

## МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ MICROBIOLOGY AND VIROLOGY

### ДИЗАЙН ПРОЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ОРГАНИЛФОСФАТОВ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИБИОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АЛКИЛЬНЫХ ЗАЩИТНЫХ ГРУПП РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ФТОРИРОВАНИЯ

Приставка А.А.<sup>1</sup>,  
Михайленко В.Л.<sup>1</sup>,  
Вятчина О.Ф.<sup>1</sup>,  
Юринова Г.В.<sup>1</sup>,  
Верхотурова С.И.<sup>2</sup>,  
Апарцин К.А.<sup>3</sup>,  
Саловарова В.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» (664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1, Россия)

<sup>2</sup> ФГБУН «Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН» (664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1, Россия)

<sup>3</sup> ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН (664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 134, Россия)

Автор, ответственный за переписку:  
Приставка Алексей Александрович,  
e-mail: pristavka@gmail.com

#### РЕЗЮМЕ

**Актуальность.** Молекулярные структуры, состоящие из фосфорсодержащей части и неполярных радикалов, используются при разработке пролекарств в качестве структурно-функциональных групп, необходимых для транспортировки лекарства через клеточные барьеры. При этом предполагается, что сам носитель не проявляет биологической активности. Однако комплекс «органический фосфат – алкильный радикал» может обладать собственными метаболическими и фармакологическими свойствами даже в отсутствие лекарственной части.

**Цель работы.** Исследовать влияние ряда фторированных алкилфосфатов на рост бактериальных тест-культур на агаризованной среде и выявить сопряжённые метаболические маркеры методами УФ/видимой спектроскопии.

**Материалы и методы.** Оценивалось влияние шести органилфосфатов на рост пяти видов бактерий в аэробных условиях методом лунок на агаризованной среде. Для растворов, содержащих клеточные метаболиты *Pseudomonas aeruginosa*, зарегистрированы спектры поглощения в диапазоне 250–280 нм. Для многомерного сравнительного анализа спектров использовался метод главных компонент (РСА).

**Результаты.** Исследованные органилфосфаты с этильными и пропильными радикалами являются потенциальными временными носителями лекарственного фрагмента, т. к. способны проникать через клеточные барьеры. Однако фторированные соединения проявляют бактерицидные свойства, степень которых зависит от особенностей расположения атомов фтора в радикале: наиболее активны соединения, исчерпывающе галогенированные по терминальному атому углерода этильного радикала ( $-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ ), наименее активен нефторированный органилфосфат. УФ/видимые спектры продуктов культивирования *P. aeruginosa*, по данным РСА, содержат паттерны, отражающие метаболические эффекты, опосредованные этими структурными особенностями радикалов.

**Заключение.** С точки зрения перспектив практического применения исследованных соединений, активность проантибиотика на основе органилфосфата с нефторированным этил(пропил)радикалом будет определяться только специфичностью лекарственной части. Точно такая же молекула, но исчерпывающе фторированная по терминальному атому углерода алкильного радикала, вероятно, будет характеризоваться более низкой специфичностью и более высокой активностью при аддитивном (или синергетическом) действии метаболически активных групп.

**Ключевые слова:** фторированные органилсодержащие фосфаты, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, УФ/видимая спектроскопия, метод главных компонент

**Для цитирования:** Приставка А.А., Михайленко В.Л., Вятчина О.Ф., Юринова Г.В., Верхотурова С.И., Апарцин К.А., Саловарова В.П. Дизайн пролекарств на основе органилфосфатов: сравнительный анализ антибиотического действия алкильных защитных групп разной степени фторирования. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5-2): 103-113. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-2.11

Статья получена: 15.10.2021

Статья принята: 07.11.2022

Статья опубликована: 08.12.2022

## DESIGN OF ORGANYL PHOSPHATE-BASED PRO-DRUGS: COMPARATIVE ANALYSIS OF THE ANTIBIOTIC ACTION OF ALKYL PROTECTING GROUPS WITH DIFFERENT DEGREE OF FLUORINATION

Pristavka A.A.<sup>1</sup>,  
Mikhailenko V.L.<sup>1</sup>,  
Vyatchina O.F.<sup>1</sup>,  
Yurinova G.V.<sup>1</sup>,  
Verkhoturova S.I.<sup>2</sup>,  
Apartsin K.A.<sup>3</sup>,  
Salovarova V.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Irkutsk State University  
(Karla Marksa str. 1, Irkutsk 664003,  
Russian Federation)

<sup>2</sup> A.E. Favorsky Irkutsk Institute  
of Chemistry, Siberian Branch  
of the Russian Academy of Sciences  
(Favorskogo str. 1, Irkutsk 664033,  
Russian Federation)

<sup>3</sup> Irkutsk Scientific Center, Siberian Branch  
of the Russian Academy of Sciences  
(Lermontova str. 134, Irkutsk 664033,  
Russian Federation)

Corresponding author:  
**Aleksey A. Pristavka,**  
e-mail: pristavk@gmail.com

### ABSTRACT

**Background.** Molecular structures combining a phosphorus-containing counterpart and non-polar radicals are employed in design of pro-drugs as structural and functional groups necessary for transportation of drugs through cellular barriers. It is assumed that the carrier itself does not exhibit biological activity. However, the "organic phosphate – alkyl radical" complex may possess its own metabolic and pharmacological properties even in the absence of a drug moiety.

**The aim.** To study the effect of fluorinated alkyl phosphates on the growth of bacterial test cultures in an agar medium and to identify conjugated metabolic markers using UV/visible spectroscopy.

**Materials and methods.** The effect of six organyl phosphates on the growth of five types of bacteria under aerobic conditions was evaluated by the method of wells in an agar medium. For solutions containing cell metabolites of *Pseudomonas aeruginosa*, the absorption spectra were recorded at 250–280 nm. The principal component analysis (PCA) was used for multivariate comparative analysis of the spectra.

**Results.** The studied organyl phosphates bearing the ethyl and propyl radicals are potential temporary carriers of the drug moiety, since they are capable of penetrating through cellular barriers. However, the fluorinated compounds exhibit bactericidal properties, the degree of which depends on the arrangement of fluorine atoms in the radical. The most active compounds are those exhaustively halogenated at the terminal carbon atom of the ethyl radical ( $-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ ), while non-fluorinated organyl phosphate is the least active. UV/visible spectra of *P. aeruginosa* cultivation products, according to PCA data, contain patterns reflecting the metabolic effects mediated by these structural features of the radicals.

**Conclusion.** In terms of practical application of the studied compounds, the activity of a proantibiotic based on organyl phosphate with a non-fluorinated ethyl(propyl) radical will be determined only by the specificity of the drug moiety. Exactly the same molecule, but exhaustively fluorinated at the terminal carbon atom of the alkyl radical, is likely to be characterized by lower specificity and higher activity under the additive (or synergistic) action of metabolically active groups.

