

ИНГИБИТОРЫ СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ КЛАССОВ АМИНОПИРИДИНОВ И АМИНОПИРИМИДИНОВ — КАНДИДАТЫ В ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ ТУБЕРКУЛЕЗА

Д. А. Маслов¹, О. Б. Беккер¹, М. Г. Алексеева¹, Л. М. Князева¹, Д. А. Мавлетова¹, И. И. Афанасьев², Н. И. Василевич², В. Н. Даниленко^{1✉}

¹ Лаборатория генетики микроорганизмов, Отдел генетических основ биотехнологии, Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

² ООО «Новые научные технологии», Москва

Туберкулез — самая смертоносная бактериальная инфекция из известных человеку, при этом ее лечение осложнено появлением и быстрым распространением штаммов возбудителя, *Mycobacterium tuberculosis*, с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ и ШЛУ). В результате главным требованием к разрабатываемым противотуберкулезным препаратам является использование новых классов химических соединений, поражающих новые биомишени. Серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) — перспективные мишени, а аминопиридины и аминопириимидины, ранее не применявшиеся в качестве противотуберкулезных препаратов, имеют предсказанную активность в отношении СТПК. В данной работе в тест-системе *Mycobacterium smegmatis* *aphVIII+*, предназначенной для отбора ингибиторов СТПК на клеточном уровне, был проведен скрининг 192 соединений двух указанных классов. Сначала отобрали 53 соединения с субингибирующей концентрацией до 100 нмоль/диск. Из них 22 соединения проявили активность в тест-системе как ингибиторы СТПК, которая была подтверждена *in vitro* на белке PknA *M. tuberculosis* (наивысшее значение показателя ингибирования — $26,9 \pm 6,1$ %). Также отобранные соединения тестировали на токсичность *in vitro* на клетках фибробластов эмбриона человека с использованием МТТ-теста. В результате для дальнейших исследований в качестве новых препаратов для борьбы с МЛУ-туберкулезом были отобраны 3 ингибитора СТПК с относительно высокой активностью и относительно низкой токсичностью.

Ключевые слова: туберкулез, множественная лекарственная устойчивость, серин-треониновые протеинкиназы, аминопиридины, аминопириимидины, ингибиторы, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, *aphVIII*

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.576.21.0019 от 27 июля 2014 г., шифр RFMEFI57614X0019).

✉ Для корреспонденции: Даниленко Валерий Николаевич
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119991; valerid@vigg.ru

Статья получена: 30.01.2017 Статья принята к печати: 11.02.2017

AMINOPYRIDINE- AND AMINOPYRIMIDINE-BASED SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE INHIBITORS ARE DRUG CANDIDATES FOR TREATING DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS

Maslov DA¹, Bekker OB¹, Alekseeva MG¹, Kniazeva LM¹, Mavletova DA¹, Afanasyev II², Vasilevich NI², Danilenko VN^{1✉}

¹ Laboratory of Bacterial Genetics, Department of Genetics and Biotechnology, Vavilov Institute of General Genetics of RAS, Moscow, Russia

² Novie Nauchnie Tekhnologii Ltd., Moscow, Russia

Tuberculosis (TB) is the world's deadliest bacterial infection. Its causative agent *Mycobacterium tuberculosis* evolves into rapidly spreading multidrug-resistant and extensively drug-resistant (MDR and XDR) strains, which complicates the treatment. Therefore, the use of novel target-specific chemical compounds is crucial for the development of effective antituberculosis agents. Serine/threonine protein kinases (STPKs) of *M. tuberculosis* are currently considered as attractive drug targets. In turn, aminopyridines and aminopyrimidines that have not been used for TB treatment so far exhibit inhibitory activity towards STPKs. In this study we screened 192 aminopyridine- and aminopyrimidine-based compounds using the *Mycobacterium smegmatis* *aphVIII+* test system designed to screen for active STPKs inhibitors. First, we selected 53 compounds with subinhibiting concentrations of up to 100 nmol/disk. Of them, 22 showed STPKs-inhibiting activity in the test system, which was confirmed *in vitro* on the *M. tuberculosis* PknA protein with a maximum of 26.9 ± 6.1 %. Toxicity testing was performed *in vitro* on human embryo fibroblasts using the MTT-assay. Ultimately, 3 relatively active and relatively non-toxic STPKs inhibitors were selected for further research as drug candidates for MDR-TB treatment.

Keywords: tuberculosis, multidrug resistance, serine/threonine protein kinases, aminopyridines, aminopyrimidines, inhibitors, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, *aphVIII*

Funding: this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Grant No. 14.576.21.0019 dated July 27, 2014; ID RFMEFI57614X0019).

