

А.Н. Мирскова, С.Н. Адамович, **Е.Я. Виноградов**, Р.Г. Мирсков**СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА МЕНИНГОКОККА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МЕНИНГИТА НА ОСНОВЕ СОЛЕЙ 2-ГИДРОКСИАЛКИЛАМИНОВ**

Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск)

Разработаны методы синтеза 4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео- и 2,8-диметил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октанов; иодметилатов L-(+)-трео-, D-(-)-трео- и D-(-)-, L-(+)-трео-4-(4'-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октанов. Впервые установлена высокая ростстимулирующая активность оптически-изомерных иодметилатов 4-(4'-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октанов в отношении штаммов менингококков, выделенных из спинномозговой жидкости больных, что указывает на возможность их применения для качественной диагностики менингита. Разработана элективная «Питательная среда сухая *medium nutritium ad meningococcus siccum*» для выделения и культивирования менингококков и способ ее приготовления. На основе биологически активных арилокси(арилсульфанил)уксусных кислот и отхода производства левомецетина (*Chloramphenicol*) – «L-треоамин» разработаны методы синтеза новых стимуляторов роста микроорганизмов.

Ключевые слова: стимуляторы роста менингококка, питательная среда

MENINGOCOCCUS GROWTH STIMULATORS FOR MENINGITIS DIAGNOSTICS BASED ON 2-HYDROXYLALKYLAMINE SALTSA.N. Mirskova, S.N. Adamovich, **E.Ya. Vinogradov**, R.G. Mirskov

A.E. Favorsky Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk

The methods for the synthesis of 4-(4'-nitrophenyl)-L-(+)-treo- and 2,8-dimethyl-4-(4'-nitrophenyl)-L-(+)-treo-1-aza-3,7-dioxabicyclo-[3,3,0]octanes as well as iodomethylates of L-(+)-treo-, D-(-)-treo- and D-(-)-, L-(+)-treo-4-(4'-nitrophenyl)-1-aza-3,7-dioxabicyclo-[3,3,0]octanes have been developed. It has been shown for the first time that optically isomeric iodo-methylates of 4-(4'-nitrophenyl)-1-aza-3,7-dioxabicyclo-[3,3,0]octanes possess high growth-stimulating activity with respect to meningococcus strains isolated from cerebrospinal fluid of patients thus indicating the possibility of these compounds application for qualitative diagnostics of meningitis. A method for the preparation of elective «Dry medium nutritium ad meningococcus siccum» for isolation and cultivation of meningococci has been elaborated. Methods for the synthesis of novel potential stimulators of microorganisms growth have been worked out on the basis of biologically active aryloxy(arylsulfanyl)acetic acids and waste of Levomecetin (*Chloramphenicol*) production, «L-treoamine».

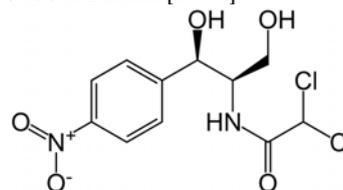
Key words: meningococcus growth stimulators, medium nutritium

Стимуляция роста возбудителей инфекционных заболеваний связана с проблемой надежной и быстрой диагностики заболеваний. Разработка питательных сред, обеспечивающих максимальную скорость размножения возбудителя с сохранением его полного антигенного комплекса, чрезвычайно важна. Применяемые в настоящее время сухие питательные среды для культивирования и выделения *N. meningitidis* на основе сердечно-мозгового экстракта, ферментативных гидролизатов казеина, сои, мяса с добавлением нативной сыворотки крови, витаминов, аминокислот и др. дефицитны и дороги. В практике здравоохранения для диагностики менингококковой инфекции в основном используется 20%-ный сывороточный агар на основе гидролизата мяса по Хоттингеру. Однако производство отечественных стандартных питательных сред для диагностики менингита в необходимых количествах является актуальной задачей.