**Key words:** fluorinated organyl phosphates, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, UV/vis-spectroscopy, principal component analysis

Received: 15.10.2021

Accepted: 07.11.2022

Published: 08.12.2022

**For citation:** Pristavka A.A., Mikhailenko V.L., Vyatchina O.F., Yurinova G.V., Verkhoturova S.I., Apartsin K.A., Salovarova V.P. Design of organyl phosphate-based pro-drugs: comparative analysis of the antibiotic action of alkyl protecting groups with different degree of fluorination. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5-2): 103-113. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-2.11

## ВВЕДЕНИЕ

Одно из актуальных направлений повышения эффективности противоинфекционных средств заключается в разработке пролекарств – фармацевтических соединений, которые трансформируются в активную форму лекарства в мишени под действием ферментов или физико-химических факторов [1, 2].

Препарат в форме пролекарства имеет более высокую эффективность за счёт повышения биодоступности, специфичности, стабильности, абсорбции и снижения побочных эффектов, что особенно актуально при разработке новых противомикробных препаратов в качестве стратегии обхода антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов [3].

Несмотря на десятилетия исследований, выбор идеальной формы пролекарства остаётся проблемой, которую часто решают эмпирическим путём. Перспективна модификация пролекарств фосфорсодержащими функциональными группами, которые относятся по структуре к различным классам: фосфатам, фосфонатам, фосфинатам, фосфамидам и др. Такие пролекарства обладают более высокой полярностью, обеспечивают более прочную водородную связь *in vivo* при клиническом применении по сравнению с немодифицированными лекарствами и легко (особенно фосфаты) активируются под действием фосфатаз и неспецифических эстераз. Стратегия разработки пролекарств заключается в присоединении фосфорсодержащей группы либо к молекуле известного препарата, либо к производным биологических аналогов. Примерами антибиотиков первого типа являются клиндамицин фосфат и фосфат тедизолида, а в качестве препаратов второго типа разрабатываются производные нуклеотидов как противовирусные и противоопухолевые агенты (Tenofovir disoproxil phosphate) [4].

Однако включение фосфатов в состав пролекарства имеет свои недостатки. Во-первых, фосфорсодержащие группы при физиологическом pH заряжены, что понижает липофильность молекулы и ограничивает её проникновение в клетку. Во-вторых, эфиры фосфорной кислоты метаболически нестабильны. Для нейтрализации зарядов и понижения чувствительности к фосфоэстеразам фосфатная группа модифицируется защитными радикалами [5]. По такому принципу разрабатываются, например, пролекарства на основе фосмидомицина – ингибитора метаболизма изопреноидов [6].

Недостаток такого подхода заключается в необходимости маскировки двух зарядов на фосфатной группе. А это приводит к образованию либо диэфира, либо циклического производного. В результате образуется смесь стереоизомеров за счёт формирования хирального центра (фосфор), и может меняться путь активации пролекарства [7]. Для решения этой проблемы в качестве линкера между лекарством и защитной липофильной группой можно использовать органилфосфаты (ФОС) с одним зарядом.

В качестве липофильных заместителей используют разные функциональные группы, простейшими из ко-

торых являются алкильные радикалы [8]. Сложноэфирная связь между алкилом и фосфором (Alk-O-P) менее устойчива к гидролазам микроорганизмов, чем млечепитающих, что может повысить целевую селективность таких пролекарств [3].

Другая стратегия повышения липофильности основана на введении в молекулу ФОС атомов фтора [7]. Результатом фторирования является не только снижение барьерных свойств мембран. Замена водорода или гидроксильной группы фтором меняет биологическую активность органилфосфатов. В литературе рассматриваются несколько механизмов взаимодействия фторуглеводородных радикалов с биологическими мишенями: 1) изменение геометрии фторсодержащих групп по сравнению с незамещёнными радикалами, что может изменить характер межмолекулярных взаимодействий или направление связывания; 2) фтор является миметиком гидроксигрупп, но по прочности водородные связи F...H (~2,4 ккал/моль) слабее, чем O...H (~5 ккал/моль), что влияет на прочность и специфичность связывания белков с лигандами; 3) высокая электроотрицательность фтора смещает электронную плотность, что может менять барьер активации ферментативных реакций [9–11]. Известны фосфорорганические пролекарства, фторированные по активному компоненту (антибиотик фторхинолон) [1], по защитному липофильному радикалу (фосфлуконазол) и даже по фосфору (дифлос) [4].

С другой стороны, наличие фторированной алкильной группы в органилфосфатах, относящихся к отравляющим веществам, снижает их антихолинэстеразную активность [12]. Поэтому вероятность того, что пролекарства с такими заместителями будут проявлять нейротоксическое действие, довольно низка. И это ещё один довод за применение фторалкилов в качестве липофильных защитных групп при конструировании молекул пролекарств.

Таким образом, перспективно выглядит молекула пролекарства антибиотического действия, включающая 1) собственно лекарственную часть и 2) комплекс, отвечающий за доставку пролекарства в мишень и состоящий из фторированного алкильного радикала и органилфосфатного линкера (рис. 2). Однако этот комплекс может обладать собственными метаболическими и фармакологическими свойствами даже в отсутствие лекарственной части, т. к. пока не выявлено статистически значимой взаимосвязи между специфичностью биологического действия фторированных ФОС и конкретным положением фторирования на углеродном каркасе [9].

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

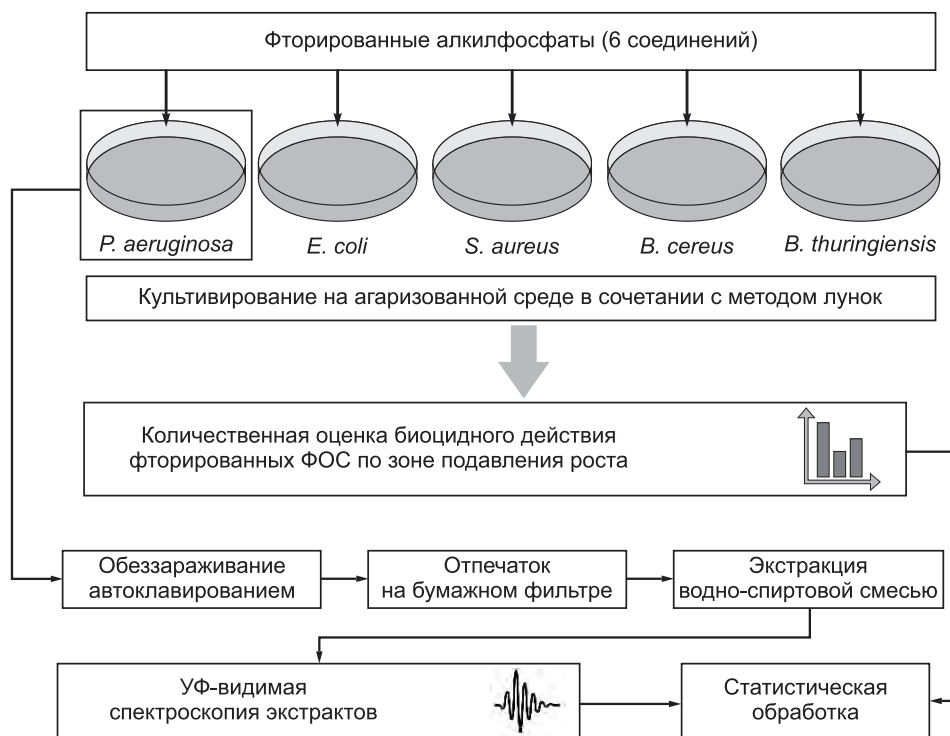
Исследовать влияние ряда фторированных алкилфосфатов на рост бактериальных тест-культур на агаризованной среде и выявить сопряжённые метаболические маркеры методами УФ/видимой спектроскопии.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Общая схема исследования представлена на рисунке 1. В работе использовались шесть органилфосфатов разной степени фторированности, из которых 3 циклических (С.Н) и 3 ациклических (А.Н), где N – число атомов фтора в алкильном радикале (табл. 1). Соединения синтезированы в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН [13, 14].