✉ Correspondence should be addressed: Valery Danilenko
ul. Gubkina, d. 3, Moscow, Russia, 119991; valerid@vigg.ru

Received: 30.01.2017 Accepted: 11.02.2017

Туберкулез — одно из самых опасных инфекционных заболеваний современности, уносящее ежегодно более 1,4 млн жизней при 10,4 млн новых случаев заболевания [1]. Главной проблемой в лечении туберкулеза является возникновение и широкое распространение форм с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), выражающейся в резистентности возбудителя, *Mycobacterium tuberculosis*, к самым эффективным и слаботоксичным противотуберкулезным препаратам первого ряда — рифампицину и изониазиду [2], вследствие чего возникает необходимость прибегать к применению более дорогих и токсичных препаратов второго ряда [3]. Частным случаем МЛУ является широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ) — МЛУ с дополнительной устойчивостью к одному препарату из группы фторхинолонов и к одному из инъекционных препаратов второго ряда (амикацин, канамицин либо капреомицин) [3]. В последние годы в Иране, Индии и ЮАР фиксировали случаи инфицирования *M. tuberculosis*, устойчивой ко всем применяемым противотуберкулезным препаратам первого и второго ряда, т. е. обладающей тотальной лекарственной устойчивостью [4–6]. Россия и другие страны постсоветского пространства лидируют по уровню распространения туберкулеза с МЛУ [7]: почти в каждом пятом случае из всех случаев впервые диагностируемого туберкулеза и каждом втором — из всех случаев ранее леченного туберкулеза наблюдается МЛУ [1].

В последние 50–60 лет, т. е. в эру антибиотиков, наблюдается направленный отбор лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*. В норме, при частоте случайных мутаций 10^{-6} – 10^{-8} на одно клеточное деление, встретить МЛУ-штамм было бы практически невозможно, особенно при комплексной противотуберкулезной терапии. Однако развитию и распространению МЛУ способствует ряд факторов: монотерапия, обусловленная отсутствием запасов необходимых лекарств; неправильные или неэффективные режимы химиотерапии; несоблюдение режима химиотерапии самими пациентами [8]. Свою роль в этом процессе играет и длительное применение одного и того же набора препаратов. Так, за последние 40 лет единственным новым противотуберкулезным препаратом, введенным в клиническую практику, стал бедаквилин [9].

Повышение эффективности лечения туберкулеза зависит от разработки новых лекарственных препаратов, способных воздействовать на новые биомишени, тем самым преодолевая имеющиеся у возбудителя механизмы устойчивости. Перспективными мишенями представляются серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) — одни из наиболее универсальных регуляторов жизнеспособности про- и эукариотических клеток. В частности, у микобактерий эти ферменты регулируют такие важные процессы жизнедеятельности клетки, как рост и деление, вирулентность, персистенция и природная лекарственная устойчивость к антибиотикам [10–14]. Способность ингибировать СТПК с высоким уровнем специфичности была показана для соединений классов аминопиридинов и аминопиримидинов [15], при этом ранее они не применялись в качестве противотуберкулезных препаратов, поэтому к ним нет пула устойчивых мутантов.

Ранее авторами была создана и валидирована тест-система *Mycobacterium smegmatis aphVIII+*, способная отбирать активные ингибиторы микобактериальных СТПК и, в частности, PknA *M. tuberculosis* [16]. Целью данной работы являлся отбор активных ингибиторов СТПК среди соединений классов аминопиридинов и аминопирими-

динов — кандидатов в противотуберкулезные препараты, способные преодолевать МЛУ и ШЛУ.

Результаты, представленные в статье, являются частью диссертации на соискание степени кандидата биологических наук, защищенной одним из авторов в декабре 2016 г. [17]. Полученные результаты не публиковались ранее, и авторы считают их достаточно значимыми для представления широкой научной общественности путем опубликования в научном журнале.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования

В работе использовали штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS и штамм *M. smegmatis* mc² 155. Для культивирования *E. coli* использовали среду LB (Amresco, США), а для *M. smegmatis* — среду Lemco-Tw (5 г/л Lemco Powder, 5 г/л NaCl, 5 г/л бакто-пептона, 0,05 % Tween-80). Культивирование бактерий в жидкой среде проводили в шейкере-инкубаторе Multitron (Infors HT, Швейцария) при 37 °C и 250 об/мин. Твердые среды содержали 2,0 % агара. В качестве среды для тестирования соединений в тест-системе использовали среду M290 (триптон-соевый агар, HiMedia, Индия).

Методика тестирования соединений в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*

Культуру *M. smegmatis aphVIII+* разводили в соотношении 1 : 9 : 10 (культура : вода : среда M290) и заливали верхним слоем на чашки Петри с агаризованной средой M290 в качестве нижнего слоя. В среду добавляли селективный антибиотик гиромоцин до конечной концентрации 50 мкг/мл, а также тетрациклин в концентрации 10 нг/мл для индукции. После высыхания чашек с культурой на них накладывали бумажные диски либо с исследуемым соединением, либо с канамицином, либо с их комбинацией. Чашки инкубировали при 37 °C до появления газона, после чего производили измерение зон ингибирования роста культуры в 3–5 независимых повторах [16].