1. Новые стимуляторы роста менингококка из промышленного отхода производства антибиотика левомецетина

Левомецетин (хлорамфеникол) – первый синтетический антибиотик широкого спектра действия, не утративший своей ценности для ра-

дикального излечения многих бактериальных и вирусных заболеваний [1–3]:

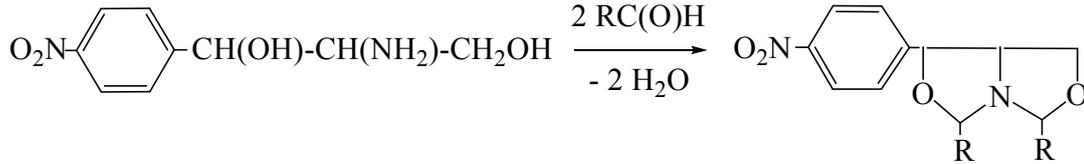


В производстве левомецетина используется только оптически активный левовращающий изомер D-(-)-трео-1-(4'-нитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиол («D-треоамин»), а его правовращающий L-(+)-изомер («L-треоамин») является крупнотоннажным отходом [4].

Нами предложены варианты утилизации отхода производства левомецетина – «L-треоамин» – L-(+)-трео-1-(4'-нитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиола путем получения на его основе новых биологически активных соединений, представляющих практический интерес для микробиологии и медицины.

На основе «L-треоамин» разработаны методы синтеза 4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео- и 2,8-диметил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октанов (А) Для

получения соединений (А: **1**, **2**) L-(+)-трео-1-(4'-нитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиол подвергают взаимодействию с параформом или ацетальдеги-



А: **1**, R = H; **2**, R = CH₃

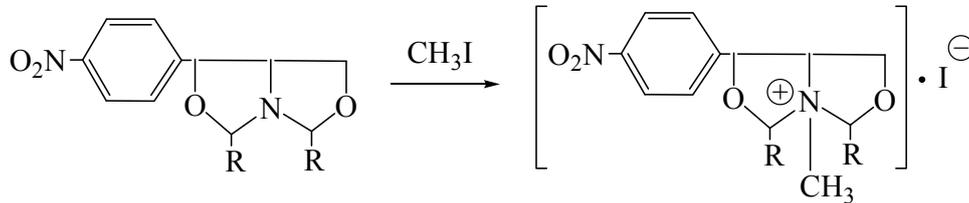
Соединения **1**, **2** — белые порошки, без запаха, устойчивые при хранении, растворимые в органических растворителях, не растворимые в воде. Циклическую структуру соединений **1**, **2** доказывает отсутствие в ИК спектрах полос поглощения первичной и вторичной гидроксильных групп, а также аминогруппы, характерных для исходного соединения.

Проведенные ранее фармакологические исследования соединений (А) (Естественно-научный инсти-

дом в соотношении 1:2, в среде кипящего бензола или толуола в течение 10-20 часов с полным удалением образующейся воды:

тут при Пермском государственном университете) показали, что новые соединения (А: **1**, **2**) при низкой токсичности обладают высокой противовоспалительной активностью, превышающей активность медицинского препарата бутадиона, что позволяет предполагать возможность их применения в медицине.

Реакцией соединений **1**, **2** с йодистым метилом в абсолютном эфире получены с высокими выходами соответствующие йодметилаты (В: **3**, **4**)



(В: **3**, R = H; **4**: R = CH₃)

Соединения (**3**, **4**) — порошки желтого цвета, растворимые в воде, нетоксичные (LD₅₀ 2000-4000 мг/кг). Аналогично синтезу соединения **3** из изомеров D-(-)-трео- и смеси D-(-)-с L-(+)-трео-(4'-нитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиолов последовательными реакциями с параформом и йодистым метилом синтезированы йодметилаты D-(-)-трео-(В: **5**) и D-(-)-, L-(+)-трео-4-(4'-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октан (В: **6**).

Биологическая активность новых соединений **3**, **5**, **6** в качестве стимуляторов роста менингококка была впервые исследована в лаборатории детских бактериальных инфекций С.-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, где было установлено их существенное стимулирующее действие на развитие менингококков.