В качестве тест-культур использовали пять штаммов факультативно анаэробных бактерий, относящиеся к разным таксономическим и экологическим группам: *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (любезно предоставлены д.б.н. В.А. Ченкели, НИИ биологии ИГУ); *Pseudomonas aeruginosa* 1СВ, *Bacillus cereus* 846, *Bacillus thuringiensis* 7-14 КС (из коллекции кафедры микробиологии ИГУ).

Антибактериальную активность органилфосфатов на рост микроорганизмов оценивали в чашка Петри



**РИС. 1.**  
Общая схема исследований

**FIG. 1.**  
General research scheme

**ТАБЛИЦА 1**  
**ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДОВАННЫХ**  
**ФТОРИРОВАННЫХ ОРГАНИЛФОСФАТОВ**

**TABLE 1**  
**FEATURE OF THE STUDIED FLUORINATED**  
**ORGANYL PHOSPHATES**

Общая структура	Фторсодержащая алкильная группа R <sub>F</sub> (F = 0...8)	Номенклатурное название соединения	Условное обозначение
	-CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	4-метил-2-(2,2,2-трифторэтокси)-1,3,2-диоксафосфоринан-2-оксид	С.3
	-CH <sub>2</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> H	4-метил-2-(2,2,3,3-тетрафторпропокси)-1,3,2-диоксафосфоринан-2-оксид	С.4
	-CH <sub>2</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> H	4-метил-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентилокси)-1,3,2-диоксафосфоринан-2-оксид	С.8
	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Бис(2-пропинил) пропилфосфат	А.0
	-CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	Бис(2-пропинил)(2,2,2-трифторэтил)фосфат	А.3
	-CH <sub>2</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> H	Бис(2-пропинил)(2,2,3,3-тетрафторпропил)фосфат	А.4

при помощи диффузионного метода в лунках РПА [15]. В лунку диаметром 1 см вносили 10%-е водные растворы ФОС (в случае С.8 – эмульсию) в объёмах, эквивалентных 0,02 ммоль препарата (50–80 мкл). Предварительные исследования показали, что 1%-я концентрация препаратов не влияет на рост культур. В качестве контроля использовался соответствующий объём дистиллированной воды. Чашки Петри инкубировали при +30 °С в течение 24 ч. Проявление бактерицидного действия тестируемых веществ оценивали по величине зоны подавления роста микроорганизмов вокруг лунки с помощью программы ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) [16].

Каждая серия культивирования проводилась в трёх повторностях с определением математического ожидания и стандартного отклонения. Статистическая значимость различий между выборками оценивалась с использованием непараметрических методов: критерия Краскела – Уоллиса и двухфакторного PERMANOVA. Взаимосвязь между переменными оценивалась с помощью коэффициента линейной корреляции  $r$ . Все статистические критерии рассматривались при  $p < 0,05$ . Вычисления проводились в программе Past v4.05 [17].

На следующем этапе культуру *P. aeruginosa* выращивали 24 часа на агаризованной среде РПА, содержащей индивидуальные органилфосфаты. Затем чашки Петри стерилизовали (121 °С, 20 мин) и после застывания агаризованной среды на её поверхность накладывали на 5 мин под давлением 0,9 кПа фильтровальную бумагу (синяя лента), предварительно отмытую 96%-м этанолом и высушенную. Компоненты, перенесённые на фильтр, экстрагировали 10 мл 96%-го этилового спирта. В качестве контролей использовались комбинации «РПА», «РПА + ФОС» и «РПА + *P. aeruginosa*».

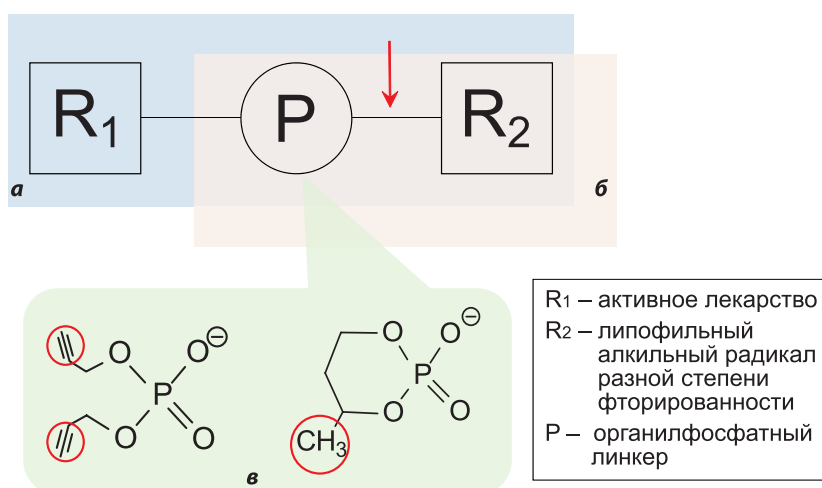
Для спиртовых растворов, содержащих метаболиты *P. aeruginosa*, и всех контрольных образцов зарегистрированы спектры поглощения (NanoPhotometer P330, Implen, Германия) в диапазоне длин волн от 200 до 950 нм в 10 мм кварцевой кювете. В качестве раствора сравнения использовался этанол.

Многомерный сравнительный анализ спектров для разных диапазонов длин волн осуществляли методом главных компонент (PCA) [18] в Past v.4.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярные структуры, состоящие из фосфорсодержащей части (фосфат-ион, фосфины, фосфамиды, фосфонаты) и неполярных радикалов (в том числе алкильных), активно используются при разработке пролекарств в качестве структурно-функциональных групп, необходимых для транспортировки лекарства через клеточные мембраны и его активации в мишенях. При этом предполагается, что сам носитель не проявляет выраженной биологической активности [4, 5].