Очистка белков PknA *M. tuberculosis* и AphVIII

Синтез гена *pknA M. tuberculosis* с адаптацией кодонов для оптимизации экспрессии в клетках *E. coli* был проведен компанией «Евроген» (Россия). Ген был синтезирован и клонирован в составе экспрессионного вектора pET-32a. Плазмиды, содержащие гены *pknA* и *aphVIII* (pET16b-*aphVIII*) [18], были трансформированы в штамм *E. coli* BL21 (DE3) pLysS методом кальциевой трансформации [19]. Экспрессию проводили в течение ночи индукцией изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (IPTG; Anatrace, США) в концентрации 1 мМ. Очистку белков проводили при помощи набора Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, США).

Постановка *in vitro* киназной реакции

Ингибирующая активность соединений в отношении PknA и AphVIII проверялась в киназной реакции при помощи набора Kinase-Glo Plus Luminescent Kinase Assay Kit (Promega, США) на рабочей станции Biomek 3000 (Beckman Coulter, США) по методике, описанной Ваки и соавт. [20]. Фосфорилирование субстрата оценивали косвенно — по уровню люминисценции остаточной АТФ. В качестве субстрата

PknA использовали олигопептид IVDAELTGEIPII, в качестве субстрата AphVIII — канамицин. Реакцию проводили в рабочем растворе: 15 мМ HEPES (pH 7,4), 20 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 0,5 мМ EDTA, 0,02 % Tween-20, 0,1 мг/мл BSA.

Количественный состав реакционной смеси (45 мкл) в киназной реакции с PknA: белок — 3 мкг, АТФ — 5 мкМ, субстрат — 50 мкг.

Количественный состав реакционной смеси (45 мкл) в киназной реакции с APHVIII: белок — 50 нг, АТФ — 10 мкМ, субстрат — 5 мкг.

Анализ цитотоксичности соединений

Анализ цитотоксичности проводили при помощи МТТ-теста на фибробластах эмбриона человека (кожно-мышечная ткань; ФЭЧ-4). О жизнеспособности клеток судили по изменению цвета, происходящему при восстановлении тетразола в формазан дегидрогеназами митохондрий. Окраску регистрировали на ридере Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter США) при длине волны возбуждения 595 нм. Оптическую плотность в лунках, где клетки инкубировались только со средой (контроль), принимали за 100 % [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор активных ингибиторов СТПК в тест-системе *M. smegmatis* aphVIII+

В ранее валидированной тест-системе *M. smegmatis* aphVIII+ дисковым методом был проведен первичный отбор ингибиторов СТПК из числа 192 соединений класса аминопиридинов и аминопиримидинов.

Тест-система функционирует следующим образом: СТПК MSMEG_5513 фосфорилирует белок APHVIII в клетках *M. smegmatis*, повышая устойчивость клеток к канамицину; при добавлении активного ингибитора СТПК, действующего на MSMEG_5513, прекращается фосфорилирование APHVIII, снижается его активность и, как следствие, устойчивость бактериальных клеток к канамицину. Собственная антимикобактериальная активность ингибитора обуславливается ингибированием им же СТПК MSMEG_0030 (ортолог PknA *M. tuberculosis*) — жизненно важного белка для микобактерий, а также, возможно, других биомшеней. В опыте эффект снижения уровня устойчивости к канамицину выражался в увеличении зоны ингибирования роста вокруг диска, содержавшего комбинацию канамицина и активного ингибитора СТПК, относительно диска, содержавшего только канамицин (рис. 1) [16].

Одним из критериев отбора соединений в тест-системе *M. smegmatis* aphVIII+ является величина их субингибирующей концентрации. Для 53 соединений этот показатель составил до 100 нмоль/диск, в то время как остальные соединения в такой концентрации не проявили антибактериального действия в отношении *M. smegmatis*. Отобранные соединения были протестированы с помощью тест-системы, при этом ингибитор СТПК LCTA-1389 (11b) [22, 23] взяли в качестве положительного контроля, а неактивный аналог стандартных ингибиторов СТПК класса индоллмалеимидов BisV [24] — в качестве отрицательного.

Достоверное увеличение зоны ингибирования роста бактериальной культуры на твердой питательной среде при совместном действии с канамицином (при сравнении с зоной, образуемой только лишь под действием кана-

мицина) показали 22 соединения, которые исследовали в дальнейшем в качестве ингибиторов микобактериальных СТПК и потенциальных «хит»-соединений (рис. 2): 1f8, 1g8, 1e11, 1g11, 1h11, 1a12, 1c8, 2f4, 2c3, 2c6, 2a3, 2a4, 2a7, 2h11, 2h12, 2d3, 2d11, 2b4, 2b5, 2e12, 2g12, 2h12.

