли інгібують активність вірусів. Каліксарени, модифіковані циклопептидними фрагментами, є селективними блокаторами важливих глікопротеїнів клітин бактерій. Вони є міметиками ванкомицину за механізмом дії та рівнем бактерицидної активності. Неіонний водорозчинний каліксарен з поліетиленглікольними групами має унікальний механізм протитуберкульозної дії. Він пригнічує ріст *M. tuberculosis* всередині клітин-макрофагів людини. Наведені хіміотерапевтичні індекси досліджуваних сполук становлять більше десяти одиниць, що свідчить про їх низьку цитотоксичність.

THE ANTIMICROBIAL AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF CALIXARENES

R. V. Rodik

Key words: calixarene; bactericidal activity; antiviral activity; fungicidal activity; antituberculosis activity

Calixarenes is a promising class of macrocyclic compounds, which are widely used in the design of biologically active substances. Among calixarenes there are anion channel blockers and modulators of cationic pumps, selective enzyme inhibitors and compounds simulating their action, substances with the antithrombotic and antitumour effect. The antimicrobial and antiviral activities of modified calixarenes have been intensively studied in recent years. The results on bactericidal, fungicidal, antituberculosis, as well as antiviral activity of calixarenes have been systematized and analyzed in this review. The data about the mechanisms of action of different types of calixarenes on biological objects are presented. It has been found that the basis of the antimicrobial action of many calixarenes is the interaction with the components of the outer membrane or cell wall. Moreover, functionalization of the calixarene platform with pharmacophoric groups possessing the antimicrobial activity does not always lead to increase in the expected activity. Polycationic calixarenes show the highest antibacterial action, while polyanionic macrocycles inhibit the activity of viruses. Calixarenes modified with cyclopeptide fragments are selective binders and blockers of important bacterial cell glycoproteins. They are mimetics of vancomycin by their mechanism of action and the level of the bactericidal activity. The water soluble calixarene with polyethylene glycol groups has a unique mechanism of the antituberculosis action. It inhibits the growth of *M. tuberculosis* inside human macrophage cells. The chemotherapeutic indexes of the compounds studied are more than ten units, indicating their low cytotoxicity.

ПРОТИВОМИКРОБНАЯ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ КАЛИКСАРЕНОВ

Р.В.Родик

Ключевые слова: каліксарени; бактерицидная активність; протівовірусная активність; фунгіцидное действие; протитуберкулёзная активність

Каліксарени – это перспективный класс макроциклических соединений, который широко используется в дизайне биологически активных веществ. Среди каліксаренов есть соединения с антитромботическим и противоопухолевым действием, блокаторы анионных каналов и модуляторы катионных насосов, селективные ингибиторы ферментов и соединения, моделирующие их действие. В последние годы интенсивно исследуется их противомикробная и протівовірусная активність. В данном обзоре систематизированы данные по бактерицидной, фунгіцидной, протівотуберкулёзной и протівовірусной активності модифицированных каліксаренов. Приведены данные о механизмах действия различных типов каліксаренов на биообъекты. Установлено, что в основе противомикробного действия большинства каліксаренов лежит взаимодействие с компонентами внешней мембраны или клеточной стенки. Вместе с тем, функционалізація каліксареновой платформы фармакофорными группами, обладающими противомикробным действием, не всегда приводит к увеличению ожидаемой активності. Наибольшее антибактериальное действие имеют поликатіонные каліксарены, в то время как полианионные макроциклы ингибируют активність вирусов. Каліксарены, модифицированные циклопептидными фрагментами, являются селективными блокаторами важных глікопротеинов клеток бактерий. Они являются миметиками ванкомицина по механизму и уровню бактерицидной активності. Водорастворимый каліксарен с полиетиленглікольными группами имеет уникальный механизм протівотуберкулёзного действия. Он подавляет рост *M. tuberculosis* внутри клеток-макрофагов человека. Приведены химиотерапевтические индексы исследуемых соединений, которые составляют более десяти единиц, что свидетельствует об их низкой цитотоксичности.

Пошук нових антимікробних препаратів, очевидно, ніколи не втратить актуальності. Через швидкий розвиток механізмів стійкості та їх передачу між мікроорганізмами цілі групи антимікробних препаратів втрачають ефективність одна за одною, тому проблема інфекційних захворювань, що не піддаються терапії, може стати з такою ж гостротою, як і в період до відкриття антибіотиків [1].

Можливим вирішенням питання постійного пристосування мікроорганізмів і особливо бактерій могло б бути введення у практику все нових і нових антибіотиків. Однак в наш час спостерігається зниження кількості ліцензування нових препаратів у цій галузі: так, за останні десятиріччя у клінічну практику введено лише два нових класи антибіотиків (оксазолідинони та ліпопептиди) [2]. Тому все активніше ведеться пошук препаратів, які б відповідали антибіотикам за ефективністю дії, проте не викликали стійкості у мікроорганізмів. До таких препаратів та засобів відносять бактеріофаги, ферменти, що викликають лізис, антимікробні пептиди вищих організмів, а також природні сполуки з антимікробною дією та їх синтетичні аналоги [3, 4]. Однак головною проблемою пошуку нових речовин природного походження часто є нерівноцінне співвідношення затраченого на скринінг часу та отриманих результатів.

Іншим сучасним методом створення біологічно активних сполук є молекулярний дизайн на основі структури мішені [4, 5]. Такої мішенню в широкому сенсі може бути позаклітинний, мембранозв'язаний або внутрішньоклітинний білок чи пептид, рідше небілкові молекули (вуглеводи, ліпіди, нуклеїнові кислоти) або їх супрамолекулярні комплекси. Якщо розглядати саме антимікробну активність, то такими мішенями зазвичай є компоненти зовнішньої мембрани або клітинної стінки бактерій, простіших або грибів та капсид або ліпідна оболонка вірусів. Найбільш поширений механізм дії антибіотиків природного походження спрямований на порушення синтезу клітинної стінки або порушення цілісності цитоплазматичної мембрани, що веде до порушення мембранного потенціалу клітин мікроорганізму. Тому при створенні нових високоефективних бактерицидних, фунгіцидних та противірусних сполук було б доцільним моделювання природних механізмів з використанням у якості мішені бактеріальної стінки, зовнішньої мембрани клітин або оболонки вірусів.

Потенційно ефективними антимікробними препаратами розглядаються макроцикли. Макроциклічним молекулам притаманна певна конформаційна організація, яку іноді порівнюють з доменною організацією біологічних макромолекул, яка

дозволяє досягти достатнього рівня специфічності взаємодії з біомішенями [6]. Разом з тим, макроциклічні сполуки відзначаються гнучкістю та різноманітним конформаційним переходом, що є надзвичайно важливим для біохімічних взаємодій. Однією з перспективних груп макроциклічних сполук, що використовуються у молекулярному дизайні антимікробних агентів, є калікс[*n*]арени. Калікс[*n*]арени – це макроциклічні сполуки, які отримують прецизійною циклоконденсацією *n*-заміщених фенолів та формальдегіду [7]. Завдяки наявності високоорганізованої ліпофільної порожнини, утвореної бензольними кільцями, модифіковані каліксарени здатні розпізнавати, зв'язувати у стійкі комплекси та розділяти близькі за властивостями катіони, аніони та нейтральні молекули [8, 9]. На теперішній час описано та запатентовано використання каліксаренів як сполук з бактерицидною, противірусною та фунгіцидною дією [10-12].

1. Бактерицидна активність

Бактерицидна дія солей срібла широко відома. Тому було синтезовано та досліджено металокомплекси каліксрезорцинарен-краун-етеру **1** з Ag(I). Такі комплекси у вигляді плівок, отриманих по технології Ленгмюр-Блоджет, інгібують ріст клітин *E. coli* при контактній дії [13]. У випадку застосування комплексів каліксаренів ріст склав лише 7% від контролю, в той час як окремо каліксарен або еквімолярний розчин нітрату срібла зменшував ріст до 72-85% відносно контролю (схема 1).

Каліксаренові міметики ванкомицину **2а,б** в яких каліксаренова платформа функціоналізована пептидним містком, що містить D-, або L-аланільні залишки проявили значну антибактеріальну активність [14, 15] (схема 2).

Бактерицидна активність проти грампозитивних бактерій каліксаренів **2** коливається від середніх до високих значень, хоча менша за ванкомицин (табл. 1). Каліксарени **2** подібно ванкомі-

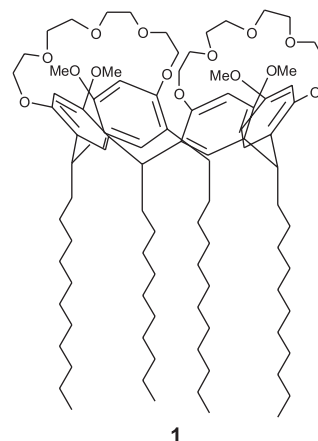
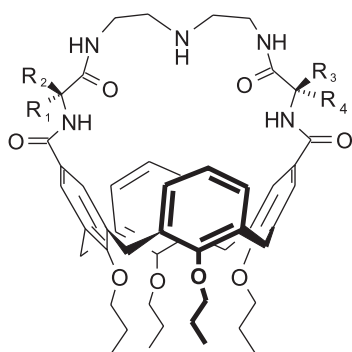


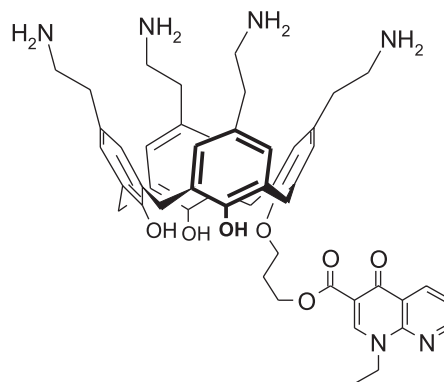
Схема 1



2a,b

a: $R_1 = R_3 = H, R_2 = R_4 = CH_3$;b: $R_2 = R_4 = H, R_1 = R_3 = CH_3$

Схема 2



3

Схема 3

Таблиця 1

In vitro активність пептидокаліксаренів **2a,b** та ванкоміцину проти деяких грампозитивних бактерій

Вид	Мінімальна інгібуюча концентрація, (МІК), мг/л		
	ванкоміцин	2a	2b
<i>S. aureus</i> 663	2	8	8
<i>S. aureus</i> 853	2	16	8
<i>S. aureus</i> 1131	2	4	4
<i>S. epidermidis</i>	2	4	8
<i>B. cereus</i>	2	16	НД

S. aureus 663 – пеніцилін-чутливий штам, *S. aureus* 853 – пеніцилін-стійкий штам, *S. aureus* 1131 – метицилін-стійкий штам, НД – не досліджувалось.

цину є неактивними по відношенню до грибів та дріжджів. Крім того, вони також не проявляють активності до бактерій, які не продукують клітинну стінку, наприклад, *Acholeplasma laidlawii*. Це свідчить про те, що молекулярна мішень **2** бере участь у формуванні клітинної стінки. Каліксарени **2** як і ванкоміцин не є клітинними токсинами, їх активність направлена тільки проти певних бактеріальних протеїнів.

Дослідження з використанням дифузних вимірювань ЯМР свідчать про те, що антибіотична активність **2** є наслідком зв'язування цими каліксаренами діаланільного залишку протеїну-прекурсорю клітинної стінки бактерій. Розраховане з ЯМР експериментів значення $\log K_a$ у розчині $CDCl_3$, що містив 3% DMSO- d_6 для комплексу **2b** з N-ацетил-L-ала-L-аланіном, складає 3,4 [16, 17]. Природа цих взаємодій є складною, оскільки дані каліксарени містять багато функціональних груп різного типу. Вірогідно мають місце електростатичні, СН- π , гідрофобні та диполь-дипольні взаємодії і утворення міжмолекулярних водневих зв'язків.

Таблиця 2

Значення МІК для каліксарену **3** та сполуки порівняння – налідиксової кислоти

Сполука	Каліксарен 3		Налідиксова кислота	
	мМоль/л	мг/л	мМоль/л	мг/л
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25	35	100	23
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	50	70	200	46
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	50	70	200	46
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	100	140	200	46
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	100	140	200	46

Каліксарени, модифіковані відомими фармакофорними групами з бактерицидною активністю, також виявляють антибактеріальну дію. Прикладом є водорозчинний кон'югат каліксарену з налідиксовою кислотою **3** [18], яка є відомим антимікробним агентом хінолонового ряду. В даному випадку бактерицидну активність таких каліксаренів автори пов'язують не з кооперативною дією фармакофорної групи та макроциклічного кістяку, а з доставкою активної сполуки в клітини до місця дії. Каліксарен виступає як переносчик, ферменти бактерії гідролізують естерний зв'язок та вивільняють фармакофорні налідиксові залишки.

Даний каліксарен проявив помірну антибактеріальну активність, результати наведені у табл. 2 (схема 3).

Як видно з даних табл. 2, у ваговому вираженні каліксарен має меншу активність, ніж налідиксова кислота. Але аналіз діючих молярних концентрацій вказує на 2-4-и кратну перевагу каліксарену **3**. Автори припускають, що його дія як переносчика цим не обмежується, і крім того існує кооперативний ефект амінокаліксарену (продукту гідролізу **3**) та налідиксової кислоти. Автори також синтезували ряд каліксаренів, модифікованих 2-ма хінолоновими або пеніциліновими-

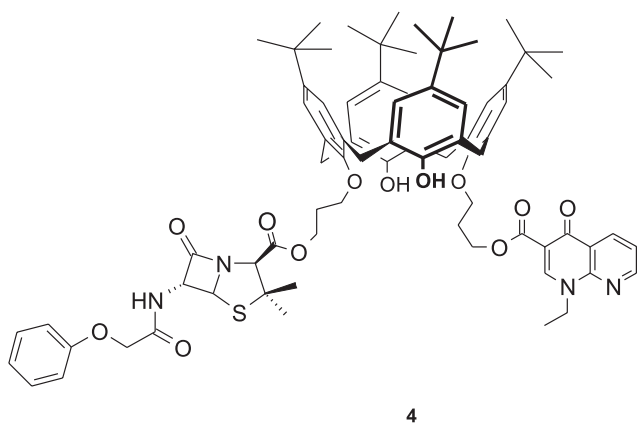


Схема 4

ми фрагментами [19-21], але бактерицидна активність даних сполук описана не була. Разом з тим, каліксарен **4**, модифікований одним хінолоновим та одним пеніциліновим фрагментом, показав деяку активність [22] (схема 4).

За даними авторів істотні бактерицидні властивості каліксарен **4** проявив тільки проти штаму золотистого стафілокока *S. aureus* ATCC 25923, але кількісні дані наведені не були.

Гексанатрієва сіль каліксарен-тетраоцтової кислоти **5** з бістіазолільними групами також проявила невисоку активність проти одного зі штамів золотистого стафілокока (*S. aureus* ATCC 25923) з МІК (128 мг/л). На інші тест-культури (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 та *P. aeruginosa* ATCC 27853) вона не впливала [23] (схема 5).

Слід відзначити, що вихідні каліксарен-тетраоцтові кислоти проявляють значну антивірусну активність.

Відомо, що такі антибактеріальні препарати як декаметоксин, етоній є двозарядними катіонними сполуками, які ефективно взаємодіють з мембранами бактерій та порушують їх функціонування, що викликає загибель клітин. Цілком логічно, що каліксарени модифіковані позитивно зарядженими групами і інтенсивно досліджувались в якості бактерицидних сполук. Одним з

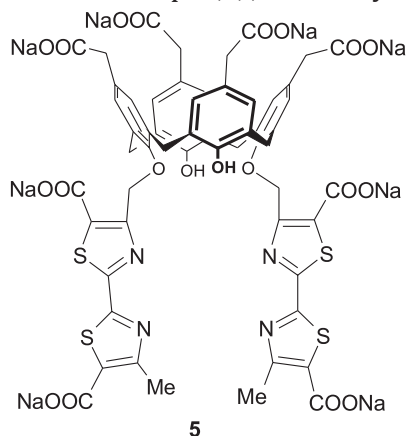


Схема 5

перших було досліджено водорозчинний тетрагуанідинокаліксарен, протонований трифтороцтовою кислотою **6** [24-27] (схема 6).

В даному випадку катіонний центр є плоским, тому що центральний атом вуглецю гуанідинового фрагменту має sp^2 -гібридизацію, і така його будова сприяє утворенню водневих зв'язків з фосфатними залишками глікопротеїнів мембрани.

Бактерицидна активність каліксарену **6** порівнювалась з гексамідином, антисептиком з двома амідиноними групами, та бісгуанідином, синталаїном А [28], значення мінімальних інгібуючих та бактериостатичних концентрацій (МБК) яких наведені у табл. 3.

Як видно з табл. 3, гуанідинокаліксарен **6** та антисептик гексамідин мають близьку активність. Проте порівняння цитотоксичності цих сполук однозначно вказує на перевагу каліксарену. Якщо для гексамідину співвідношення IC_{50} (клітинні лінії HaCat та MRC5) до МІК на даних культурах є в межах від 1 до 37, тобто мінімальна інгібуюча концентрація для бактерій не набагато нижче за концентрацію, що викликає загибель 50% клітин, то для каліксарену **6** дане співвідношення є в межах 12-135, тобто він володіє значно меншою токсичністю [29].

Каліксарен **7**, модифікований чотирма морфоліновими групами, у водних розчинах є позитивно-зарядженим за рахунок автопротонування азоту достатньо кислими гідроксильними групами [30]. Його було досліджено на ряді штамів грам позитивних та грам негативних бактерій та на грибах [31]. Бактерицидна активність **5** є значною: МІК в діапазоні 4-16 мг/л для грам позитивних тест-культур (роди *Staphylococcus*, *Streptococcus* та *Bacillus*) та 4-8 мг/л для грам негативних бактерій (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klensilla*, *Salmonella*) (схема 7).

Автори [32] провели дослідження взаємозв'язків між будовою та бактерицидною дією ряду катіонних калікс[4]аренів. Тетрапропокси каліксарени **8-10** проявили значну антибактеріальну активність (табл. 4), а їх тетраоктильні аналоги, які утворюють міцели у водних розчинах, виявились

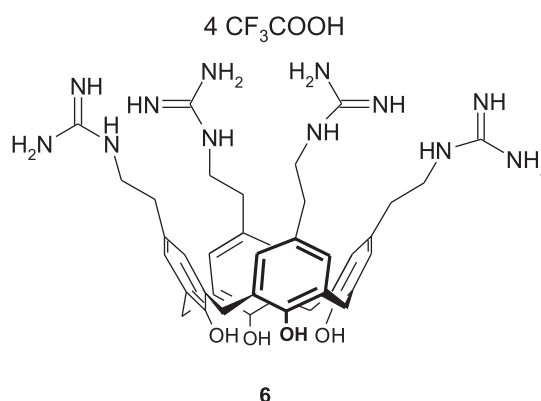


Схема 6

Таблиця 3

МІК та МБК (мг/л) для тетрагуанідинокаліксарену **6** та сполук порівняння

Сполука	Каліксарен 6		Гексамідин		Синталін А	
	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК
Музейні штами						
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	256	8	256	64	256
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	8	256	4	128	64	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	8	256	<1	128	16	>512
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	32	>256	2	128	256	>512
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	32	256	32	>512	128	>512
Клінічні штами						
<i>E. coli</i> (продукує пеніциліназу)	2	256	8	64	64	>512
<i>S. aureus</i> (метицилін-стійкий)	8	256	2	64	64	64
<i>E. faecium</i> (інактивує ванкоміцин)	8	128	2	64	256	>512
<i>E. faecalis</i> (інактивує ванкоміцин)	64	256	4	256	>256	>512
<i>P. aeruginosa</i> (надвисока активність ефлюкських помп)	64	>256	64	>512	256	>512

Таблиця 4

Значення МІК для каліксаренів **8-10**, мг/л (мкМ)

Сполука	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	<i>E. coli</i> ATCC 25922
8	≤10 (≤9)	50 (45)	≤10 (≤9)	≤10 (≤9)
9	≤10 (≤9)	1000 (870)	100 (90)	100 (90)
10	≤10 (≤5)	50 (26)	500 (260)	500 (260)

неактивними. Це узгоджується з даними по бактерицидній дії катіонних четвертинних амонійних солей, вона є слабкішою у мицелярних сполук, ніж у тих, що перебувають у вигляді молекулярного розчину при однакових концентраціях [33].

Найбільшу активність проявив каліксарен **8**, функціоналізований метилімідазолієвими групами. Це пояснюється тим, що ці групи мають плоску будову, яка полегшує їх кооперативну взаємодію з бактеріальною мембраною (схема 8).

Також була перевірена здатність каліксаренів **8-10** інгібувати ріст бактеріальних біоплівків. Відомо, що колонії бактерій у формі плівок є значно стійкішими до дії антибіотиків та антисептиків. Виявилось, що каліксарен **10** здатен інгібувати ріст біоплівків при концентраціях вище 50 мг/л [32].

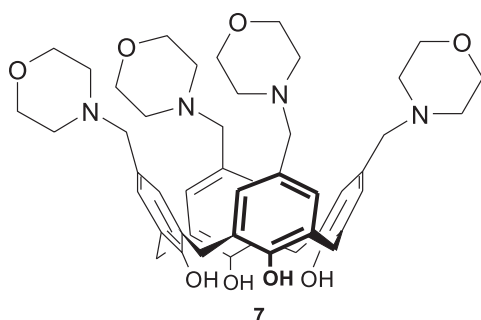


Схема 7

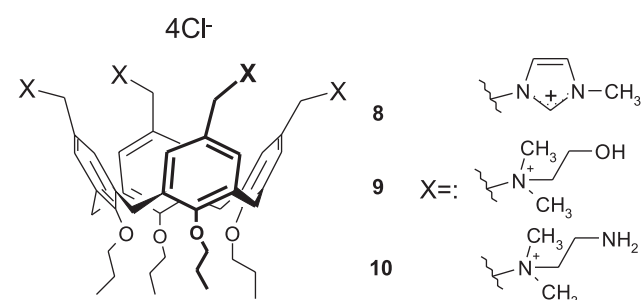


Схема 8

Загальний механізм дії катіонних каліксаренів на грамнегативні бактерії було досліджено на каліксаренах **11** та **12** [34] (схема 9).

Методами ЯМР- та УФ-титрування було встановлено, що вони взаємодіють з ліпополісахаридами зовнішнього шару плазмалемі грамнегативних бактерій. Така взаємодія пригнічує процес росту та поділу бактеріальної клітини, і таким чином проявляються бактеріостатичний та бактерицидний ефекти.

2. Протитуберкульозна активність

Відомо, що ліпофільні спирти та феноли функціоналізовані поліоксіетиленовими групами (ПЕГ-групами) впливають на розвиток туберкульозної інфекції всередині клітин організму, хоча не ді-

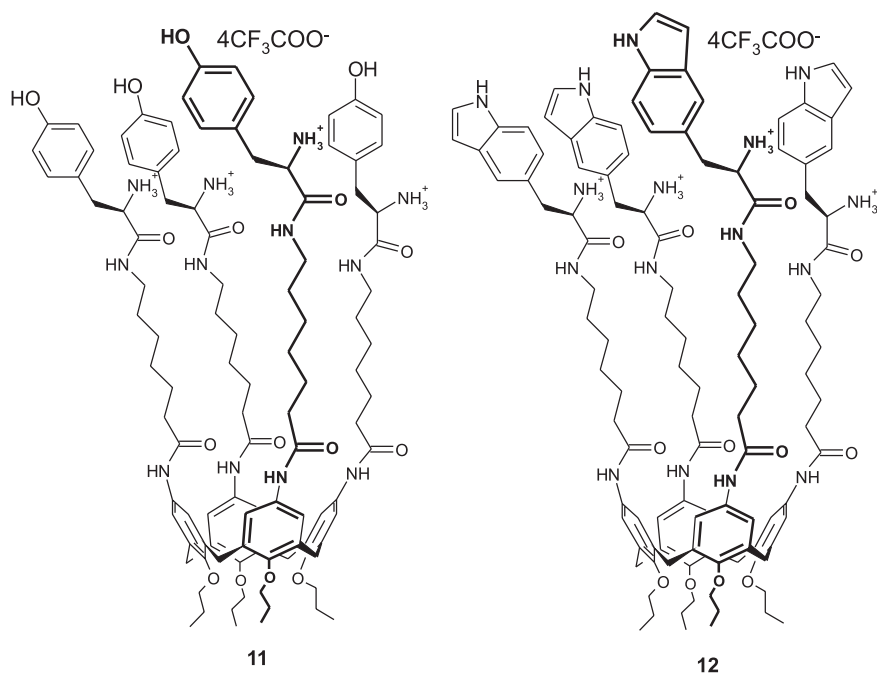


Схема 9

ють на саму мікобактерію. Авторами [35, 36] було здійснено синтез каліксаренів, модифікованих по нижньому вінцю макроциклу ПЕГ-групами різної довжини. Виявилось, що дані каліксарени проявляють сильний пролонгований ефект на перебіг туберкульозу, викликаного внутрішньоочеревинним введенням мишам мікобактерій виду *Mycobacterium tuberculosis* [37]. Так, каліксарен **13a** має антитуберкульозну дію, в той час як **13b** ускладнює перебіг туберкульозу [38] (схема 10).

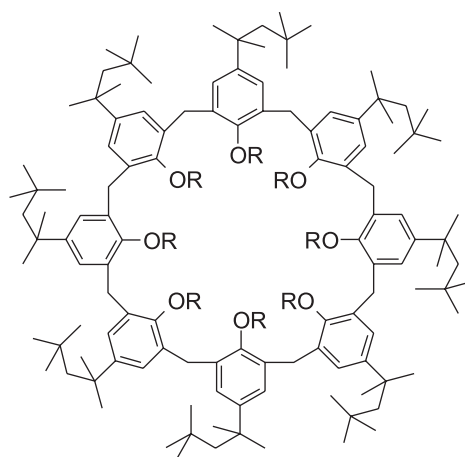
Детальні дослідження були проведені на черевних макрофагах мишей жіночої статі (лінія альбіносів Паркса), які оброблялись розчином **13a** або **13b** з концентрацією 5 мг/мл, а потім мікобактеріями *M. tuberculosis*. Було показано, що ріст *M. tuberculosis* всередині макрофагів був пригнічений каліксареном **13a** і навпаки, стимульований каліксареном **13b**. Загальна ліпазна активність змінювалась аналогічно. Цей факт свідчить про те, що ліпіди та ліпідний обмін беруть участь у процесах, викликаних каліксаренами в експериментальних тварин, заражених *M. tuberculosis*. Тобто, має місце унікальний механізм, в якому клітини інфікованого хазяїна відіграють важливу роль і який є відмінним від дії всіх інших лікарських речовин, що застосовуються проти туберкульозу. Так як стійкість *M. tuberculosis* до звичайної терапії лікарськими засобами зростає, нові підходи до лікування туберкульозу є актуальними.

Катіонний водорозчинний гуанідинокаліксарен **6** та його похідні, модифіковані біс-гетероциклічними групами **14** та **15**, також є сильними протитуберкульозними агентами [39, 40]. Вони виявили здатність пригнічувати ріст двох штамів *M. tuberculosis*: H₃₇Rv та стійкого до відомого проти-

туберкульозного агента ізоніазиду штаму MYC1565. Причому в останньому випадку ефективність каліксаренів **6**, **14** та **15** вища, ніж у комерційних антибіотиків (табл. 5) (схема 11).

3. Протигрибкова активність

Протигрибкову активність проявляють сульфonatoкалік[*n*]арени **16-19** [41]. Їх досліджували проти таких видів грибів-патогенів культурних рослин: *Colletotrichum dematium* MAFF №840066, *Fusarium solani f. sp. mori* MAFF №840046 та *Rossellinia necatrix* MAFF №840051. В умовах дослідження дані каліксарени пригнічували ріст патогенів на 60-70% (схема 12).



13a,b

R = O(CH₂CH₂O)_nC₂H₅

a: n = 12.5

b: n = 60.0

Схема 10

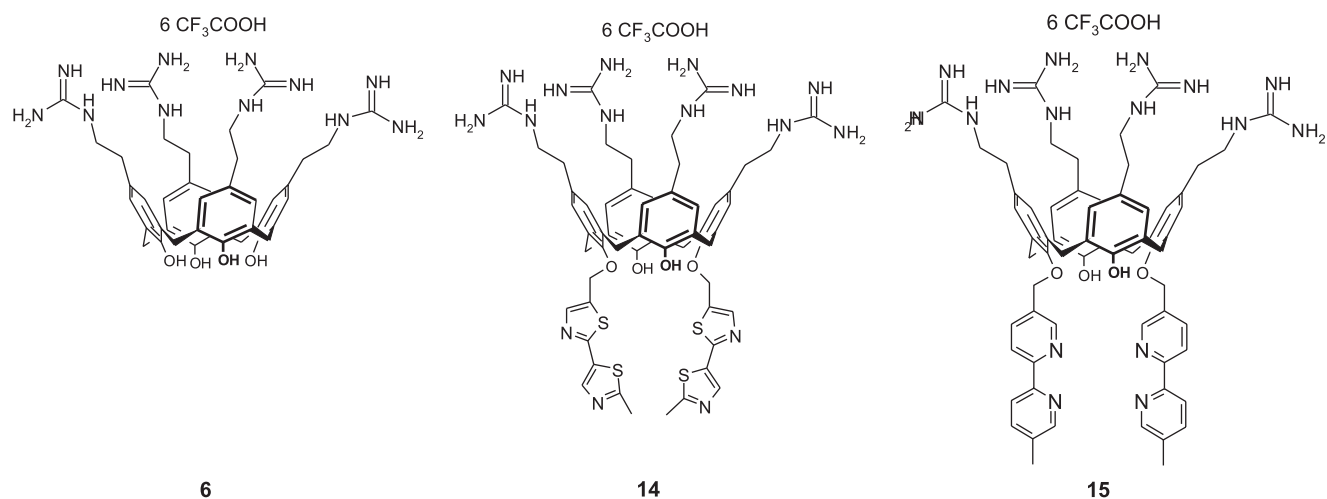


Схема 11

Таблиця 5

МІК для тетрагуанідинокаліксаренів 10-12 та сполук порівняння проти двох штамів *M. tuberculosis*

Сполука	H ₃₇ Rv		MYC1565	
	мг/л	мкМ	мг/л	мкМ
6	1,0	0,8	1,0	0,8
14	2,69	1,6	0,17	0,1
15	1,51	0,8	0,75	0,4
Ізоніазид	0,8	2,5	1,7	12,5
Ципрофлоксацин	0,08	0,6	0,8	2,5

Метил- та адамантилімідазолієві тетракатіонні каліксарени **20-22** показали помірну фунгіцидну активність проти дріжджового гриба *Candida tenuis*, але низьку стосовно цвільового гриба *Aspergillus niger* [42]. Автори визначили мінімальну фунгістатичну та мінімальну фунгіцидну концентрації (МФСК та МФЦК відповідно, табл. 6), але даних стосовно механізму дії запропоновано не було (схема 13).

Синтезовані та досліджені кон'югати каліксаренів з чотирма залишками амфотерицину Б (АмБ) **23а,б** [43]. Дані каліксарени знаходяться у конформації конус, що копіює структуру транс-мембранної пори. Протигрибкова активність кон'югатів **23** є близькою або вищою за АмБ зі значеннями МІК 0,1 та 0,25 мкМ відповідно (табл. 7) (схема 14).

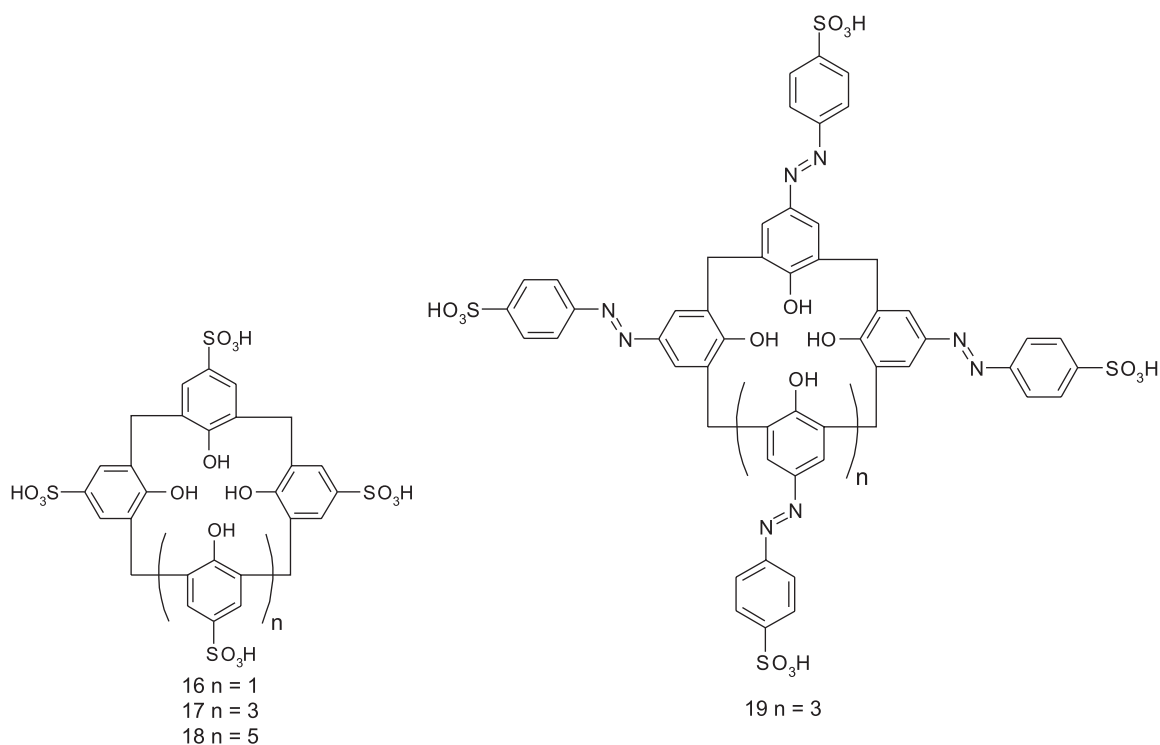


Схема 12

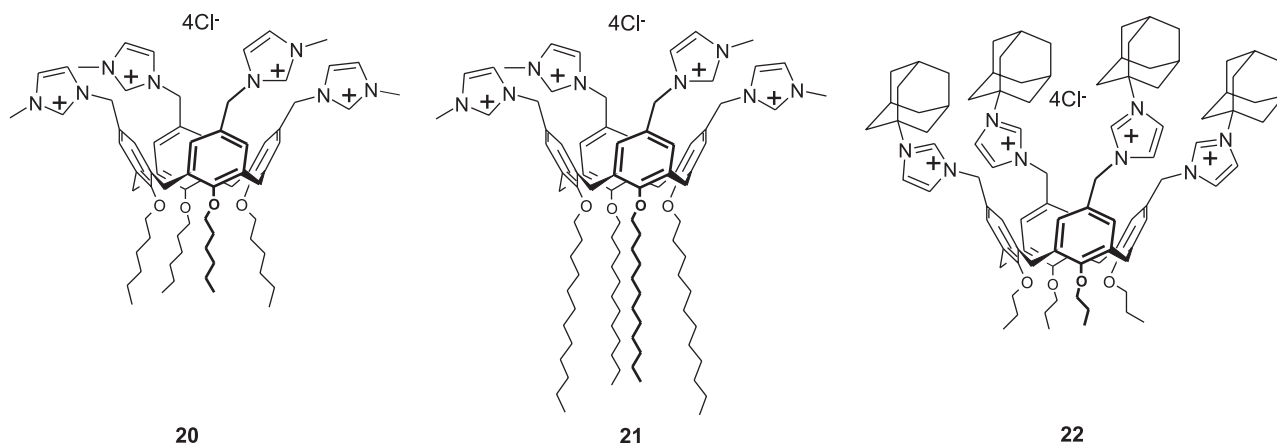


Схема 13

Таблиця 6

Показники МФСК та МФЦК каліксаренів **20-22**, отримані методом серійних розведень

Сполука	Candida tenius		Aspergillus niger	
	МФСК, мг/л	МФЦК, мг/л	МФСК, мг/л	МФЦК, мг/л
20	15,6	62,5	250,0	–
21	62,5	125,0	–	–
22	31,2	125,0	250,0	–

Кон'югати **23** здатні викликати вихід іонів калію з везикул, що свідчить про формування ними каналів у мембранах відповідної товщини. Така здатність властива і самому амфотерицину, отже автори вважають, що саме цим пояснюється фунгіцидна дія каліксаренів **23**. В той же час токсичність каліксаренів є на порядок меншою, ніж у амфотерицину.

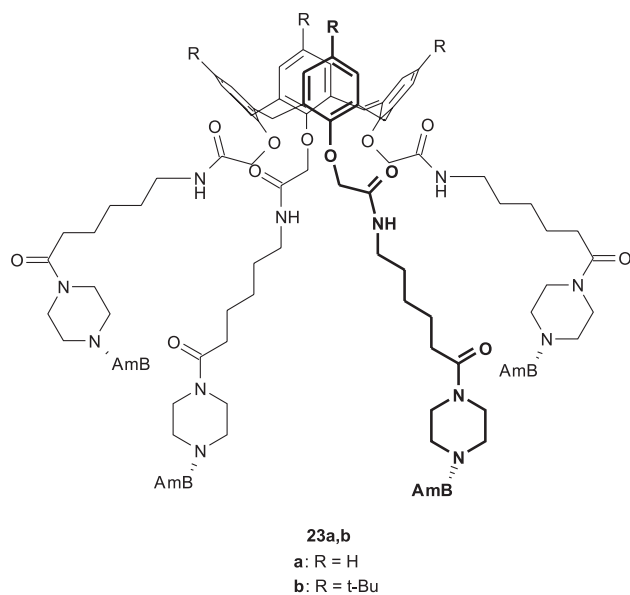


Схема 14

Таблиця 7

МІК та EH_{50} значення для АмБ та каліксаренів **23a,б**

Сполука	МІК BY4741, мкМ	EH_{50} , мкМ
АмБ	0,30	4,0
23a	0,10	50
23б	0,25	40

BY4741 – *S. cerevisiae* клітинна лінія; EH_{50} : концентрація, яка викликає 50% виходу гемоглобіну з еритроцитів людини.

4. Протівірусна активність

На теперішній час в якості протівірусних засобів найчастіше використовуються аналоги нуклеозидів. Ці сполуки пригнічують реплікацію вірусів завдяки інгібуванню ферментів, необхідних для дозрівання нуклеїнових кислот, або утворюючи спотворений вірусний геном, що викликає дочасне припинення реплікації ДНК вірусів. В інших випадках протівірусна терапія базується на блокуванні попадання вірусів у клітину, порушенні синтезу протеїнів на рибосомах клітини-хазяїна, зв'язуванні вірусної ДНК або РНК та імунomodуляції.

Каліксареноподібні похідні хромotropної кислоти **24** та **25** були запатентовані як ефективні протівірусні агенти [44]. Ці сполуки є ефективними інгібіторами проникнення в клітину так званих Enveloped viruses, тобто вірусів що мають додаткову оболонку (суперкапсид), яка складається з фрагментів мембран клітини-господаря та глікопротеїнів вірусу. Вивчення зв'язування макроциклів **24** та **25** з вірусними частинками, наприклад, з вірусами герпесу свідчить, що протівірусна активність пов'язана з адгезією до вірусної оболонки, що унеможливує прикріплення вірусів до клітин-мішеней. Нездатність каліксаренів **24** та **25** протидіяти інфекції, викликаній безобо-

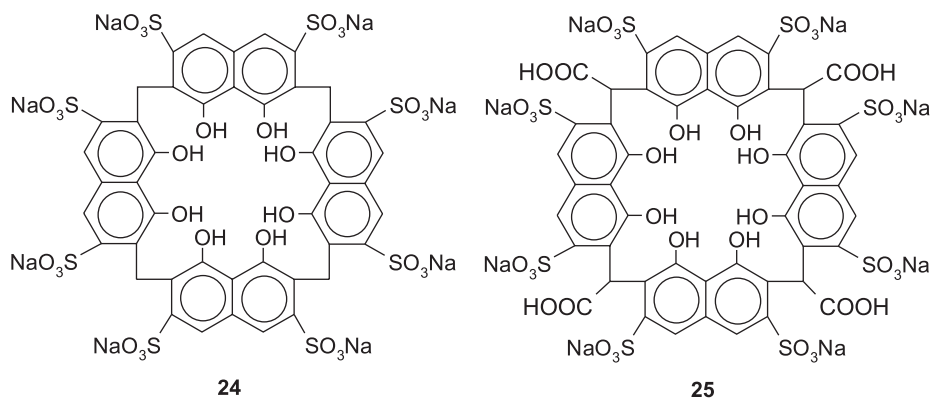


Схема 15

лонковими вірусами, підтверджує цей механізм (схема 15).

Каліксарени **24** та **25** були протестовані *in vitro* проти вірусів простого герпесу 1 та 2 (ВПГ-1, ВПГ-2), ВІЛ, вірусів грипу А та Б та людського респіраторного синцитіального вірусу, аденовірусу та риновірусу. Для досліджень використовувались такі клітинні лінії як НЕР₂, HeLaS₃, Н₉ та VERO. Було показано, що каліксарени **24** та **25** ефективно зменшують цитопатичний ефект, що провокують усі оболонкові віруси. Ефективна доза (ЕД₅₀) проти ВПГ-1 складає 0,7-2,7 мг/л, проти ВПГ-2 – 1-2,7 мг/л. Ці результати є кращими за результати таких лікарських засобів як ацикловір, ганцикловір, фосфоформіат та фосфонометоксіетиладенін. Проти вірусу грипу А значення ЕД₅₀ сполук **24** та **25** складає 5-7,9 мг/л, а проти ВІЛ (штами HTLV-III_B та RF-II) ЕД₅₀ дорівнює 0,07-0,50 мг/л [45, 46].

Калікс[4]пірогалоларенкарбонові кислоти **26** та **27** теж проявили активність проти ВІЛ-1 та ВІЛ-2. Каліксарен **26** зменшує цитопатичний ефект на 50% при концентраціях 10 та 0,03 мкМ відповідно [47], а каліксарен **27** при 0,5 та 1 мкМ [48-50] (схема 16).

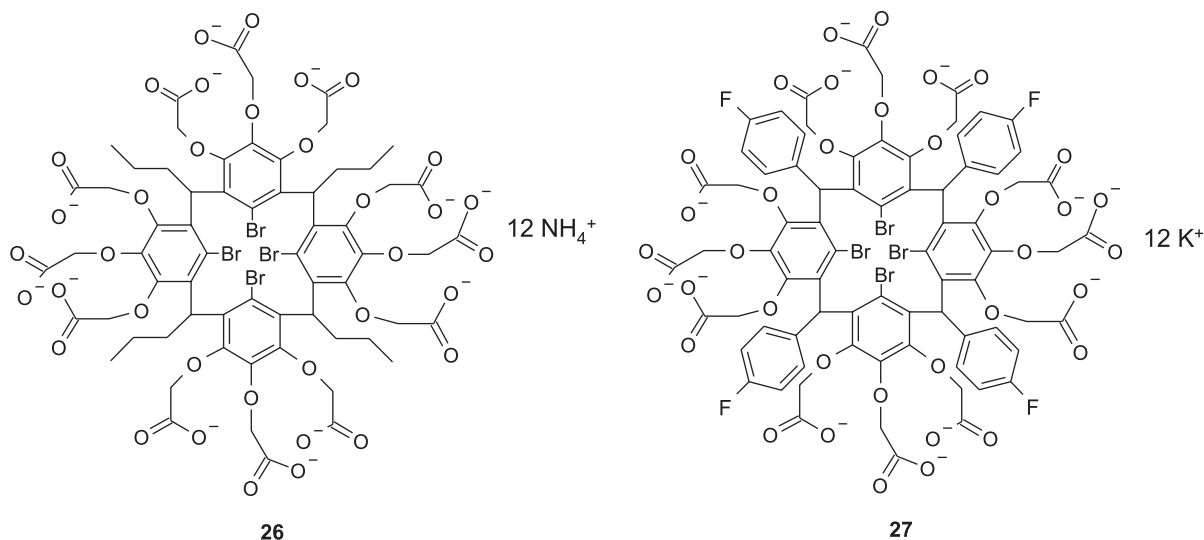


Схема 16

Механізм дії даних каліксаренів описано в загальному виді. Вони інгібують злиття (фузію) вірусу з клітинами-господарями та ферменти-інтегрази вірусів.

Було досліджено дію конусоподібних каліксаренів **28** та **29** з ізо-фталатними групами проти вірусів ВІЛ (штами HIV-III_B, LaiM184 V, NL-43) та вірусу гепатиту С. Дослідження проводились на різних клітинних лініях, в тому числі на Т-лімфоцитах MT-2 та CEMx174 та на HeLa клітинах [51] (схема 17).

В усіх випадках реєструвалась низька або середня цитотоксичність поряд з високою ефективністю (IC₅₀ ≥ 0,3 мкМ, табл. 8). Разом з тим, тетрагідроксикаліксарен **30**, каліксарени **31** та **32** з залишками глютамінової та аспарагінової кислот та макроцикли **33** і **34** із монозахищеними ізофталатними групами показали значно нижчу активність проти обох вірусів (схема 18).

В роботі [52] досліджено противірусну активність катіонних каліксаренів **35** та **36** з фармакофорними адамантильними групами (схема 19).

Активність даних каліксаренів було перевірено проти ВПГ-2, штаму ВН, на культурі клітин

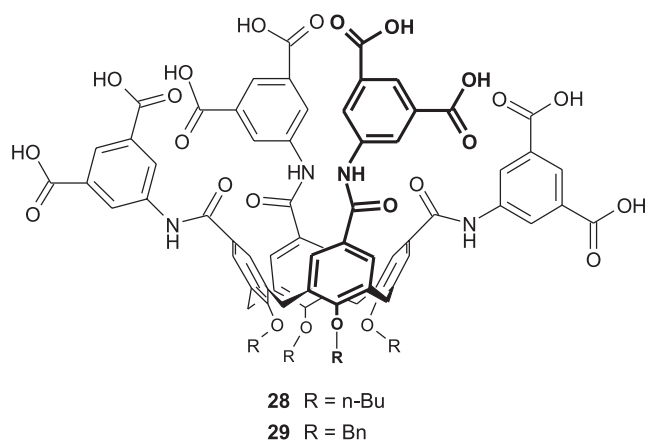


Схема 17

VERO-B. Каліксарен **36** неактивний, в той час як каліксарен **35** показав зменшення цитопатичної дії вірусу при концентраціях 10-125 мг/л. Але його активність менша, ніж у ацикловіру, значення МІК для **35** дорівнює 10 мг/л, для ацикловіру – 0,25 мг/л, хіміотерапевтичні індекси 12,5 та 2000 відповідно.

Низка водорозчинних аніонних каліксаренів, функціоналізованих біс-тіазолільними групами, була синтезована та досліджена проти різних штамів ВІЛ [53]. Найбільшу активність проявили тетрасульфонатокаліксарен **38**, тетрафосфонатокаліксарен **39**, тетра- та октакарбоксилатокаліксарени **5** та **37** (табл. 9). Причому саме функціоналізація біс-тіазолільними групами надає даним каліксаренам противірусну активність, вихідні суль-

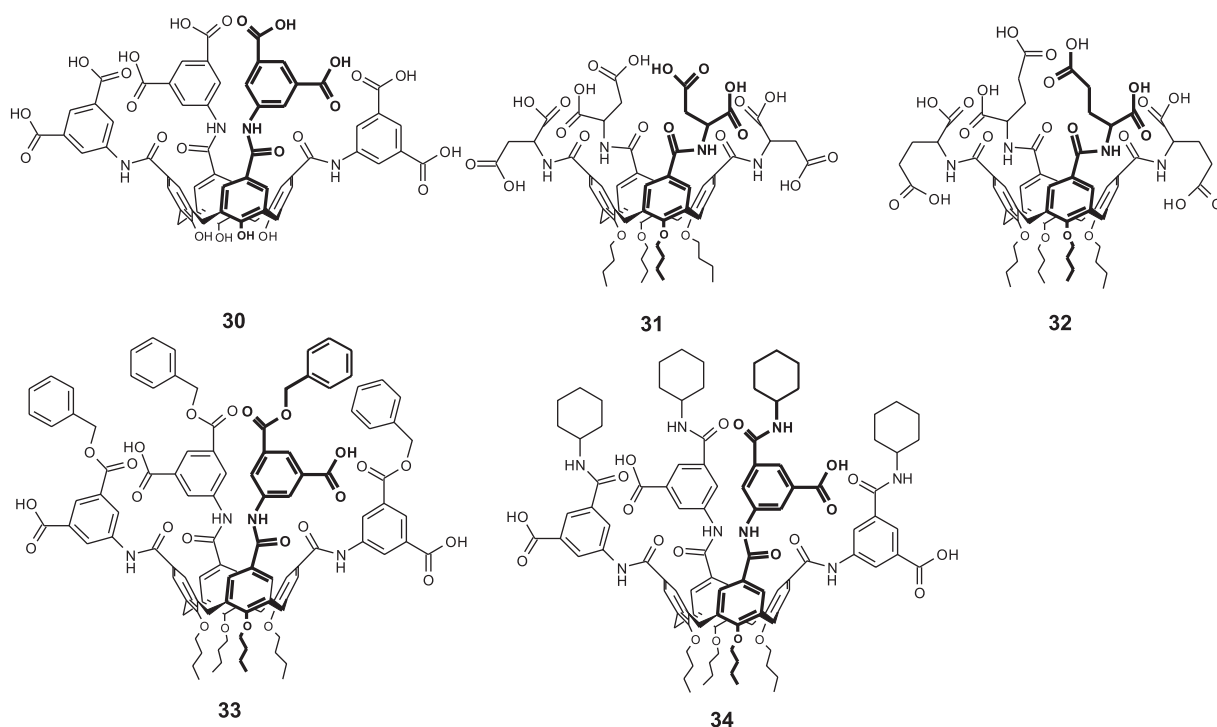


Схема 18

Таблиця 8

Антивірусна активність та цитотоксичність каліксаренів **28-34**

Сполука	Інгібування ВІЛ, IC ₅₀ , мкМ	Інгібування вірусу гепатиту С, IC ₅₀ , мкМ	Цитотоксичність, мкМ
28	0,36±0,12	1,8±0,3	>50
29	0,30	1,4	18
30	6,7±2,9	>50	>50
31	3,0±2,8	1,5±0,3	>50
32	2,4±1,4	4,1±1,8	>50
33	>50	25,6	>50
34	>50	4,1	>50

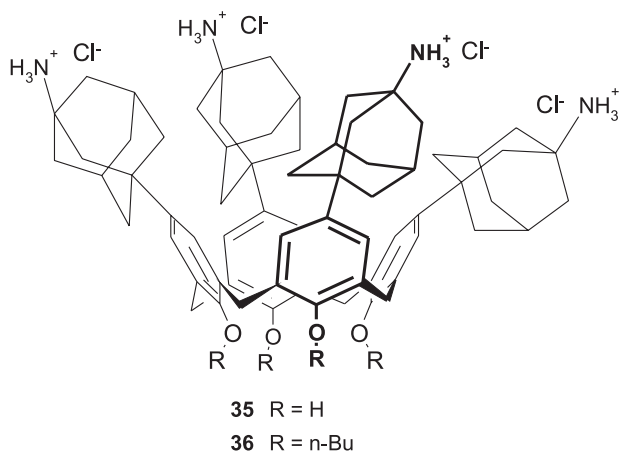


Схема 19

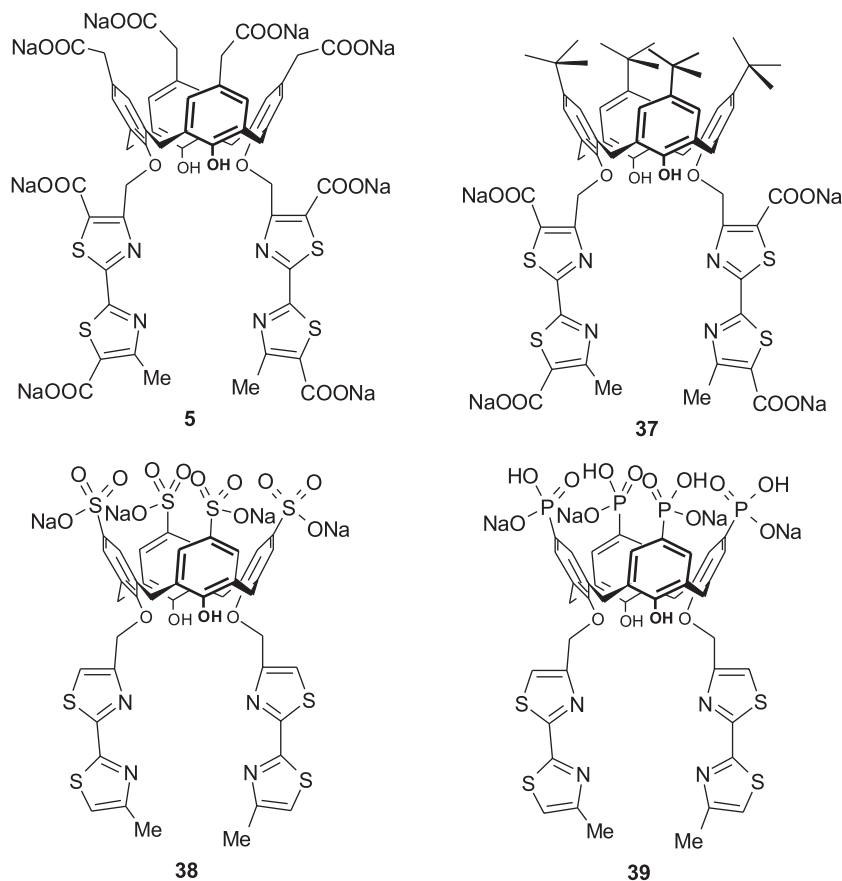


Схема 20

Таблиця 9

Противірусна активність та цитотоксичність аніонних каліксаренів **5, 37-39**

Сполука	MT4 (HIV-1 IIIВ)		CTM-SS (HIV-1 Ial)		PBMC (HIV-1 Bal)	
	IC ₅₀ , мкМ	цитотоксичність, мкМ	IC ₅₀ , мкМ	цитотоксичність, мкМ	IC ₅₀ , мкМ	цитотоксичність, мкМ
5	14	>100	5.3	>100	>37	37
37	15	>100	19.5	>100	14.5	>100
38	1,6	>100	2,2	>100	1,5	>100
39	14	>100	15	>100	57	92
Азидотимідин	0,01	>100	0,0051	>100	0,0077	75

фонато-, ацетато- та фосфонато-тетрагідрокси-каліксарени не показали значної активності. Для досліджень використовували три розповсюджені штами ВІЛ-1: IIIВ, Ial та Bal, та три лінії Т-лімфоцитів: MT-4, СЕМ-SS та РВМС (схема 20).

Каліксарен **38**, функціоналізований сульфонатними групами, проявив найбільшу активність проти всіх штамів ВІЛ та незначну цитотоксичність. Але він поступається за ефективністю відомому препарату азидотимідину, який широко використовували у 1990-х та на початку 2000-х років.

Була запатентована противірусна активність натрієвих солей каліксаренів, модифікованих аніонними кобальт-дикарболідними групами. Ці макроцикли здатні інгібувати активність протеази ВІЛ з IC₅₀ 91-210 нМ [54].

Висновки

Аналіз великої кількості статей та патентів свідчить, що модифіковані каліксарени проявляють активність проти бактерій, грибів та вірусів. Бактерицидна активність модифікованих каліксаренів зазвичай обумовлюється наявністю декількох позитивно заряджених груп на макроциклічному кістяку. Антивірусна активність зумовлена присутністю від'ємно заряджених угруповань. За активністю каліксаренові похідні переважають такі відомі противірусні препарати, як ацикловір, ганцикловір та фосфонометоксіетиладенін. Фунгіцидну дію каліксарени проявляють при функціоналізації відомими фармакоформними залишками. Особливістю каліксаренів є низька цитотоксичність, їх хіміотерапевтичні індекси переважно ма-

ють значення більше 10. На теперішній час зусилля дослідників спрямовані на встановлення механізмів антимікробної дії та вивчення кореляцій структура-активність біоцидних каліксаренів.

Література

1. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
2. Leeds J. A., Schmitt E. K., Krastel P. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2006, Vol. 15, pp.211-226.
3. Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C. Q. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, Vol. 104, pp.1-13.
4. Zhou M., Luo H., Li Z., Wu F., Huang C., Ding Z., Li R. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2012, Vol. 15, pp.306-315.
5. Blondelle S. E., Houghten R. A. *Tibtech*.1996, Vol. 14, pp.60-65.
6. Druggers E. M., Hale S. P., Lee J., Terrett N. *Nature*, 2008, Vol. 7, pp.608-624.
7. Gutsche D. *Calixarenes: Synthesis and Historical Perspectives in: Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*. M. Dekker, 2004, pp.153-160.
8. Böhmer V. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, Vol. 34, pp.713-745.
9. *Calixarenes for Separations*. Lumetta G. J., Rogers R. D., Gopalan A. S. et al. American Chemical Society, Washington 2000, 366 p.
10. Balasahe S., Nimsea T. *Kim Chem. Soc. Rev.*, 2013, Vol. 42, pp.366-386.
11. Rodik R. V., Boyko V. I., Kalchenko V. I. *Curr. Med. Chem.*, 2009, Vol. 16, pp.1630-1643.
12. de Fatima A., Fernandes S. A., Sabino A. A. *Curr. Drug Disc. Tech.*, 2009, Vol. 6, pp.151-170.
13. Helttunen K., Moridi N., Shahgaldian P., Nissinen M. *Org. Biomol. Chem.*, 2012, Vol. 10, pp.2019-2025.
14. Casnati A., Fabbri M., Pelizzi N., Pochini A., Francesco S., Ungaro R., di Modugno E., Tarzia G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, Vol. 6, pp.2699-2704.
15. Casnati A., Sansone F., Ungaro R. *Acc. Chem. Res.* 2003, Vol. 36, pp.246-254.
16. Frish L., Sanson F., Casnati A., Ungaro R., Cohen Y. *J. Org. Chem.*, 2000, Vol. 65, pp.5026-5030.
17. Sansone F., Baldini L., Casnati A., Lazzarotto M., Ugozzoli F., Ungaro R. *PNAS*, 2002, Vol. 49, pp.4842-4847.
18. Dibama H. M., Clarot I., Fontanay S., Salem A. B., Mourer M., Finance C., Duval R. E., Regnoulf-de-Vains J.-B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, Vol. 19, pp.2679-2682.
19. Ben Salem A., Regnoulf-de-Vains J.-B. *Tetrahedron Lett.*, 2001, Vol. 42, pp.7033-7036.
20. Ben Salem A., Regnoulf-de-Vains J.-B. *Tetrahedron Lett.*, 2003, Vol. 44, pp.6769-6771.
21. Korchowicz B., Ben Salem A., Corvis Y., Regnoulf de Vains J.-B., Korchowicz J., Rogalska E. *J. Phys. Chem. B*, 2007, Vol. 111, pp.13231-13242.
22. Ben Salem A., Sautrey G., Fontanay S., Duval R. E., Regnoulf-de-Vains J.-B. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, Vol. 19, pp.7534-7540.
23. Mourer M., Fontanay S., Duval R. E., Regnoulf-de-Vains J.-B. *Helv. Chim. Acta* 2012, Vol. 95, pp.1373-1386.
24. Grare M., Mourer M., Fontanay S., Regnoulf-de-Vains J.-B., Finance C., Duval R. E. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007, Vol. 60, pp.575-581.
25. Grare M., Mourer M., Regnoulf de Vains J.-B., Finance C., Duval R.-E. *Pat. Biol.*, 2006, Vol. 54, pp.470-476.
26. Sautrey G., Orlof M., Korchowicz B., Regnoulf-de-Vains J.-B., Rogalska E. *J. Phys. Chem. B.*, 2011, Vol. 115, pp.15002-15012.
27. Formosa A., Grare M., Jauvert E., Coutable A., Regnoulf-de-Vains J.-B., Mourer M., Duval R., Dague E. *Sci. Rep.*, 2012, Vol. 2, p.575.
28. Grare M., Massimba H., Dibama H. M., Lafosse S., Ribon A., Mourer M., Finance C., Regnoulf-de-Vains J.-B., Duval R. E. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2010, Vol. 16, pp.432-438.
29. Mourer M., Dibama H. M., Fontanay S., Grare M., Duval R. E., Finance C., Regnoulf-de-Vains J.-B. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, Vol. 17, pp.5496-5509.
30. de Namor A. F. D., Cleverley R. M., Zapata-Ormachea M. L. *Chem. Rev.* 1998, Vol. 98, pp.2495-2525.
31. Soomro A. M., Oad R. K., Memon S., Qureshi I. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.*, 2012, Vol. 13, No.1, pp.36-39.
32. Melezhyk I. O., Rodik R. V., Iavorska N. V., Klymchenko A. S., Mely Y., Shepelevych V. V., Skivka L. M., Kalchenko V. I. *Anti-Infective Agents*, 2014, in press.
33. Birnie C. R., Malamud D., Schnaare R. L. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, Vol. 44, pp. 2514-2517.
34. Mecca T., Cunsolo F. *Tetrahedron* 2007, Vol. 63, pp.10764-10767.
35. Jain M. K., Jahagirdar D. V. *Biochem. J. (Great Britain)*, 1985, Vol. 227, pp.789-794.
36. Hart P. D., Armstrong J. A., Brodaty E. *Infect. and Immun.*, 1996, Vol. 64, pp.1491-1493.
37. Hart P. D. *Science*, 1968, Vol. 162, pp.686-689.
38. Colston M. J., Hailes H. C., Stavropoulos E., Herve A. C., Herve G., Goodworth K. J., Hill A. M., Jenner P., Hart P. D., Tascon R. E. *Infect. and Immun.*, 2004, Vol. 72, pp.6318-6323.
39. Mourer M., Dibama H. M., Constant P., Daffé M., Regnoulf-de-Vains J.-B. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, Vol. 20, pp.2035-2041.
40. Psychogios N., Regnoulf-de-Vains J.-B. *Tetrahedron Lett.*, 2002, Vol. 43, pp.7691-7693.
41. Lamartine R., Tsukada M., Wilson D., Shirata A. C. R. *Chimie*, 2002, Vol. 5, pp.163-169.
42. Saberov V. S., Marichev K. O., Korotkikh M. I., Shvaika O. P., Rodik R. V., Drapailo A. B., Pekhtereva T. M., Komarovska-Porokhnyavets O. Z., Lubenets V. I., Novikov V. P. *J. of Organic and Pharmaceutical Chemistry*, 2014, Vol. 12, No.2, pp.36-43.
43. Paquet V., Zumbuehl A., Carreira E. M. *Bioconjugate Chem.*, 2006, Vol. 17, pp.1460-1463.
44. Hwang K. M., Qi Y. M., Liu S.-Y. U. S. Patent US5312837, 1994.
45. Hwang K. M., Qi Y. M., Liu S.-Y. U. S. Patent US5196452 1993.
46. Hwang K. M., Qi Y. M., Liu S. Y., Choy W., Chen J. *WO Patent* 9403164, 1994.
47. Takeshi Y., Kazuhiro F., Makiko O. *Patent of Japan* JP10203906A2, 1998.
48. Coveney D., Costello B. U. S. Patent 2005113454, 2005, EU Patent EP1367044, 2003.
49. Harris S. J. *WO Patent* 0244121, 2002.
50. Harris S. J. *WO9519974A2*, 1995.
51. Tsou L. K., Dutschman G. E., Gullen E. A., Telpoukhovskai M., Cheng Y. C., Hamilton A. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, Vol. 20, pp.2137-2139.
52. Motornaya A. E., Alimbarova L. M., Shokova E. A., Kovalev V. V. *Pharmaceutical Chemistry Journal (Russian)*, 2006, Vol. 40, pp.68-72.
53. Mourer M., Psychogios N., Laumond G., Aubertin A.-M., Regnoulf-de-Vains J.-B. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, Vol. 18, pp.36-45.
54. Kral V., Cigler P., Konvalinka J., Kozisek M., Prejdova J., Gruener B., Plessek J., Lepsek M., Pokorna J., Kraeusslich H.-G. *Bodem J. WO Patent* 2005073240, 2005.

Надійшла до редакції 12.12.2014 р.