МЕТОДИКА

Ростстимулирующую активность оптически-изомерных соединений **3**, **5**, **6** изучали на штаммах менингококка, выделенных из спинномозговой жидкости больных. В качестве тест-культуры использовали эталонные штаммы вида *N. meningitidis*. Штаммы культивировали на полужидких и плотных питательных средах (агар Хоттингера с различными объемами сыворотки) с добавлением соединений **3**, **5**, **6**, которые вносили в питательные среды в концентрациях 10⁻⁴ — 10⁻⁸ вес. %. В опытах использовали питательные среды с содержанием аминного азота 170 — 180 мг %, рН 7,4, NaCl 0,5 %. Из взвеси 18 часовой культуры менингококков готовили ряд серийных разведений с коэффициентом 10. Вносили 0,1 мл каждого разведения в чашки Петри с агаром, содержащим различные концентрации стимуляторов (три повторности). Инкубировали 18 ч при 37°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффективность соединений **3**, **5**, **6** для роста менингококков представлена в таблице 1. Все соединения стимулировали рост менингококков даже на такой полноценной питательной среде, как сывороточный агар Хоттингера. Наиболее эффективным оказался йодметилат **3**, соединения **5**, **6** занимают примерно равное положение, но колонии менингококков, выращенные на средах с этимми стимуляторами, более мелкие.

Таблица 1
Эффективность стимуляторов (**3**, **5**, **6**) для менингококков в % к посеву микробных клеток

Стимуляторы	Штаммы, выделенные из спинномозговой жидкости			
	1949	208	139	1520
Йодметилат 3 50 мкг/мл с 20% сыворотки	90	89	60	80
Йодметилат 3 50 мкг/мл + агар с 5% сыворотки	79	80	85	75
Йодметилат 5 50 мкг/мл + агар с 20% сыворотки	80	85	70	87
Йодметилат 5 50 мкг/мл + агар с 5% сыворотки	79	80	82	85
Йодметилат 6 50 мкг/мл + агар с 20% сыворотки	80	85	79	93
Йодметилат 6 50 мкг/мл + агар с 5% сыворотки	60	70	68	65
Агар с 20% сыворотки без стимулятора (контроль)	50	40	50	50
Простой агар, без сыворотки и без стимулятора (контроль)	2	10	роста нет	роста нет

В присутствии стимуляторов количество выросших колоний менингококков было больше на 30–50 % в сравнении с первым контролем (сывороточный агар) и на 60–90 % в сравнении со вторым контролем (простой агар). Стимуляторы не изменяли физиологических свойств менингококков. Агглютинабельность культур сохранялась.

Впервые установленная высокая ростстимулирующая активность оптически изомерных йодметилатов 4-(4'-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октанов (**B**) в отношении штаммов менингококков, выделенных из спинномозговой жидкости больных (что особенно ценно), указывает на возможность их применения для качественной диагностики менингита. Поиск стимуляторов роста проводится в основном в отношении менингококков, выделенных из спинномозговой жидкости больных и обладающих чрезвычайной лабильностью и прихотливостью к составу питательной среды.

Предложено использование йодметилата **3**, полученного из отхода производства левомицетина, для конструирования селективных питательных сред. Установлено, что добавление этого стимулятора в питательную среду позволяет уменьшить количество вносимого нативного белка (дорогой и дефицитной сыворотки лошадей и крупного рогатого скота на 15 %), способствует максимальному прорастанию микробных клеток из минимальной посевной дозы (1000 и 100 клеток) и значительно улучшают ростовые качества применяемой питательной среды, что, в свою очередь, повышает ценность бактериологических исследований.

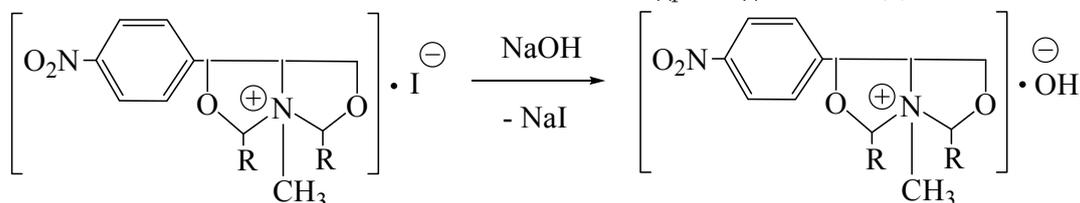
Преимуществом стимулятора (**3**) является его доступность, неограниченная сырьевая база, низкая стоимость при получении химическим путем из отхода крупнотоннажного производства, постоянный состав, хорошая растворимость в воде, устойчивость при хранении, нетоксичность, эффективность в низких концентрациях для максимальной скорости размножения возбудителя менингококка с сохранением его полного антигенного комплекса.