Исследование *in vitro* ингибирующей активности отобранных соединений в отношении белка PknA *M. tuberculosis*

Перечисленные выше соединения тестировали на способность ингибировать СТПК PknA *M. tuberculosis in vitro* в концентрации 200 мкМ (молярное соотношение ингибитор : мишень — 154 : 1). В качестве положительного контроля также использовали LCTA-1389 (11b) и BisV соответственно. Результаты измерения степени ингибирования киназной реакции представлены на рис. 3. Все соединения проявили ингибирующую активность на уровне положительного контроля или выше, как в случае с двумя соединениями: 1H11 (26,9 ± 6,1 %) и 2G12 (23,2 ± 2,0 %).

Все отобранные соединения также были проверены в том же молярном соотношении (ингибитор : мишень) на способность ингибировать фосфотрансферазную активность APHVIII *in vitro* — для исключения их неспецифического действия в тест-системе *M. smegmatis* aphVIII+. Ни одно соединение не проявило такой активности, т. е. их активность в клеточной тест-системе была обусловлена ингибированием именно СТПК *M. smegmatis*, а не белка APHVIII.

Исследование цитотоксичности отобранных соединений

Отобранные соединения были проверены на цитотоксичность на клетках ФЭЧ-4 и по результатам разделены на три группы: сильно токсичные (< 10 мкг/мл; 1F8, 1G11, 2D11, 2F4, 2C3, 2A3, 2H11); среднетоксичные (10–50 мкг/мл; 1E11, 1G8, 1H11, 2D3, 2E12, 2G12, 2A4, 2A7); слабо-токсичные (> 50 мкг/мл; 2C6).

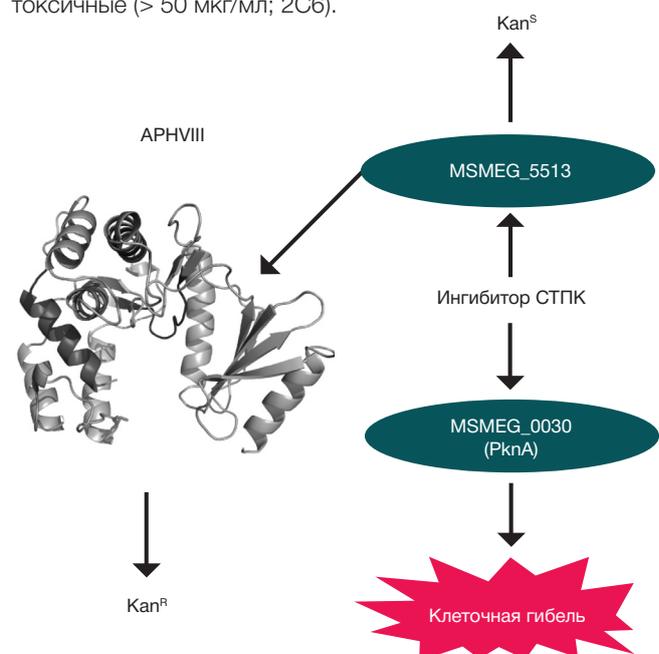


Рис. 1. Схема функционирования тест-системы *Mycobacterium smegmatis* aphVIII+

Kan^R — повышение устойчивости к канамицину, Kan^S — понижение устойчивости к канамицину, СТПК — серин-треониновая протеинкиназа. Подробнее — в тексте статьи.

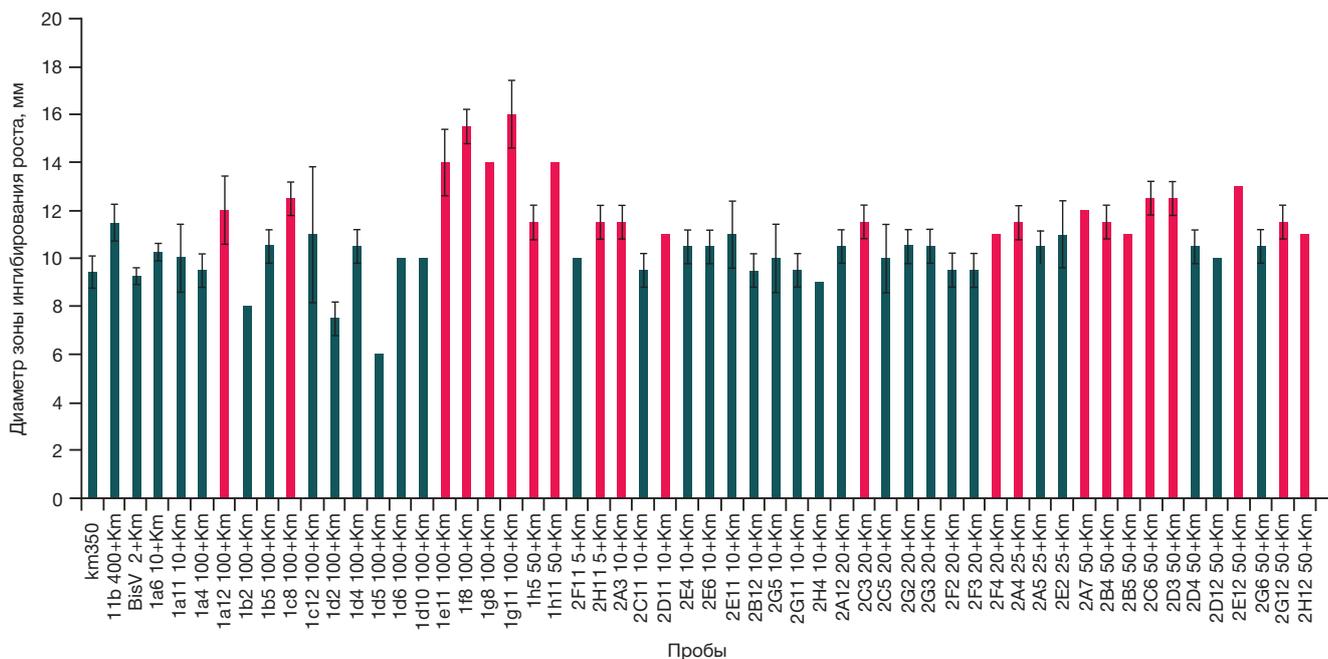


Рис. 2. Результаты измерения зон ингибирования роста бактериальной культуры соединениями классов аминопиридинов и аминопиримидинов в тест-системе *Mycobacterium smegmatis aphVIII+*

Соединения тестировали в субингибирующих концентрациях (нмоль/диск; указаны в названиях проб), не приводящих к появлению зоны ингибирования роста бактериальной культуры. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение. Красным цветом выделены отобранные соединения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В эпоху развития и распространения лекарственной устойчивости среди штаммов *M. tuberculosis* разрабатываемые противотуберкулезные препараты должны обладать двумя основными характеристиками: принципиально новым механизмом действия и низкой токсичностью для человека.

Концепция разработки антибактериальных препаратов (в том числе антимикобактериальных), применяемая в течение последних 15 лет, основана на биохимическом мишень-направленном отборе соединений, ингибирующих жизненно важные бактериальные ферменты. Эта концепция имела ограничения применительно к *M. tuberculosis* в связи с тем, что подавляющее большинство отобранных таким способом соединений не оказывало действия на бактериальную клетку в силу разных причин, например из-за непроницаемости бактериальной клеточной стенки для этих химических соединений [25]. Тогда исследователи вернулись к скринингу соединений на быстрорастущей *M. smegmatis*, поскольку ее клеточная стенка по проницаемости схожа с таковой у *M. tuberculosis*, и именно так был отобран бедаквилин [26]. Однако при таком подходе возникает необходимость дальнейшего уточнения биомишени, на которую действует отобранный препарат [27].

Тест-система *M. smegmatis aphVIII+* позволяет проводить отбор как по антимикобактериальному действию, так и по мишень-специфичности [16]. Последняя была подтверждена *in vitro* для отобранных в работе соединений, хотя невозможность определения концентрации полумаксимального ингибирования IC_{50} , вызванная, вероятно, пониженной активностью белка PknA, очищавшегося нами в виде фьюжн-белка с тиоредоксином, является относительным недостатком исследования. Большое количество белка в реакционной смеси делало необходимым анализ максимально растворимой концентрации тестируемых соединений. Однако сравнение ингибирующей активности отобранных соединений с положительным контролем [22, 23] и, в частности, превосходение его показателей

in vitro соединениями 1H11 и 2G12 наряду с ранее показанной ингибирующей активностью соединений классов аминопиридинов и аминопиримидинов в отношении СТПК [15], позволяет говорить о перспективе их использования в качестве эффективных ингибиторов СТПК.

В результате проведенного скрининга нами были отобраны для дальнейшей разработки в качестве потенциальных противотуберкулезных препаратов нового поколения, ингибиторов микобактериальных СТПК, три соединения, проявившие наибольшую активность в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*, на белке PknA *in vitro* и наименьшую токсичность на культуре клеток человека (рис. 4). Два

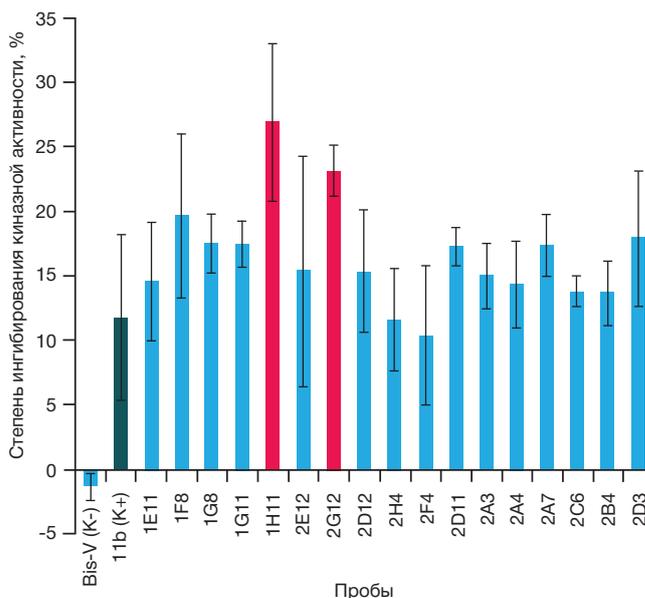


Рис. 3. Ингибирование фосфорилирующей активности PknA *Mycobacterium tuberculosis in vitro* соединениями, отобранными в тест-системе *Mycobacterium smegmatis aphVIII+*

Планки погрешностей отражают стандартное отклонение. Зеленым цветом выделен положительный контроль, красным — самые активные соединения.

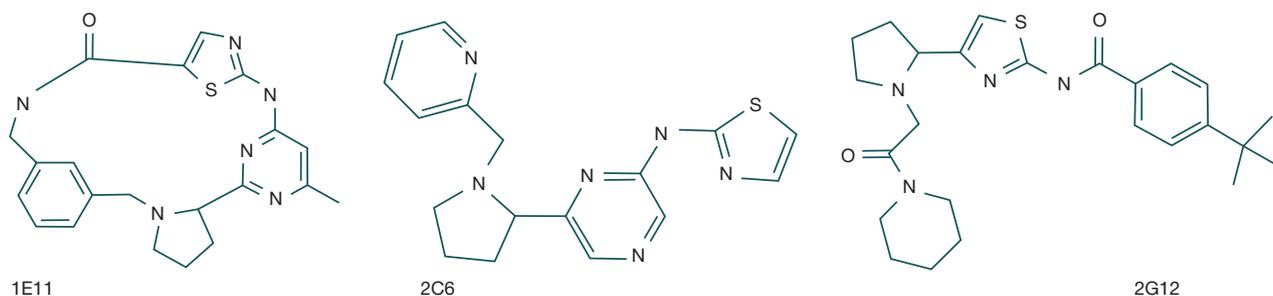


Рис. 4. Химические формулы соединений классов аминопиридинов и аминопиримидинов, отобранных в качестве потенциальных противотуберкулезных препаратов

соединения с наивысшей активностью (1E11 и 2G12) были отнесены к группе среднетоксичных, но в данной работе был проведен первичный скрининг, позволивший отобрать «хит»-соединения, а их дальнейшая лидерная оптимизация может быть направлена как на повышение их активности, так и на снижение токсичности: активность соединений должна быть проверена непосредственно на *M. tuberculosis*, должна быть оценена их острая и хроническая токсичность *in vivo*, а также они должны быть протестированы на панели СТПК человека во избежание их неспецифического действия.

Выводы

В работе показана принципиальная возможность разработки новых препаратов для борьбы с лекарственно устойчивыми формами туберкулеза на основе аминопиридинов и аминопиримидинов. Отобранные «хит»-соединения (1E11, 2C6, 2G12) требуют дальнейшей проверки на антимикобактериальную активность в отношении *M. tuberculosis* и лидерной оптимизации с фокусом на возможное повышение их активности и снижение токсичности.

Литература

- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva, Switzerland; 2016. p. 1–214.
- Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet*. 2010 May; 375 (9728): 1830–43.
- Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis Elsevier*; 2010 Sep; 10 (9): 621–9.
- Parida SK, Axelsson-Robertson R, Rao MV, Singh N, Master I, Lutckii A, et al. Totally drug-resistant tuberculosis and adjunct therapies. *J Intern Med*. 2015 Apr; 277 (4): 388–405.
- Klopper M, Warren RM, Hayes C, Gey van Pittius NC, Streicher EM, Müller B, et al. Emergence and Spread of Extensively and Totally Drug-Resistant Tuberculosis, South Africa. *Emerging Infect Dis*. 2013 Mar; 19 (3): 449–55.
- Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR. The totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB). *Int J Clin Exp Med*. 2013; 6 (4): 307–9.
- Прозоров А. А., Зайчикова М. В., Даниленко В. Н. Мутанты *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью: история появления, генетические и молекулярные механизмы устойчивости, возникающие проблемы. *Генетика*. 2012; 48 (1): 5–20.
- Vareldzis BP, Grosset J, de Kantor I, Crofton J, Laszlo A, Felten M, et al. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. *World Health Organization recommendations*. *Tuber. Lung Dis*. 1994 Feb; 75 (1): 1–7.
- Kakkar AK, Dahiya N. Bedaquiline for the treatment of resistant tuberculosis: promises and pitfalls. *Tuberculosis*. 2014 Jul; 94 (4): 357–62.
- Прозоров А. А., Федорова И. А., Беккер О. Б., Даниленко В. Н. Факторы вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*: генетический контроль, новые концепции. *Генетика*. 2014; 50 (8): 885–908.
- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, la Paz Santangelo de M, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013 Jan 1; 4 (1): 3–66.
- Danilenko VN, Osolodkin DI, Lakatos SA, Preobrazhenskaya MN, Shtil AA. Bacterial eukaryotic type serine-threonine protein kinases: from structural biology to targeted anti-infective drug design. *Curr Top Med Chem*. 2011; 11 (11): 1352–69.
- Cousin C, Derouiche A, Shi L, Pagot Y, Poncet S, Mijakovic I. Protein-serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation. *FEMS Microbiol Lett*. 2013 Sep; 346 (1): 11–9.
- Canova MJ, Molle V. Bacterial serine/threonine protein kinases in host-pathogen interactions. *J Biol Chem*. 2014 Apr 4; 289 (14): 9473–9.
- Seganish WM, Fischmann TO, Sherborne B, Matasi J, Lavey B, McElroy WT, et al. Discovery and Structure Enabled Synthesis of 2,6-Diaminopyrimidin-4-one IRAK4 Inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. 2015 Aug 13; 6 (8): 942–7.
- Bekker OB, Sokolov DN, Luzina OA, Komarova NI, Gatilov YV, Andreevskaya SN, et al. Synthesis and activity of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid derivatives containing 1,3-thiazole cycle against *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Chem Res*. 2015; 24: 2926.
- Маслов Д. А. Создание тест-системы для отбора ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ микобактерий [диссертация]. М.: Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, 2016.
- Sizova IA, Hegemann P, Furmann M, Danilenko VN. *Streptomyces rimosus* Aminoglycoside 3'-Phosphotransferase VIII: Comparisons with Aminoglycoside 3'-Phosphotransferases of Aminoglycoside-Producing Strains and with Eukaryotic Protein Kinases. *Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers; 2002; 36 (1): 18–25.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
- Baki A, Bielik A, Molnár L, Szendrei G, Keserü GM. A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 β inhibitors. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2007 Feb; 5 (1): 75–84.
- Lunagariya MV, Thakor KP, Waghela BN, Vaidya FU, Pathak C, Patel MN. Design, synthesis, MTT assay, DNA interaction studies of platinum(II) complexes. *J Biomol Struct Dyn*. 2017 Jan 4: 1–18.
- Симонов А. Ю., Лакатош С. А., Лузиков Ю. Н., Резникова М. И., Сусова О. Ю., Штиль А. А. и др. Синтез 4-замещенных 3-[3-(диалкиламинометил)индол-1-ил]малеинимидов и изучение их способности ингибировать протеинкиназу С- α , предотвращать развитие множественной лекарственной

- устойчивости опухолевых клеток и цитотоксичности. Известия Академии наук. Серия химическая. 2008; (9): 1977–85.
23. Bekker OB, Alekseeva MG, Osolodkin DI, Palyulin VA, Elizarov SM, Zefirov NS, et al. New Test System for Serine/Threonine Protein Kinase Inhibitors Screening: *E. coli* APHVIII/Pk25 design. *Acta Naturae. Park Media*; 2010 Jul; 2 (3): 110–21.
 24. Davis PD, Hill CH, Lawton G, Nixon JS, Wilkinson SE, Hurst SA, et al. Inhibitors of protein kinase C. 1. 2,3-Bisarylmaleimides. *J Med Chem*. 1992 Jan; 35 (1): 177–84.
 25. Coxon GD, Cooper CB, Gillespie SH, McHugh TD. Strategies and challenges involved in the discovery of new chemical entities during early-stage tuberculosis drug discovery. *J. Infect. Dis. Oxford University Press*; 2012 May 15;205 Suppl 2(suppl 2): S258–64.
 26. Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Göhlmann HWH, Neefs J-M, Winkler H, et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science. American Association for the Advancement of Science*; 2005 Jan 14; 307 (5707): 223–227.
 27. Cooper CB. Development of *Mycobacterium tuberculosis* Whole Cell Screening Hits as Potential Antituberculosis Agents. *J Med Chem*: 2013 Oct 24; 56 (20): 7755–7760.

References

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva, Switzerland; 2016. p. 1–214.
2. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet*. 2010 May; 375 (9728): 1830–43.
3. Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis. Elsevier*; 2010 Sep; 10 (9): 621–9.
4. Parida SK, Axelsson-Robertson R, Rao MV, Singh N, Master I, Lutckii A, et al. Totally drug-resistant tuberculosis and adjunct therapies. *J Intern Med*. 2015 Apr; 277 (4): 388–405.
5. Klopper M, Warren RM, Hayes C, Gey van Pittius NC, Streicher EM, Müller B, et al. Emergence and Spread of Extensively and Totally Drug-Resistant Tuberculosis, South Africa. *Emerging Infect. Dis*. 2013 Mar; 19 (3): 449–55.
6. Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR. The totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB). *Int J Clin Exp Med*. 2013; 6 (4): 307–9.
7. Prozorov AA, Zaichikova MV, Danilenko VN. [Mycobacterium tuberculosis mutants with multidrug resistance: History of origin, genetic and molecular mechanisms of resistance, and emerging challenges]. *Russ J Genet*. 2012 Jan 1; 48 (1): 1–14. Russian
8. Vareldzis BP, Grosset J, de Kantor I, Crofton J, Laszlo A, Felten M, et al. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations. *Tuber Lung Dis*. 1994 Feb; 75 (1): 1–7.
9. Kakkar AK, Dahiya N. Bedaquiline for the treatment of resistant tuberculosis: promises and pitfalls. *Tuberculosis*. 2014 Jul; 94 (4): 357–62.
10. Prozorov AA, Fedorova IA, Bekker OB, Danilenko VN. [The virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*: Genetic control, new conceptions]. *Russ J Genet*. 2014 Aug 1; 50 (8): 775–97.
11. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, la Paz Santangelo de M, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013 Jan 1; 4 (1): 3–66.
12. Danilenko VN, Osolodkin DI, Lakatos SA, Preobrazhenskaya MN, Shtil' AA. Bacterial eukaryotic type serine-threonine protein kinases: from structural biology to targeted anti-infective drug design. *Curr Top Med Chem*. 2011; 11 (11): 1352–69.
13. Cousin C, Derouiche A, Shi L, Pagot Y, Poncet S, Mijakovic I. Protein-serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation. *FEMS Microbiol. Lett*. 2013 Sep; 346 (1): 11–9.
14. Canova MJ, Molle V. Bacterial serine/threonine protein kinases in host-pathogen interactions. *J. Biol. Chem*. 2014 Apr 4; 289 (14): 9473–9.
15. Seganish WM, Fischmann TO, Sherborne B, Matasi J, Lavey B, McElroy WT, et al. Discovery and Structure Enabled Synthesis of 2,6-Diaminopyrimidin-4-one IRAK4 Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett*. 2015 Aug 13; 6 (8): 942–7.
16. Bekker OB, Sokolov DN, Luzina OA, Komarova NI, Gatilov YV, Andreevskaya SN, et al. Synthesis and activity of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid derivatives containing 1,3-thiazole cycle against *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Chem Res*. 2015; 24: 2926.
17. Maslov DA. Sozdanie test-sistemy dlya otbora ingibitorov serin-treoninovykh proteinkinaz mikobakteriy [dissertation]. Moscow: Vavilov Institute of General Genetics of RAS, 2016. Russian.
18. Sizova IA, Hegemann P, Furmann M, Danilenko VN. *Streptomyces rimosus* Aminoglycoside 3"-Phosphotransferase VIII: Comparisons with Aminoglycoside 3"-Phosphotransferases of Aminoglycoside-Producing Strains and with Eukaryotic Protein Kinases. *Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers*; 2002; 36 (1): 18–25.
19. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
20. Baki A, Bielik A, Molnár L, Szendrei G, Keserü GM. A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 β inhibitors. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2007 Feb; 5 (1): 75–84.
21. Lunagariya MV, Thakor KP, Waghela BN, Vaidya FU, Pathak C, Patel MN. Design, synthesis, MTT assay, DNA interaction studies of platinum(II) complexes. *J. Biomol. Struct. Dyn*. 2017 Jan 4: 1–18.
22. Simonov AY, Lakatos SA, Luzikov YuN, Reznikova MI, Susova OYu, Shtil' AA, i dr. Sintez 4-zameshchennykh 3-[3-(dialkylaminometil)indol-1-il]maleinimidov i izuchenie ikh sposobnosti ingibirovat' proteinkinazu C- α , predotvrashchat' razvitiye mnozhestvennoy lekarstvennoy ustoychivosti opukholevykh kletok i tsitotoksichnosti. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya*. 2008; (9): 1977–85. Russian
23. Bekker OB, Alekseeva MG, Osolodkin DI, Palyulin VA, Elizarov SM, Zefirov NS, et al. New Test System for Serine/Threonine Protein Kinase Inhibitors Screening: *E. coli* APHVIII/Pk25 design. *Acta Naturae. Park Media*; 2010 Jul; 2 (3): 110–21.
24. Davis PD, Hill CH, Lawton G, Nixon JS, Wilkinson SE, Hurst SA, et al. Inhibitors of protein kinase C. 1. 2,3-Bisarylmaleimides. *J Med Chem*. 1992 Jan; 35 (1): 177–84.
25. Coxon GD, Cooper CB, Gillespie SH, McHugh TD. Strategies and challenges involved in the discovery of new chemical entities during early-stage tuberculosis drug discovery. *J. Infect. Dis. Oxford University Press*; 2012 May 15;205 Suppl 2(suppl 2): S258–64.
26. Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Göhlmann HWH, Neefs J-M, Winkler H, et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*; 2005 Jan; 307 (5707): 223–227.
27. Cooper CB. Development of *Mycobacterium tuberculosis* Whole Cell Screening Hits as Potential Antituberculosis Agents. *J Med Chem*: 2013 Oct 24; 56 (20): 7755–7760.