В данной работе исследовались аналогичные двухкомпонентные органилфосфаты, структура которых, однако, отличается от соединений, которые рассматриваются в публикациях, посвящённых фосфорсодержащим пролекарствам. Во-первых, полярная часть молекулы представлена органическим фосфатом, во-вторых, использовались алкильные радикалы, различающиеся по степени фторированности (табл. 1; рис. 2). Такая архитектура, с одной стороны, обуславливает высокую липофильность молекулы без необходимости увеличения числа защитных групп, а с другой – может сопро-



**РИС. 2.**

Характеристика исследуемых органилфосфатов в рамках общей концепции трёхкомпонентных фосфорсодержащих пролекарств: **а** – общая структура молекулы; **б** – исследуемый временный носитель активной части; **в** – структура органилфосфатов. Круглыми маркерами отмечены возможные участки присоединения лекарства. Стрелкой указана связь, атакуемая эстеразами при активации пролекарства

**FIG. 2.**

Characterization of the studied organyl phosphates within the general concept of phosphorus-containing tripartite prodrugs: **a** – the general structure of the molecule; **б** – studied temporary transport moiety; **в** – the structure of organyl phosphates. Round markers flag possible drug attachment sites. The arrow indicates the bond attacked by esterases during activation of the prodrug

вождаться проявлением собственной метаболической и фармакологической активности.

В связи с этим на первом этапе было протестировано бактерицидное действие исследуемых ФОС. Предварительно была выявлена способность этих соединений вызывать помутнение жидких бактериальных питательных сред, что вносит неопределённость в количественную оценку динамики роста микроорганизмов (по OD600) при глубинном культивировании. Поэтому культивирование проводили на агаризованной среде в сочетании с методом лунок.

Результаты показали, что пять из шести исследованных ФОС, действительно, проявляют биологическую активность, хотя и в разной степени (рис. 3). По накопительному воздействию на тест-культуры исследуемые соединения можно разделить на три группы: 1) близкие по суммарному эффекту трифторзамещённые соединения (С.3 и А.3) – на долю каждого приходится ~30 % от общей площади подавления роста тест-культур; 2) циклический тетрафторированный препарат (С.4) – 15 %; 3) остальные ФОС либо не активные (А.4), либо со слабым бактериостатическим действием (А.0 и С.8) – на их долю суммарно приходится менее 10 % накопительного эффекта. Таким образом, наибольшая биоцидная активность характерна для соединений, исчерпывающе галогенированных по терминальному атому углерода этильного радикала (-CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>). Этот вывод статистически значим ( $p < 0,05$ ) по данным двухфакторного PERMANOVA и по критерию Краскела – Уоллиса.

В то же время можно выделить черты избирательного действия органилфосфатов на разные тест-культуры (рис. 4).

• Наименее толерантными оказались условно-патогенные виды (*B. cereus*, *S. aureus* и *P. aeruginosa*) – их рост подавлялся как высоко-, так и низкоактивными ФОС. Хотя у разных видов площадь подавления роста одним и тем же соединением различается по абсолютным зна-

чениям, выявлена статистически значимая межвидовая корреляция ( $p < 0,05$ ) биологических откликов (табл. 2), что может указывать на сходные механизмы биоцидного действия.

- Представитель нормобиоты человека *E. coli* проявил чувствительность только по отношению к циклическому трёхфторированному С.3;
- Безопасный для позвоночных и патогенный для насекомых *B. thuringiensis* оказался наиболее резистентным видом ко всем органилфосфатам.

То есть прослеживается как экологическая, так и видовая специфичность действия разных фосфорсодержащих соединений. Это даёт возможность, во-первых, синтезировать пролекарства, активные только по отношению к УПМ и относительно безвредные для симбиотического микробиома, а, во-вторых, разрабатывать технологии совместного применения бактериальных инсектицидов и химических пестицидов на основе органилфосфатов для нужд АПК и лесного комплекса.

ТАБЛИЦА 2  
МЕЖВИДОВАЯ КОРРЕЛЯЦИЯ РОСТА ТЕСТ-КУЛЬТУР В ПРИСУТСТВИИ ОРГАНИЛФОСФАТОВ

TABLE 2  
INTERSPECIFIC CORRELATION OF TEST CULTURE DEVELOPMENT IN THE PRESENCE OF ORGANYL PHOSPHATES

Сопоставляемые виды	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>B. cereus</i> / <i>S. aureus</i>	0,94	0,002
<i>P. aeruginosa</i> / <i>S. aureus</i>	0,75	0,051
<i>P. aeruginosa</i> / <i>B. cereus</i>	0,81	0,026

Биоцидный эффект А.3 и С.3 указывает на их способность легко проникать через клеточные барье-

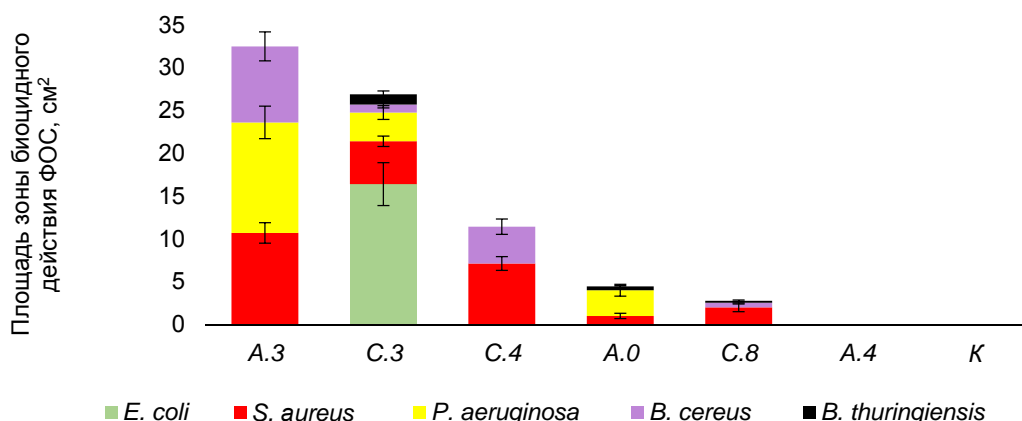
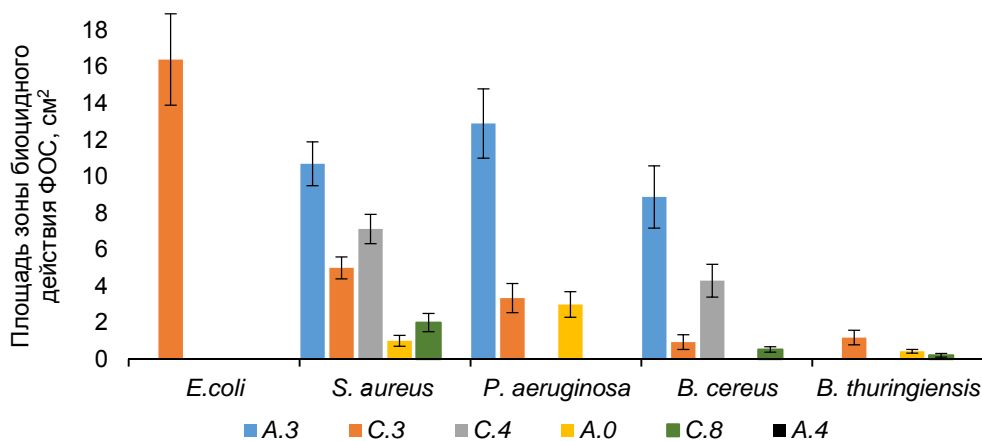


РИС. 3.