Разработана селективная «Питательная среда сухая medium nutritium ad meningococcus siccum» для выделения и культивирования менингококков и способ ее приготовления, включающая йодметилат 4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октан (**3**) в качестве стимулятора роста и заменителя сыворотки лошадей и крупного рогатого скота.

2. Арилокси(арилсульфанил)ацетаты 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азониа-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октана как потенциальные стимуляторы роста микроорганизмов

С целью создания новых потенциальных стимуляторов роста микроорганизмов и изучения зависимости биологической активности от их строения разработаны методы синтеза структурных аналогов соединений (**B**) на основе биологически активных арилокси(арилсульфанил)уксусных кислот и отхода производства левомицетина - L-(+)-трео-(4'-нитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиола («L-треомина»).

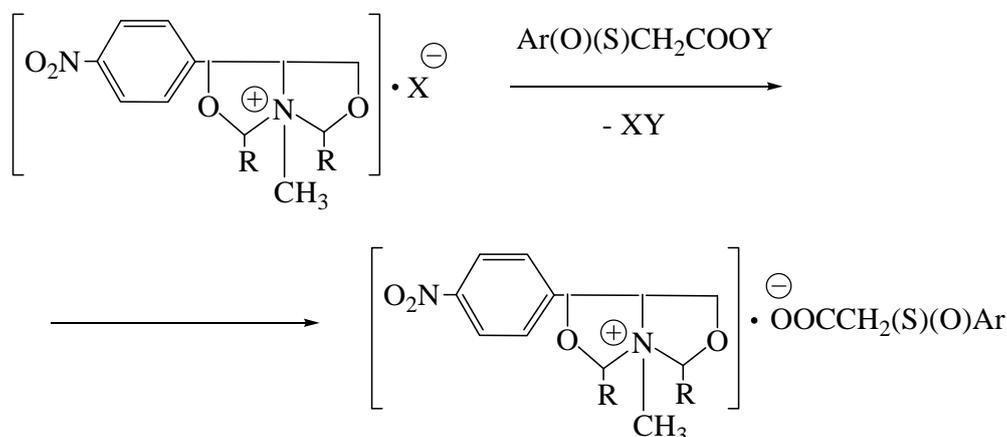
Реакцией ионного обмена из йодида 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азониа-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октана (**3**) получено соединение с гидроксид-анионом (**7**):



3, 7

Реакциями арилокси(арилсульфанил)уксусных кислот или их солей с йодидом (**3**) или гидроксидом (**7**) синтезированы первые представители неизвестных ранее арилокси-(арилсульфанил)ацетатов

1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азониа-3,7-диоксабицикло[3,3,0]-октана (**8, 9**) с потенциальной ростстимулирующей и фармакологической активностью:



8, 9

8: R = H, Ar = 4-Br-C₆H₄S, X = I, Y = K; **9:** R = H, Ar = 2-CH₃-C₆H₄O, X = OH, Y = H.

Соединения **7–9** — твердые кристаллические соединения, растворимые в воде, спирте, нерастворимые в органических растворителях. Строение их доказано данными ИК, ЯМР ¹H и ¹³C спектров и элементным анализом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ХИМИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (1)

21.2 г (0.1 моль) 1-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-2-амино-1,3-пропандиола (т. пл. 160 – 163°С), 6.4 г (0.2 моль) параформа и 100 мл бензола нагревают до кипения с ловушкой Дина-Старка в течение 10 – 15 часов до прекращения выделения воды. Растворитель отгоняют в вакууме. Остаток растворяют в этаноле, фильтруют и высаживают в гексан. Пересаживают повторно дважды. Получают 18.9 г (80 %) продукта с т. пл. 67 – 69°С. ИК спектр: 1607 (C₆H₄), 1532 (C-N), 1050 – 1080 (C-O). Найдено, %: C, 56.71; H, 5.07; N, 11.87. C₁₁H₁₂N₂O₄. Вычислено, %: C, 56.77; H, 5.08; N, 11.40.

2,8-диметил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (2)

21.2 г (0.1 моль) 1-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-2-амино-1,3-пропандиола, 8.8 г (0.2 моль) ацетальдегида и 100 мл бензола нагревают до кипения с ловушкой Дина-Старка до полного прекращения выделения воды. Растворитель отгоняют в вакууме. Остаток перекристаллизовывают из гексана. Перекристаллизацию повторяют дважды. Получают 22.4 г (85 %) **2** с т. пл. 52 – 53°С. ИК спектр: 1605 (C₆H₄), 1532 (C-N), 1050 – 1080 (C-O).

Найдено, %: C, 59.14; H, 6.42; N, 9.83. C₁₃H₁₆N₂O₄. Вычислено, %: C, 59.09; H, 6.06; N, 10.1.

Йодид 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азония-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (3)

В колбу, снабженную мешалкой и обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой, помещают 50 г (0.024 моль) 4-(4'-нитрофенил)-L-трео-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (**1**), 30 г (0.035 моль) свежеперегнанного иодистого метила и 30 мл абсолютного эфира. Смесь нагревают в течение 20 час. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывают, промывают абсолютным эфиром и сушат до постоянного веса. Получают 72 г (90 %) (**3**) с т. пл. 195°С. Кристаллы светло-желтого цвета. Растворимы в воде, спирте, ДМСО, нерастворимы в эфире, бензоле. ИК спектр: 1670 (C₆H₄), 1532 (C-N), 1050 – 1080 (C-O). Найдено, %: C, 37.81; H, 3.99; I, 34.05; N, 7.71. C₁₂H₁₅IN₂O₄.

Вычислено, %: C, 38.09; H, 3.96; I, 33.59; N, 7.41.

Йодид 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-D-(–)-трео-1-азония-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (5)

Получали аналогично из 4-(4'-нитрофенил)-D-(–)-трео-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана и иодистого метила. Выход 95 %. Найдено, %: C, 37.95; H, 3.95; I, 33.70; N, 7.50. C₁₂H₁₅IN₂O₄. Вычислено, %: C, 38.09; H, 3.96; I, 33.59; N, 7.41.

Йодид 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-D-(–)-L-(+)-трео-1-азония-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (6)

Получали аналогично **5** из D,L-изомера. Выход 95 %. Для соединений **4,5** и **3** т. пл. совпадают.

Гидроксид 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азония-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (7)

Метанольный раствор 0.4 г (0.1 моль) NaOH прикапывали к метанольному раствору 3.78 г (0.1 моль) йодида (**3**). Реакционную смесь перемешивали 4 час при 20°С и 4 час при 60°С, охлаждали до 0°С (72 часа). Выпавшие крупные призматические кристаллы NaI отфильтровывали. Растворитель отгоняли. Остаток промывали эфиром и высушивали в вакууме. Выход 2.22 г (73 %). Светло-желтый порошок с т. пл. 160 – 165°С. Умеренно растворяется в воде и спирте.

ЯМР¹H (D₂O): 8.25 – 7.66 (м, 4H, C₆H₄); 5.52 (с, 4H, OCH₂N); 5.27 (с, 1H, CH); 4.93 (с, 1H, CH); 4.67 (с, 2H, OCH₂); 3.41 (с, 3H, N⁺CH₃). ИК: 3339 (OH), 1678 (C₆H₄), 1525 (C-N), 1060-1090 (C-O). Найдено, %: C, 54.00; H, 5.75; N, 10.50. C₁₂H₁₆N₂O₅.

Вычислено, %: C, 53.72; H, 6.01; N, 10.44.