Гистограмма с накоплением, показывающая влияние отдельных фторзамещённых органилфосфатов на культуры бактерий (по данным диффузионного метода в лунках РПА): обозначение ФОС соответствует таблице 1; К – контрольные среды без внесения органилфосфатов

FIG. 3.

Stacked bar chart showing effect of single fluorine substituted organyl phosphates on bacterial cultures (according to the agar well diffusion method): designation of organyl phosphates corresponds to Table 1; K – growth mediums without adding organyl phosphates



**РИС. 4.**

Биоцидное действие фторзамещённых органилфосфатов на индивидуальные культуры бактерий (по данным диффузионного метода в лунках РПА): обозначение ФОС соответствует таблице 1

**FIG. 4.**

Biocidal effect of fluorine-substituted organyl phosphates on individual bacterial culture (according to agar well diffusion method): designation of organyl phosphates corresponds to Table 1

ры. Их активность, очевидно, обусловлена влиянием  $CF_3CH_2$ -группы, которая высвобождается в результате гидролиза сложноэфирной связи и может участвовать в биохимических реакциях с образованием продуктов, угнетающих метаболические процессы [10, 11]. Однако липофильность пропильной группы в A.0 выше, чем у трифторэтильной группы: для алканового эквивалента по  $logP_{ow}$  – 2,36 против 1,74 (National Library of Medicine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). То есть A.0 также должен легко проникать в бактериальные клетки, но при этом он не проявляет выраженного антибиотического действия.

Таким образом, комплексы «органический фосфат – алкильный радикал», являются потенциальными временными носителями лекарственного фрагмента (рис. 2), но при наличии атомов фтора проявляют собственную биоцидную активность. Эта активность, вероятно, зависит от расположения атомов фтора на радикале, которое может влиять на доступность молекулы для внутриклеточных активирующих эстераз и на метаболическую активность продуктов гидролиза. Липофильность алкильной группы, не аддитивно зависящая от комбинирования её длины и степени фторирования [10, 19], также может влиять на ферментативный гидролиз этого комплекса в водной фазе.

Задачей следующего этапа было выявление возможных метаболических маркеров, которые могли бы подтвердить роль отмеченных факторов в наблюдаемом действии ФОС. Подобный маркер должен отвечать следующим критериям. Во-первых, для максимального охвата клеточных метаболитов (и для снижения рисков работы с патогенной культурой) клетки необходимо предварительно подвергнуть разрушению, поэтому молекула должна быть стабильной в широком диапазоне физических воздействий. Во-вторых, для эффективного отделения от прочих продуктов культивирования маркер должен быть низкомолекулярным и умеренно полярным. В-третьих, он должен легко детектироваться, например, спек-

тральными методами. Наконец, желательно, чтобы интенсивность детектируемого сигнала была связана с условиями культивирования и с культуральными свойствами микроорганизмов.

Кандидатом на роль маркера рассматривались пигменты на основе феназина, продуцируемые *P. aeruginosa*. Феназин устойчив при температуре выше 300 °С, имеет выраженные максимумы поглощения в ближнем ультрафиолете (NIST Chemistry WebBook, <https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C92820>), его количество в культуре зависит от окислительно-восстановительных условий среды, а производные ярко окрашены. В контексте рассматриваемой проблемы немаловажными являются ещё два свойства пигментов феназинового ряда: с одной стороны, они обладают собственными антибиотическими свойствами, а с другой – обуславливают антибиотикорезистентность бактерии [20, 21].

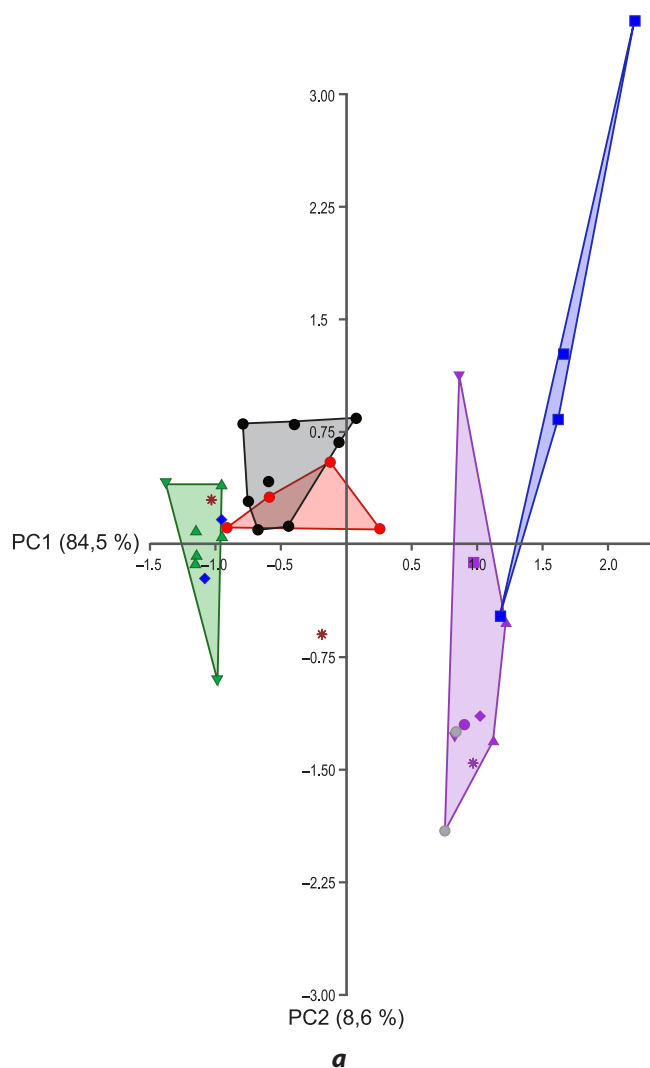
После завершения культивирования клетки *P. aeruginosa* разрушили автоклавированием, затем низкомолекулярные компоненты, растворённые в жидкой фазе агаризованной среды, перенесли на фильтровальную бумагу с последующей экстракцией этанолом. Для экстрактов были зарегистрированы УФ/видимые спектры поглощения. Предварительно было показано, что спиртовые растворы индивидуальных ФОС не проявляли заметной оптической активности во всём спектральном диапазоне.

К сожалению, в полученных спектрах не удалось выявить индивидуальные сигналы, которые маркировали бы активность органилфосфатов, поэтому дальнейший сравнительный анализ спектров проводился с использованием метода главных компонент (рис. 5). Метод позволяет выявить сходства и различия между спектрами без предварительной идентификации индивидуальных компонентов смеси [18] и реализовывался как для всей шкалы спектрофотометра (200–950 нм), так и для диапазона длин волн, соответствующего максимальному разделению пространства главных компонент на индивидуальные области (250–260 и 270–280 нм).

На долю первой и второй компонент проецировалась максимальная доля общей дисперсии для обоих вариантов анализа (рис. 5а, б). Однако если в случае всего спектрального диапазона наблюдается перекрывание областей точечных проекций спектров, соответствующих разным условиям культивирования (рис. 5а), то при анализе спектров специфического диапазона (рис. 5б), отчетливо выделяются локальные области, соответствующие:

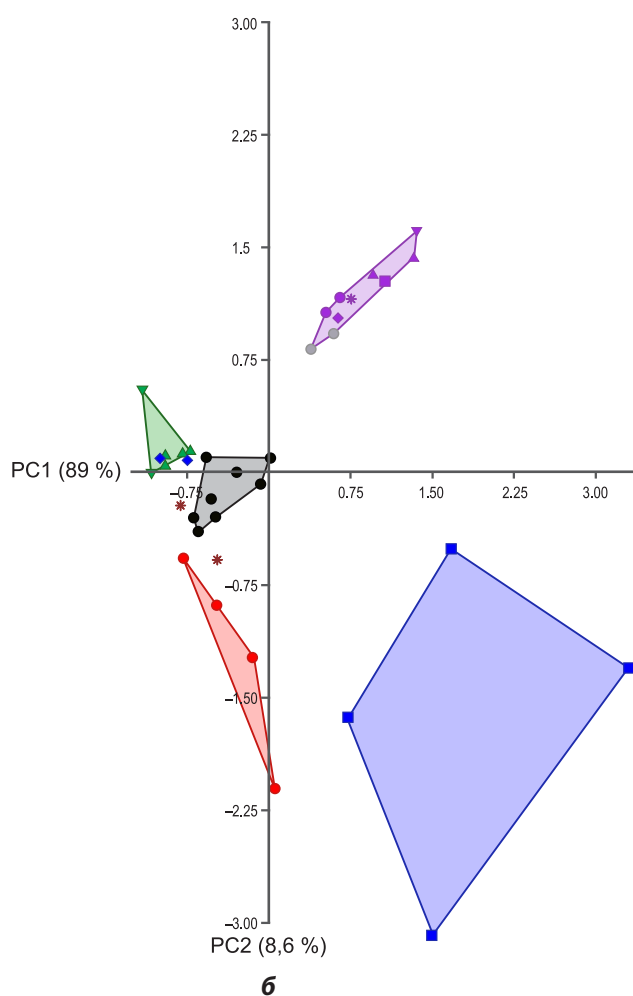
- культивированию на контрольной среде без ФОС (серая область);

- контрольным средам «РПА» и «РПА + ФОС» без инокулята (фиолетовая);
- опытным средам, содержащим активные трёхфторзамещённые С.3 и А.3 (зелёная);
- опытным средам, содержащим циклический четырёхзамещённый С.4 (синяя);
- опытным средам, содержащим ациклический нефторированный А.0 со слабым бактериостатическим действием (красная).



**РИС. 5.**

Представление УФ/видимых спектров исследованных растворов в пространстве главных компонент: **а** – для всего спектрального диапазона (200–950 нм); **б** – для диапазонов, выявляющих максимальные различия между спектрами разных групп (250–260 и 270–280 нм). Области, соответствующие ранжированию спектров по разным контрольным и опытным группам, выделены цветом. Форма маркера соответствует числу атомов фтора в молекуле органилфосфата: ● – контроль по культуре без ФОС; ● – контроль по питательной среде; ● – А.0; ▲ – А.3; ▼ – С.3; ■ – С.4; ◆ – А.4; \* – С.8. Контрольные среды, содержащие органилфосфаты, маркированы аналогичными символами фиолетового цвета. Обозначения ФОС соответствуют таблице 1



**FIG. 5.**

Representation of UV/visible spectra of the investigated solutions in the space of the principal components: **a** – for the entire spectral range (200–950 nm); **b** – for ranges with maximum differences between different groups of spectra (250–260 and 270–280 nm). Areas appropriate to the ranking of spectra for different control and experimental groups are marked with various color. The markers view corresponds to the number of fluorine atoms in an organyl phosphate molecule: ● – growth medium without OPC; ● – uninoculated medium controls; ● – А.0; ▲ – А.3; ▼ – С.3; ■ – С.4; ◆ – А.4; \* – С.8. Uninoculated media containing organyl phosphates are labeled with similar markers in purple. Designations of organyl phosphates correspond to Table 1



Эти результаты, на наш взгляд, указывают на то, что в спектрах содержатся паттерны, отражающие метаболические эффекты, опосредованные только структурой радикалов. То есть органилфосфаты с одинаковой алкильной частью индуцируют в клетках сходные молекулярные процессы, которые, во всяком случае, по отношению к *P. aeruginosa*, не обязательно сопряжены с проявлением биоцидного действия. Исключением являются органилфосфаты с тетрафторированными радикалами (А.4 и С.4), которые различаются и по биологической активности, и по влиянию на спектральные характеристики сред культивирования. Чтобы выявить более однозначную взаимосвязь между структурой алкильного радикала, биологической активностью исследуемого органилфосфата и спектральными свойствами сред культивирования необходимо исследовать аналогичные соединения с другими вариантами расположения фтора в этильном и пропильном радикалах.

На данном этапе следует обратить внимание на два соединения. Это, во-первых, А.3, который проявляет наиболее заметную собственную антибиотическую активность ко всем условно-патогенным видам, и механизм его действия объясняется окислением фторированного этильного радикала в присутствии неспецифических дегидрогеназ до токсичных соединений (например, до трифторацетата, индуцирующего развитие клеточной гипоксии) [10, 11]. Второе соединение – А.0 – обладает слабым бактериостатическим действием, вероятно, обусловленным влиянием только пропилильных групп в фосфатном линкере (рис. 2) (показано, что введение подобной группы усиливает активность антибиотиков [22]), а высвобождаемая эстеразами в виде спирта алкильная группа легко метаболизируется в клетке. Если лекарственный фрагмент будет связан с временным носителем через пропилильную группу, то активность трёхкомпонентного пролекарства на основе носителя А.0 будет определяться только специфичностью лекарственной части.

Проантибиотики на основе А.3, по сравнению с А.0, будут характеризоваться более низкой специфичностью, но более высокой активностью, если действие метаболически активных групп (лекарства и фторированного алкила) будет аддитивным или синергетичным. Подобные препараты могут найти применение не только в здравоохранении, но и в других видах деятельности, связанных с защитой от нежелательного микробиологического воздействия: АПК, лесная и деревоперерабатывающая промышленность и др.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была изучена биоцидная активность шести фосфорорганических соединений, которые потенциально могут использоваться для дизайна проантибиотиков в качестве временного носителя активной части. Два соединения (А.3 и С.3) обладают собственной бактерицидной активностью, обусловленной липофильным  $CF_3CH_2$ -радикалом. Наиболее вероятная

последовательность молекулярных процессов, протекающих с их участием, включает следующие этапы: транспортировка в клетку → гидролиз фосфоэфирной связи → окисление фторированного алкила до токсичных продуктов. Нефторированный А.0 также способен проникать через клеточные барьеры, не проявляя при этом биологической активности. То есть этот носитель не является прекурсором, поэтому пролекарство на его основе будет характеризоваться более высокой специфичностью.

На примере культуры *P. aeruginosa* показано, что эти особенности органилфосфатов отражаются в УФ/видимых спектрах сред культивирования. Хотя сигналов, соответствующих конкретным хромофорным группам, в спектрах не выявлено, их сравнительный анализ методами ординации указывает на связь структуры алкильного радикала и ФОС-опосредованного метаболического отклика клеток.

Для разработки более общих критериев, позволяющих прогнозировать влияние разных алкильных групп на эффективность проантибиотиков, необходимо получить дополнительную информацию о биологической активности других изомеров фторсодержащих алкильных радикалов и о спектральных свойствах ФОС-содержащих сред культивирования прочих тест-культур. Наконец, несомненный интерес представляет исследование биологических свойств молекул, включающих как активную часть пролекарства, так и защитные группы, которым посвящена данная работа.

## Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Piplani M, Rana AC, Sharma PC. Prodrugs of antiinfective agents: A review. *J Pharm Pharm Sci.* 2016; 19(1): 82-113. doi: 10.18433/J3X615
2. Pal A, Banik BK. Highly efficient prodrugs: Design and therapeutic applications. *Orient J Chem.* 2020; 36(6): 985-1000. doi: 10.13005/ojc/360601
3. Miller JJ, Shah IT, Hatten J, Barekatin Y, Mueller EA, Moustafa AM, et al. Structure-guided microbial targeting of antistaphylococcal prodrugs. *eLife.* 2021; 10: e66657. doi: 10.7554/eLife.66657
4. Yu H, Yang H, Shi E, Tang W. Development and clinical application of phosphorus-containing drugs. *Med Drug Discov.* 2020; 8: 100063. doi: 10.1016/j.medidd.2020.100063
5. Wiemer AJ. Metabolic efficacy of phosphate prodrugs and the remdesivir paradigm. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2020; 3(4): 613-626. doi: 10.1021/acspsci.0c00076
6. Edwards RL, Heueck I, Lee SG, Shah IT, Miller JJ, Jezewski AJ, et al. Potent, specific MEPicides for treatment of zoonotic staphylococci. *PLoS Pathog.* 2020; 16(6): e1007806. doi: 10.1371/journal.ppat.1007806
7. Wiemer AJ, Wiemer DF. Prodrugs of phosphonates and phosphates: Crossing the membrane barrier. In: Montchamp JL (eds). *Phosphorus Chemistry I.* Springer International Publishing, Switzerland; 2014: 115-160. doi: 10.1007/128\_2014\_561

8. Heidel KM, Dowd CS. Phosphonate prodrugs: An overview and recent advances. *Future Med Chem.* 2019; 11(13): 1625-1643. doi: 10.4155/fmc-2018-0591
9. Baszczyński O, Janeba Z. Medicinal chemistry of fluorinated cyclic and acyclic nucleoside phosphonates. *Med Res Rev.* 2013; 33(6): 1304-1344. doi: 10.1002/med.21296
10. Ojima I. *Fluorine in medicinal chemistry and chemical biology.* Oxford: Blackwell Publishing, Ltd; 2009. doi: 10.1002/9781444312096
11. O'Hagan D, Rzepa HS. Some influences of fluorine in bioorganic chemistry. *Chem Commun.* 1997; 7: 645-652. doi: 10.1039/A604140J
12. Chao CK, Balasubramanian N, Gerdes JM, Thompson CM. The inhibition, reactivation and mechanism of VX-, sarin-, fluoro-VX and fluoro-sarin surrogates following their interaction with HuAChE and HuBuChE. *Chem Biol Interact.* 2018; 291: 220-227. doi: 10.1016/j.cbi.2018.06.019
13. Верхотурова С.И., Налибаева А.М., Арбузова С.Н., Казанцева Т.И., Зинченко С.В., Михайленко В.Л., и др. Полифторалкилфосфаты с пропаргильными заместителями. *Журнал общей химии.* 2019; 89(4): 574-579. doi: 10.1134/S0044460X19040115
14. Михайленко В.Л., Вячина О.Ф., Налибаева А.М., Поздеева А.С., Бишимбаева Г.К., Верхотурова С.И. Оценка бактерицидной активности фторсодержащих диоксафосфоринаноксидов. *Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология».* 2019; 27: 30-40. doi: 10.26516/2073-3372.2019.27.30
15. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 2016; 6(2): 71-79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005
16. Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ. *Biophotonics international.* 2004; 11(7): 36-42.
17. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaentologia Electronica.* 2001; 4(1): 9.
18. Craig AP, Franca AS, Irudayaraj J. Pattern recognition applied to spectroscopy: Conventional methods and future directions. In: Darrell BV (eds.) *Pattern Recognition: Practices, Perspectives and Challenges.* New York, United States: Nova Science Publishers, Inc; 2013: 1-45.
19. Ruelle P. The n-octanol and n-hexane/water partition coefficient of environmentally relevant chemicals predicted from the mobile order and disorder (MOD) thermodynamics. *Chemosphere.* 2000; 40(5): 457-512. doi: 10.1016/s0045-6535(99)00268-4
20. Dietrich LE, Okegbe C, Price-Whelan A, Sakhtah H, Hunter RC, Newman DK. Bacterial community morphogenesis is intimately linked to the intracellular redox state. *J Bacteriol.* 2013; 195(7): 1371-1380. doi: 10.1128/JB.02273-12
21. Schiessl KT, Hu F, Jo J, Nazia SZ, Wang B, Price-Whelan A, et al. Phenazine production promotes antibiotic tolerance and metabolic heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nat Commun.* 2019; 10(1): 762. doi: 10.1038/s41467-019-08733-w
22. Wang J, Ansari MF, Lin J-M, Zhou C-H. Design and synthesis of sulfanilamide aminophosphonates as novel antibacterial agents towards *Escherichia coli*. *Chin J Chem.* 2021; 39: 2251-2263. doi: 10.1002/cjoc.202100165

## REFERENCES

1. Piplani M, Rana AC, Sharma PC. Prodrugs of anti-infective agents: A review. *J Pharm Pharm Sci.* 2016; 19(1): 82-113. doi: 10.18433/J3X61S
2. Pal A, Banik BK. Highly efficient prodrugs: Design and therapeutic applications. *Orient J Chem.* 2020; 36(6): 985-1000. doi: 10.13005/ojc/360601
3. Miller JJ, Shah IT, Hatten J, Berekatayn Y, Mueller EA, Moustafa AM, et al. Structure-guided microbial targeting of antistaphylococcal prodrugs. *eLife.* 2021; 10: e66657. doi: 10.7554/eLife.66657
4. Yu H, Yang H, Shi E, Tang W. Development and clinical application of phosphorus-containing drugs. *Med Drug Discov.* 2020; 8: 100063. doi: 10.1016/j.medidd.2020.100063
5. Wiemer AJ. Metabolic efficacy of phosphate prodrugs and the remdesivir paradigm. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2020; 3(4): 613-626. doi: 10.1021/acscptsci.0c00076
6. Edwards RL, Heueckl I, Lee SG, Shah IT, Miller JJ, Jezewski AJ, et al. Potent, specific MEpicides for treatment of zoonotic staphylococci. *PLoS Pathog.* 2020; 16(6): e1007806. doi: 10.1371/journal.ppat.1007806
7. Wiemer AJ, Wiemer DF. Prodrugs of phosphonates and phosphates: Crossing the membrane barrier. In: Montchamp JL (eds.) *Phosphorus Chemistry I.* Springer International Publishing, Switzerland; 2014: 115-160. doi: 10.1007/128\_2014\_561
8. Heidel KM, Dowd CS. Phosphonate prodrugs: An overview and recent advances. *Future Med Chem.* 2019; 11(13): 1625-1643. doi: 10.4155/fmc-2018-0591
9. Baszczyński O, Janeba Z. Medicinal chemistry of fluorinated cyclic and acyclic nucleoside phosphonates. *Med Res Rev.* 2013; 33(6): 1304-1344. doi: 10.1002/med.21296
10. Ojima I. *Fluorine in medicinal chemistry and chemical biology.* Oxford: Blackwell Publishing, Ltd; 2009: 624. doi: 10.1002/9781444312096
11. O'Hagan D, Rzepa HS. Some influences of fluorine in bioorganic chemistry. *Chem Commun.* 1997; 7: 645-652. doi: 10.1039/A604140J
12. Chao CK, Balasubramanian N, Gerdes JM, Thompson CM. The inhibition, reactivation and mechanism of VX-, sarin-, fluoro-VX and fluoro-sarin surrogates following their interaction with HuAChE and HuBuChE. *Chem Biol Interact.* 2018; 291: 220-227. doi: 10.1016/j.cbi.2018.06.019
13. Verkhoturova SI, Arbusova SN, Kazantseva TI, Zinchenko SV, Chernysheva NA, Gusarova NK, et al. Polyfluoroalkyl phosphates bearing propargyl substituents. *Russian Journal of General Chemistry.* 2019; 89(4): 708-712. (In Russ.). doi: 10.1134/S107036321904011X
14. Mikhailenko VL, Vyatchina OF, Nalibayeva AM, Pozdееva AS, Bishimbayeva GK, Verkhoturova SI. Estimation of bactericidal activity of fluorine-containing dioxaphosphorinane oxides. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology.* 2019; 27: 30-40. (In Russ.). doi: 10.26516/2073-3372.2019.27.30
15. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 2016; 6(2): 71-79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005
16. Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ. *Biophotonics international.* 2004; 11(7): 36-42.
17. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaentologia Electronica.* 2001; 4(1): 9.

18. Craig AP, Franca AS, Irudayaraj J. Pattern recognition applied to spectroscopy: Conventional methods and future directions. In: Darrell BV. (eds.) *Pattern Recognition: Practices, Perspectives and Challenges*. New York, United States: Nova Science Publishers, Inc; 2013: 1-45.

19. Ruelle P. The n-octanol and n-hexane/water partition coefficient of environmentally relevant chemicals predicted from the mobile order and disorder (MOD) thermodynamics. *Chemosphere*. 2000; 40(5): 457-512. doi: 10.1016/s0045-6535(99)00268-4

20. Dietrich LE, Okegbe C, Price-Whelan A, Sakhtah H, Hunter RC, Newman DK. Bacterial community morphogenesis

is intimately linked to the intracellular redox state. *J Bacteriol*. 2013; 195(7): 1371-1380. doi: 10.1128/JB.02273-12

21. Schiessl KT, Hu F, Jo J, Nazia SZ, Wang B, Price-Whelan A, et al. Phenazine production promotes antibiotic tolerance and metabolic heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nat Commun*. 2019; 10(1): 762. doi: 10.1038/s41467-019-08733-w

22. Wang J, Ansari MF, Lin J-M, Zhou C-H. Design and synthesis of sulfanilamide aminophosphonates as novel antibacterial agents towards *Escherichia coli*. *Chin J Chem*. 2021; 39: 2251-2263. doi: 10.1002/cjoc.202100165

#### Сведения об авторах

**Приставка Алексей Александрович** – кандидат биологических наук, доцент кафедры физико-химической биологии, биоинженерии и биоинформатики, ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», e-mail: pristavk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0724-8565>

**Михайленко Валентина Львовна** – кандидат химических наук, доцент кафедры физико-химической биологии, биоинженерии и биоинформатики, ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», e-mail: mival63@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2278-2990>

**Вятчина Ольга Фёдоровна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», e-mail: olgairk3@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2205-1971>

**Юринова Галина Валерьевна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры физико-химической биологии, биоинженерии и биоинформатики, ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», e-mail: yurinova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2266-6068>

**Верхотурова Светлана Ильясовна** – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории непредельных гетероатомных соединений, ФГБН «Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН», e-mail: verkhoturova@irioch.irk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0297-1981>

**Апарцин Константин Анатольевич** – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий, ФГБН «Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», e-mail: dr.apartsin@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0003-0577-9001>

**Саловарова Валентина Петровна** – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой физико-химической биологии, биоинженерии и биоинформатики, ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», e-mail: vsalovarova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3693-9058>

#### Information about the authors

**Aleksey A. Pristavka** – Cand. Sc. (Biol.), Associate Professor at the Department of Physicochemical Biology, Bioengineering and Bioinformatics, Irkutsk State University, e-mail: pristavk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0724-8565>

**Valentina L. Mikhailenko** – Cand. Sc. (Chem.), Associate Professor at the Department of Physicochemical Biology, Bioengineering and Bioinformatics of Irkutsk State University, e-mail: mival63@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2278-2990>

**Olga F. Vyatchina** – Cand. Sc. (Biol.), Associate Professor at the Department of Microbiology, Irkutsk State University, e-mail: olgairk3@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2205-1971>

**Galina V. Yurinova** – Cand. Sc. (Biol.), Associate Professor at the Department of Physicochemical Biology, Bioengineering and Bioinformatics, Irkutsk State University, e-mail: yurinova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2266-6068>

**Svetlana I. Verkhoturova** – Cand. Sc. (Chem.), Senior Research Officer at the Laboratory of Unsaturated Heteroatomic Compounds, A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: verkhoturova@irioch.irk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0297-1981>

**Konstantin A. Apartsin** – Dr. Sc. (Med.), Professor, Chief Research Officer at the Department of Medical and Biological Researches and Technologies, Irkutsk Scientific Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: dr.apartsin@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0003-0577-9001>

**Valentina P. Salovarova** – Dr. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department of Physicochemical Biology, Bioengineering and Bioinformatics, Irkutsk State University, e-mail: vsalovarova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3693-9058>