4-Бромфенилсульфанилацетат 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азония-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (8)

3.78 г (0.01 моль) йодида **3** и 2.85 г (0.01 моль) калиевой соли 4-бромфенилсульфанилуксусной кислоты в 75 мл метанола нагревали до кипения 8 час. Смесь охлаждали до 0°С 72 часа. Образовавшиеся кристаллы KI отфильтровывали. Растворитель отгоняли. Остаток промывали эфиром и высушивали в вакууме. Выход 1.22 г (63 %) Светло-желтый порошок с т. пл. 118°С. Растворяется в воде и спирте. ЯМР¹H (D₂O): 8.02-7.30 (м, 8H, 2C₆H₄); 5.50 (уш. с, 4H, OCH₂N); 5.25 (уш. с, 1H, CH); 4.90 (уш. с, 1H, CH); 4.65 (с, 2H, OCH₂); 3.69 (с, 2H, SCH₂); 3.40 (с, 3H, N⁺CH₃).

ИК: 1680 (C₆H₄), 1581 (C = O), 1515 (C-N), 1050-1085 (C-O). Найдено, %: C, 51.83; H, 4.75; N, 6.30. C₂₀H₂₁N₂O₆Br. Вычислено, %: C, 51.62; H, 4.55; N, 6.02.

2-Метилфеноксиацетат 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азония-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (9)

2.68 г (0.01 моль) гидроксида **7** и 1.66 г (0.01 моль) 2-метилфеноксиуксусной кислоты в 50 мл метанола перемешивали 8 час при 20°С. Отгоняли растворитель и H₂O. Остаток тщательно промывали сухим эфиром и высушивали в вакууме над P₂O₅. Выход 3.09 г (74.5 %). Желтоватый порошок с т. пл. 104-106°С. Растворяется в воде, спирте. ЯМР¹H (D₂O): 8.12-6.73 (м, 8H, 2C₆H₄); 5.57 (уш. с, 4H, OCH₂N); 5.27 (уш. с, 1H, CH); 4.90 (уш. с, 1H, CH); 4.61 (с, 2H, OCH₂); 4.43 (с, 2H, OCH₂COO); 3.41 (с, 3H, N⁺CH₃); 2.18 (с, 3H, CH₃). ИК: 1685 (C₆H₄), 1595 (C = O), 1522 (C-N), 1058 – 1088 (C – O). Найдено, %: C, 60.81; H, 5.76; N, 6.51. C₂₁H₂₄N₂O₇. Вычислено, %: C, 60.56; H, 5.80; N, 6.72.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлена высокая ростстимулирующая активность оптическиизомерных йодметилатов 4-(4'-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октанов в отношении

штаммов менингококков, выделенных из спинномозговой жидкости больных, что указывает на возможность их применения для качественной диагностики менингита.

2. Предложено использование йодметилата 4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана в качестве стимулятора роста и заменителя сыворотки лошадей и крупного рогатого скота для конструирования элективных питательных сред для выделения и культивирования менингококков.

3. На основе биологически активных арилокси(арилсульфанил)уксусных кислот и отхода производства левомицетина – L-(+)-трео-1-(4'-нитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиола - раз-

работаны методы синтеза новых потенциальных стимуляторов роста микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беликов В.Г. Современные синтетические и природные лекарственные средства: Кр. Справочник. Изд. 2-е, перераб. и доп. – Пятигорск, гос. фармац. акад. 2002. – 335 с.
2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учеб. – М.: Высш. шк., 1986. – 448 с.
3. Машковский М.Д. Лекарственные вещества. В 2-х тт. 14 изд. – М.: Новая Волна, 2000. – Т. 1–2.
4. Шарипова С.Х., Зайцев В.А. Левомицетин и химия 1-(п-нитрофенил)-2-аминопропан-диола-1,3. // Хим. фарм. журн. – 1986. – № 7. – С. 858–862.

Сведения об авторах

Мирскова Анна Николаевна – д.х.н., профессор, главный научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1, ИрИХ; тел. 42-47-11; e-mail: mirskova@irioch.irk.ru)

Адамович Сергей Николаевич – к.х.н., старший научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1, ИрИХ; тел. 42-65-45; e-mail: mir@irioch.irk.ru)

Мирсков Рудольф Григорьевич – д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН