

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293116** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки
2023.09.27(51) Int. Cl. *C07D 295/192* (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2022.10.03(54) **3-[4-(2-ФТОРБЕНЗОИЛ)ПИПЕРАЗИН-1-КАРБОНИЛ]-N-[3-(ТРИФТОРМЕТИЛ)ФЕНИЛ]БЕНЗАМИД, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(96) 2022/ЕА/0054 (ВУ) 2022.10.03

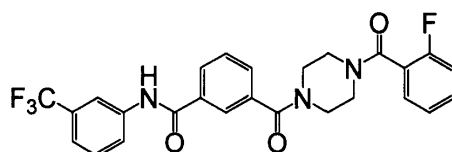
(72) Изобретатель:

(71) Заявитель:
**ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "ИНСТИТУТ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ
НАУК БЕЛАРУСИ" (ВУ)****Сечко Ольга Григорьевна,
Калиниченко Елена Николаевна,
Божок Татьяна Станиславовна,
Голякович Анна Вячеславовна,
Царенков Валерий Минович, Голяк
Надежда Степановна (ВУ)**

(74) Представитель:

**Королева С.В., Вашук Т.В.,
Емельянова В.А. (ВУ)**

(57) Изобретение относится к области медицины и фармации, в частности к новому биологически активному синтетическому соединению - 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамиду, обладающему противотуберкулезной активностью, которое может найти применение в качестве противотуберкулезного средства для лечения заболеваний, возбудителями которых являются микобактерии: туберкулез человека и крупного рогатого скота, проказа, микобактериозы. Описан способ получения 4-амино-1-(2-дезоксид-2-фтор-β-D-арабинофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-она, заключающийся в том, что изофталойл дихлорид, полученный из изофталевой кислоты, последовательно конденсируют с 3-(трифторметил)анилином и 1-(2-фторбензоил)пиперазином и выделяют целевой продукт методом кристаллизации. Заявляемый способ позволяет получать целевой продукт 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид формулы I с суммарным выходом 55-60% и хроматографической чистотой более 99%. Установлено, что 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид в концентрации 100 мкг/мл полностью подавляет рост лабораторного референс-штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и клинического штамма *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью, в концентрации 200 мкг/мл полностью подавляет рост штамма *Mycobacterium terrae*. 3-[4-(2-Фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид является практически нетоксичным соединением, относится к 5-му классу токсичности по модифицированной классификации Организации экономического содействия и развития (OECD) и согласно гармонизированной системе классификации опасности и маркировки химической продукции (GHS) относится к 5-му классу токсичности, т.е. обладает относительно низкой острой токсичностью.



A1

202293116

202293116

A1

3-[4-(2-ФТОРБЕНЗОИЛ)ПИПЕРАЗИН-1-КАРБОНИЛ]-N-[3-(ТРИФТОРМЕТИЛ)ФЕНИЛ]БЕНЗАМИД, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

C07D 237/00

C07D 239/00

C07D 241/00

Изобретение относится к области медицины и фармации, в частности к новому биологически активному синтетическому соединению – 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамиду, обладающему противотуберкулезной активностью, которое может найти применение в качестве активной субстанции противотуберкулезного средства для лечения заболеваний, возбудителями которых являются микобактерии: туберкулез человека и крупного рогатого скота, проказа, микобактериозы [1].

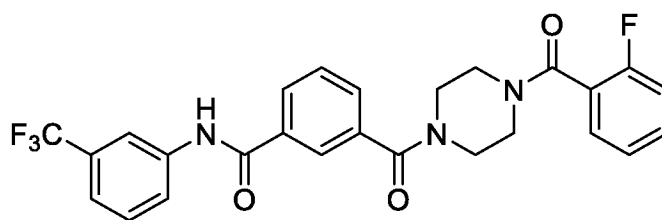
Аналогами заявляемого соединения по назначению и профилю биологического действия являются противотуберкулезные препараты – изониазид, рифампицин, пипразинамид и этамбутол [2]. Противотуберкулезные препараты I ряда – изониазид, рифампицин, пипразинаид и этамбутол имеют ряд недостатков – микобактерии активно формируют к ним резистентность путем изменения уровня экспрессии собственных генов, поэтому с каждым годом их эффективность снижается, а количество лекарственно-устойчивых форм туберкулезной инфекции увеличивается. Генетическая основа резистентности микобактерий – наличие внехромосомных факторов устойчивости к лекарственным веществам – плазмид и транспозонов. Кроме того, противотуберкулезные препараты имеют ряд побочных действий, развитие которых зависит от препарата, формы его применения, дозы, длительности лечения и сочетания с другими лекарственными средствами. Нередко у пациентов на фоне лечения туберкулеза возникают нарушения функции органов дыхания, желудочно-кишечного тракта, печени, почек, центральной и периферической нервной системы, иммунной системы, сердечно-сосудистой системы, системы кроветворения. Диспепсические расстройства в виде метеоризма, тошноты, рвоты, ухудшения аппетита и т.д. отмечаются у 23,5-44,9% пациентов. При этом у 81,2% пациентов с туберкулезом на фоне лечения возникают те либо иные нарушения кишечной абсорбции, у 97,2% пациентов после 2-3-месячной химиотерапии выявлены стойкие патологические сдвиги в микроэкологии кишечника, вплоть до глубокого дисбактериоза. Гепатотоксические реакции, сопровождавшиеся отклонениями от нормы биохимических показателей крови, а нередко и клиническими проявлениями лекарственного гепатита, по данным ряда авторов, наблюдались у 14,7-23,9% пациентов. Нарушение функции почек в процессе химиотерапии туберкулеза связано с повышением проницаемости клубочкового фильтра при одновременном снижении клубочковой фильтрации и изменении концентрационной и азотовыделительной функции. Нефротоксические реакции, возникшие на фоне химиотерапии туберкулеза, развивались у 7,2-21,1% пациентов. Нейротоксические побочные

реакции проявляются симптомами поражения центральной и периферической нервной системы. Изменения в ЦНС часто возникают на ранних этапах химиотерапии и проявляются головной болью, головокружениями, расстройствами сна, эпилептоподобными припадками, депрессивным синдромом и т.д. При проведении химиотерапии реакции такого рода встречаются у 5,9-15,2% пациентов. Противотуберкулезные антибиотики (стрептомицин, канамицин, амикацин, капреомицин) оказывают токсическое влияние на VIII пару черепно-мозговых нервов, обуславливая нарушения слуха и вестибулярные расстройства. В процессе химиотерапии ототоксические реакции возникают у 3,1-12,9% пациентов. Нарушения периферической нервной системы в виде полиневритов, полинейропатий и связанные с ними парестезии конечностей, атаксии, мышечная слабость и т.д., выявлялись у 1,2-12,9% заболевших. Часть пациентов (1,5-8,3%) отмечали появление артропатий в процессе химиотерапии [3].

Задачей заявляемой группы изобретений является новое соединение из ряда синтетических производных бензамида, обладающего высокой противотуберкулезной активностью и низкой общей токсичностью, способ его получения и его применение в качестве антимикробного агента.

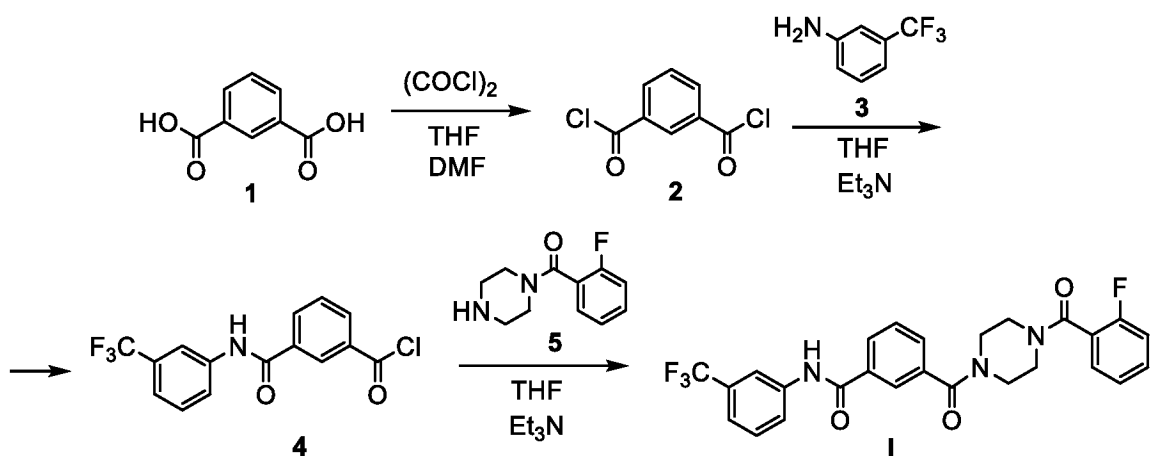
Поставленная задача решается новым химическим соединением - 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамидом, который обладает высокой противотуберкулезной активностью и может быть использован для разработки нового оригинального противотуберкулезного лекарственного средства или фармацевтической композиции, включающей заявляемое соединение.

В соответствии с изобретением описывается 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид структурной формулы I:



обладающий противотуберкулезной активностью.

Также поставленная задача решается еще одним объектом заявляемой группы изобретений, а именно способом получения 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида, заключающимся в том, что изофталевую кислоту **1** обрабатывают оксалилхлоридом в тетрагидрофуране в присутствии диметилформаида, полученный изофталойл дихлорид **2** последовательно конденсируют с 3-(трифторметил)анилином **3** и 1-(2-фторбензоил)пиперазином **4** в тетрагидрофуране с добавлением эквимолярного количества триэтиламина и выделяют целевой продукт методом кристаллизации. Реакция протекает по следующей схеме.



Заявляемый способ позволяет получать целевой продукт 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид формулы I с суммарным выходом 55-60% и хроматографической чистотой $\geq 98\%$. Исходные вещества являются коммерчески доступными реагентами. Препаратор 1-(2-фторбензоил)пиперазин 5 получают из 2-фторбензойной кислоты и Вос-пиперазина.

Еще одним объектом заявляемой группы изобретений является применение 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида в качестве антимикробного агента, обладающего противотуберкулезной активностью. В соответствии с указанным применением 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид может быть использован для получения фармацевтической композиции, обладающей противотуберкулезной активностью и для создания на ее основе противотуберкулезного лекарственного препарата.

Противотуберкулезная активность заявляемого соединения оценивалась на:

- непатогенном штамме *Mycobacterium terrae* 15755, который рекомендован для использования в качестве модельного для определения противотуберкулезной активности;
- лекарственно-чувствительном штамме *Mycobacterium tuberculosis* – лабораторном референс-штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv;
- клиническом штамме *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью к следующим противотуберкулезным лекарственным препаратам – изониазид, рифампицин, этамбутол, пипразинамид, амикацин, этионамид, моксифлоксацин, левофлоксацин и чувствительностью к линезолиду, клоfazимину, бедаквилину и деламаниду.

Острую токсичность заявляемого соединения I оценивали при однократном внутрижелудочном введении в дозе 100 мг/кг, 500 мг/кг и 2000 мг/кг клинически здоровым половозрелым мышам линии СВА обоего пола и клинически здоровым крысам линии Вистар обоего пола.

Возможность осуществления заявляемой группы изобретений подтверждается нижеприведенными примерами конкретного выполнения.

Пример 1.

Получение 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида (I).

К суспензии изофталевой кислоты **1** (6,36 г) в тетрагидрофуране (165 мл) добавляли диметилформамид (0,28 мл), затем смесь охлаждали на водно-ледяной бане и добавляли оксалилхлорид (6,87 мл, 2,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 2,5-3 часов при комнатной температуре. За протеканием реакции следили методом тонкослойной хроматографии. По завершении реакции растворитель упаривали в вакууме досуха, остаток соупаривали с хлороформом (3×30 мл). Полученный изофталойл дихлорид **2** вводили в следующую стадию конденсации.

К охлажденному на водно-ледяной бане до 0°C раствору 3-(трифторметил)анилина **3** (4,31 мл, 0,9 экв.) в тетрагидрофуране (200 мл) добавляли эквимолярное количество триэтиламина (4,79 мл), затем полученную смесь по каплям в атмосфере аргона добавляли к раствору хлорангидрида изофталевой кислоты **2** в тетрагидрофуране (11 мл). Протекание реакции контролировали методом тонкослойной хроматографии. После полного исчезновения исходного амина в реакционную смесь добавляют раствор 1-(2-фторбензоил)пиперазина **5** (7,17 г) в тетрагидрофуране (100 мл) с эквимолярным количеством триэтиламина (4,79 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа до исчезновения по тонкослойной хроматографии азотсодержащего гетероциклического соединения **5**. По завершении реакции к смеси добавляли двукратный объем воды, тетрагидрофуран упаривали при пониженном давлении. Водную фазу экстрагировали хлороформом (3×250 мл). Объединенные органические фракции сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме досуха. Остаток хроматографировали на силикагеле, используя для элюции этилацетат. Фракции, содержащие продукт реакции **I**, объединяли, упаривали в вакууме досуха и остаток кристаллизовали из диэтилового эфира. Выход 57%, белый аморфный порошок, $T_{пл} = 133-139^{\circ}\text{C}$. УФ-спектр (EtOH), λ_{max} , нм: 256. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6) δ , м.д.: 10,63 с (1H, HN), 8,24 с (1H), 8,03-8,07 м (3H), 7,59-7,67 м (3H), 7,44-7,52 м (3H), 7,30 уш.с. (2H), 3,65-3,76 м (4H), 3,28-3,46 м (4H). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ , м.д., J, Гц: 168,5, 165,1, 164,2, 157,5 д (J = 245,6), 139,7, 135,7, 134,5, 131,5 д (J = 7,6), 130,21, 129,8, 129,3 д (J = 31), 128,9, 128,8, 128,7, 126,2, 124,3, 124,1 д (J = 272,3), 123,8, 123,5, 120,0, 116,4, 115,7 д (J = 21). Масс-спектр, (MH⁺): 500,1.

Пример 2.

Определение противотуберкулезной активности с помощью метода разведений в плотной питательной среде в чашках Петри на штамме *Mycobacterium terrae* 15755.

Определение противотуберкулезной активности 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида проводили на штамме *Mycobacterium terrae* 15755. Данный штамм является непатогенным и рекомендован для использования в качестве модельного для определения противотуберкулезной активности [4]. Использовали метод разведений в плотной питательной среде в чашках Петри. Для оценки противотуберкулезной активности использовали визуальную оценку роста *Mycobacterium terrae* в плотной

питательной среде в чашках Петри. Исходный раствор изучаемого соединения готовили в диметилсульфоксиде (ДМСО), который затем добавляли в питательную среду Миддлбрука 7Н9 с глицерином (Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol). Для получения требуемых концентраций изучаемого соединения для исследования – 200, 150 и 100 мкг/мл нужно было смешивать исходный раствор изучаемого соединения с питательной средой в разных соотношениях. Для получения концентрации изучаемого соединения 200 мкг/мл исходный раствор изучаемого соединения в ДМСО объемом 2 мл с концентрацией 2000 мкг/мл смешивали с питательной средой Миддлбрука 7Н9 с глицерином объемом 18 мл, то есть в объемном соотношении 1:9. Для получения концентрации изучаемого соединения 150 мкг/мл исходный раствор изучаемого соединения в ДМСО объемом 2 мл с концентрацией 1500 мкг/мл смешивали с питательной средой Миддлбрука 7Н9 с глицерином объемом 18 мл, то есть в объемном соотношении 1:9. Для получения концентрации изучаемого соединения 100 мкг/мл исходный раствор изучаемого соединения в ДМСО объемом 1 мл с концентрацией 2000 мкг/мл смешивали с питательной средой Миддлбрука 7Н9 с глицерином объемом 19 мл, то есть в объемном соотношении 1:19. Затем культуру микобактерий высевали во все анализируемые растворы. Кроме того, выполняли два контрольных опыта. Первый контрольный опыт выполняли для контроля влияния растворителя – для этого использовали ДМСО в таком же количестве, как и в образцах с максимальной концентрацией анализируемого вещества (200 мкг/мл) – объемом 2 мл, который добавляли в питательную среду Миддлбрука 7Н9 с глицерином объемом 18 мл, затем культуру микобактерий высевали в анализируемый раствор. Второй контрольный опыт выполнялся для контроля роста культуры, поэтому не содержал никаких добавок. Культуру микобактерий высевали в питательную среду Миддлбрука 7Н9 с глицерином объемом 20 мл. Все образцы выдерживали в термостате при 37 °С в течение трех недель. Для оценки противотуберкулезной активности определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) (мкг/мл), которая соответствует такой концентрации анализируемого вещества, при которой роста микобактерий в чашке Петри не наблюдалось. В параллельных экспериментах в качестве эталонов использовали рифампицин, изониазид и этамбутол, которые обладают противотуберкулезным действием и используются для лечения туберкулеза. Эксперимент был выполнен в девяти повторностях для концентрации 200 мкг/мл, в трех повторностях для концентрации 150 мкг/мл и в девяти повторностях для концентрации 100 мкг/мл.

В результате была определена минимальная ингибирующая концентрация (МИК), в которой 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид полностью подавляет рост микобактерий во всех девяти экспериментах – 200 мкг/мл. Рифампицин, который используется в настоящее время для лечения туберкулеза и является препаратом первого ряда, в нашем эксперименте в концентрации 200 мкг/мл полностью подавляет рост микобактерий. Изониазид, который используется в настоящее время для лечения туберкулеза и является препаратом первого ряда, в нашем эксперименте в концентрации 50 мкг/мл полностью подавляет рост микобактерий и этамбутол, который используется в настоящее время для лечения туберкулеза и является препаратом первого

ряда, в нашем эксперименте в концентрации 25 мкг/мл полностью подавляет рост микобактерий [5].

Пример 3.

Определение противотуберкулезной активности с помощью модифицированного метода пропорций в жидкой питательной среде Миддлбрук 7H9 с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960 на лекарственно-чувствительном штамме *Mycobacterium tuberculosis* – лабораторном референс-штамме *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv NCTC 7416 (ATCC 9360) и на клиническом штамме *Mycobacterium tuberculosis* NRLB-21 с множественной лекарственной устойчивостью к следующим противотуберкулезным лекарственным препаратам – изониазид, рифампицин, этамбутол, пипразинамид, амикацин, этионамид, моксифлоксацин, левофлоксацин и чувствительностью к линезолиду, клофазимину, бедаквилину и деламамиду

Определение чувствительности микобактерий к исследуемому соединению выполняли с помощью модифицированного метода пропорций в жидкой питательной среде Миддлбрук 7H9 с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson, USA). Принцип работы автоматизированной системы заключается в сравнении скорости роста микобактерий в контрольной пробирке и в пробирке с исследуемым соединением. Основным компонентом автоматизированной системы является пробирка MGIT (*Mycobacterial Growth Indicator Tube* – Пробирка-индикатор роста микобактерий) с флюоресцентным индикатором роста – бескислородным флюорохромом – трис-4,7-дифенил-1,10-фенантролин пентагидратом хлорида рутения, который находится под силиконом на дне пробирки и ингибируется высокими концентрациями кислорода, растворенного в среде. Во время роста микобактерии активно поглощают свободный кислород внутри пробирки, выделяя углекислый газ. По мере расходования свободного кислорода прекращается ингибирование флюорохрома. То есть рост микобактерий вызывает усиление флюоресценции. Флюоресценция становится видимой при облучении пробирки ультрафиолетовым светом и автоматически регистрируется фотодатчиками, встроенными в прибор ВАСТЕС™ MGIT™ 960. Интенсивность свечения прямо пропорциональна уровню расходования кислорода и регистрируется в единицах роста (GU - growth units). Значение GU = 400 является максимальным и означает активный рост микобактерий, такое значение фиксируется прибором в контрольной пробирке, в которую засевают 10^5 - 10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ) микобактерий на 1 мл среды и не добавляют противотуберкулезное соединение. Соответственно, значение GU = 0 является минимальным, означает отсутствие роста микобактерий и свидетельствует о том, что исследуемое противотуберкулезное соединение полностью подавляет рост микобактерий. Пробирки MGIT инкубируются при температуре 37°C. Степень флюоресценции каждой пробирки регистрируется прибором автоматически каждые 60 минут. В системе используется обогащенная жидкая питательная среда Миддлбрук 7H9.

Отбор и подготовка лабораторных штаммов микобактерий туберкулеза для проведения исследования.

Из лабораторной коллекции государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии» для проведения исследования было отобрано 2 штамма:

- штамм лекарственно-чувствительных *Mycobacterium tuberculosis* (ЛЧ-МБТ) – лабораторный референс-штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv NCTC 7416 (ATCC 9360);
- клинический штамм *Mycobacterium tuberculosis* NRLB-21 с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-МБТ) к противотуберкулезным лекарственным препаратам (ПТЛП) – изониазид, рифампицин, этамбутол, пипразинамид, амикацин, этионамид, моксифлоксацин, левофлоксацин и чувствительностью к линезолиду, клофазимину, бедаквилину и деламамиду. Клинический штамм был выделен в 2021 году из мокроты впервые выявленных больных до начала проведения ими противотуберкулезной терапии.

Приготовление и посев суспензии исследуемых штаммов микобактерий из плотной среды.

Добавляли 4 мл бульона Миддлбрука 7Н9 в стерильную пробирку 16,5 × 128 мм с крышкой. Пробирка содержала 8-10 стеклянных шариков. Затем собирали стерильной петлей как можно больше колоний с продолжительностью роста на плотной питательной среде 7 дней с момента появления видимого роста, стараясь не собирать плотную среду. Растворяли колонии в бульоне Миддлбрука 7Н9. Проводили контроль мутности суспензии – параметр «мутность» был в норме, выше 1,0 по стандарту Макфарланда. Затем встряхивали суспензию в плотно закрытой пробирке на устройстве «Вортекс» в течение 3 минут, чтобы разрушить крупные хлопья бактериальной массы, после чего суспензия отстаивалась в течение 20 минут. Надосадочную жидкость сливали в другую стерильную пробирку 16,5 × 128 мм с крышкой (не переливая осадок) и давали ей отстояться еще 15 минут. Однородную надосадочную жидкость, без хлопьев опять слили в третью стерильную пробирку 16,5 × 128 мм. Установили мутность суспензии, она оказалась равной 0,5 по стандарту Макфарланда (1,5 × 10⁸ КОЕ/мл) путем визуального сравнения со стандартом мутности Макфарланда 0,5. Оптическую плотность контролировали с помощью нефелометра. Затем разбавили 1 мл суспензии с мутностью 0,5 по стандарту Макфарланда 4 мл стерильного физиологического раствора (разбавление 1:5).

Следующей стадией был посев микобактерий в жидкую питательную среду для тестирования чувствительности микобактерий к изучаемым нами соединениям в автоматизированной системе ВАСТЕС™ MGIT™ 960 для автоматической детекции роста микобактерий [6]. В пробирку MGIT с 7,0 мл питательной жидкой среды Миддлбрук 7Н9, соблюдая правила асептики, добавляли 0,8 мл обогатительной ростовой добавки ВАСТЕС MGIT OADC (олеиновая кислота, альбумин, декстроза и каталаза) и вносили 0,5 мл суспензии микобактерий, с целью получить равную величину колониеобразующих единиц возбудителя в одном миллилитре среды (КОЕ/мл, приблизительно 10⁵-10⁶). Таким образом,

общий объем засеянной среды составлял 8,3 мл. Затем в пробирку вносили 0,1 мл раствора исследуемого соединения. Каждую пробирку плотно закрывали крышкой и тщательно перемешивали смесь.

Приготовление растворов исследуемых соединений.

Для исследования концентрации 200 мкг/мл:

Исследуемое соединение растворяли в ДМСО в концентрации 16,8 мг/мл (исходный раствор), стерилизовали пропусканием через 0,22 мкм фильтр Миллипор. Требуемую конечную концентрацию (200 мкг/мл) получали при добавлении 0,1 мл исходного раствора в пробирку MGIT со средой, добавкой и суспензией микроорганизмов (конечный объем был равен 8,4 мл).

Для исследования концентрации 100 мкг/мл:

Исследуемое соединение растворяли в ДМСО в концентрации 8,4 мг/мл (исходный раствор), стерилизовали пропусканием через 0,22 мкм фильтр Millipore. Требуемую конечную концентрацию (100 мкг/мл) получали при добавлении 0,1 мл исходного раствора в пробирку MGIT со средой, добавкой и суспензией микроорганизмов (конечный объем был равен 8,4 мл).

Каждую концентрацию и отдельно растворитель (ДМСО) исследовали в триплетах.

Эксперимент считается завершенным, когда единица роста (GU) в контрольной пробирке достигает своего максимального значения 400 (в течение 4-13 дней). Когда в автоматизированной системе ВАСТЕС™ MGIT™ 960 зафиксировано максимальное значение единицы роста, равное 400 в контрольной пробирке, системой автоматически фиксируются показатели единицы роста в пробирках с исследуемыми соединениями.

Изобретение поясняется рисунками:

рисунок 1 – противотуберкулезная активность 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида в концентрациях 100 мкг/мл и 200 мкг/мл и растворителя ДМСО в чистом виде в отношении лабораторного референс-штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv;

рисунок 2 – противотуберкулезная активность 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида в концентрациях 100 мкг/мл и 200 мкг/мл и растворителя ДМСО в чистом виде в отношении клинического штамма *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью.

В каждой из трех пробирок MGIT, в которые добавляли ДМСО, прибором был зафиксирован показатель единиц роста $GU = 400$, что означает рост микобактерий в присутствии ДМСО и свидетельствует о том, что растворитель не подавляет рост лабораторного референс-штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Система ВАСТЕС™ MGIT™ 960 зафиксировала результаты в первой и во второй пробирке через 9 суток 21 час, а в третьей пробирке – через 9 суток 23 часа (рисунок 1).

В каждой из трех пробирок MGIT, в которые добавляли ДМСО, прибором был зафиксирован показатель единиц роста $GU = 400$, что означает рост микобактерий в присутствии ДМСО и свидетельствует о том, что растворитель не подавляет рост

клинического штамма *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью. Система ВАСТЕС™ MGIT™ 960 зафиксировала результаты в первой пробирке через 9 суток 10 часов, во второй пробирке – через 9 суток 13 часов, в третьей пробирке – через 9 суток 14 часов (рисунок 2).

Согласно проведенным исследованиям 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид в концентрации 100 мкг/мл полностью подавляет рост лабораторного референс-штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и клинического штамма *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью. При этом во всех экспериментах контроль и растворитель (ДМСО) демонстрировали максимальный показатель единицы роста 400 GU, что свидетельствует о том, что условия проведения эксперимента обеспечивают хороший рост исследуемых микобактерий и растворитель ДМСО не ингибирует рост микобактерий.

Пример 4.

Оценка острой токсичности 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензида при однократном внутрижелудочном введении лабораторным мышам и крысам

Токсикометрию проводили с учетом половозрастных особенностей животных – на 48 клинически здоровых мышах обоего пола массой 20-22 г линии СВА и на 48 клинически здоровых крысах обоего пола массой 200-220 г линии Вистар. Для оценки острой токсичности сформировали опытные и контрольные группы мышей и крыс (n = 6) согласно схеме, указанной в таблице 1.

Таблица 1 – Схема внутрижелудочного введения 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензида мышам и крысам для определения острой токсичности

| № группы | Доза, мг/кг | |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Мыши | Крысы |
| 1 | 100 | 100 |
| 2 | 500 | 500 |
| 3 | 2000 | 2000 |
| 4 (контроль) | Равный объем воды очищенной | Равный объем воды очищенной |

Исследуемое соединение вводили однократно внутрижелудочно в виде суспензии в следующих дозировка – 100 мг/кг, 500 мг/кг и 2000 мг/кг живой массы.

С момента введения исследуемого соединения за животными наблюдали в течение 14 суток. В первые сутки животные находились под непрерывным контролем. Начиная со вторых суток, осмотр животных проводили 2 раза в сутки до завершения опыта. Для оценки картины интоксикации с регулярной периодичностью фиксировали общее состояние животных, поведенческие реакции, положение тела в пространстве, двигательную активность, нервно-мышечное возбуждение, состояние кожи и шерсти, цвет видимых

слизистых оболочек, размер зрачка, аппетит, количество и консистенцию фекальных масс, частоту мочеиспускания, цвет мочи, потребление корма, потребление воды, реакции на раздражители (тактильные, болевые, звуковые и световые), время возникновения и характер интоксикации, ее тяжесть и обратимость. Кроме того, оценивали динамику массы тела – взвешивание животных осуществляли до начала эксперимента, а затем на второй, седьмой и четырнадцатый день. По истечении 14 дней животных подвергли эвтаназии, провели вскрытие животных опытных и контрольных групп, после чего осуществляли визуальный осмотр, макроскопический анализ внутренних органов и определяли массу следующих органов: сердце, печень, легкие, селезенка и почки. Проводили сравнение показателей массы тела и массы внутренних органов опытных и контрольных групп. Данные, полученные на самках и самцах, учитывались и анализировались отдельно. Статистический анализ полученных экспериментальных данных и построение диаграмм размаха проводили с использованием компьютерной программы «Statistica 10.0» («StatSoft, Inc.», США). Различия считали статистически значимыми с вероятностью не менее 95 % ($p < 0,05$).

Результаты эксперимента на мышах

Установлено статистически значимое увеличение массы тела мышей обоего пола на протяжении эксперимента. Во всех опытных группах и в контрольной группе $p = 0,028$ (критерий Уилкоксона). Масса тела мышей на протяжении эксперимента увеличилась следующим образом: у мышей-самцов группы №1 в среднем на 3,3 г; у мышей-самцов группы №2 в среднем на 3,7 г; у мышей-самцов группы №3 в среднем на 3,6 г; у мышей-самцов группы №4 (контрольной) в среднем на 3,7 г; у мышей-самок группы №1 в среднем на 3,3 г; у мышей-самок группы №2 в среднем на 3,7 г; у мышей-самок группы №3 в среднем на 3,5 г; у мышей-самок группы №4 (контрольной) в среднем на 3,7 г.

По окончании эксперимента после забоя животных определяли массу стресс-компетентных органов мышей – сердца, печени, легких, селезенки и почек (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели массы сердца, печени, легких, селезенки и почек (г, Ме (Q1-Q3)) мышей опытных и контрольной групп

| Орган | Масса органа, г | | | | Н-критерий Краскела- Уоллиса |
|------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| | Группа 1 (100 мг/кг) | Группа 2 (500 мг/кг) | Группа 3 (2000 мг/кг) | Группа 4 (контроль) вода | |
| Мыши-самцы | | | | | |
| Сердце | 0,825 (0,82 - 0,85) | 0,805 (0,78 - 0,82) | 0,865 (0,84 - 0,88) | 0,86 (0,85 - 0,88) | H= 14,52; df=3, p=0,0023 |
| Печень | 1,1 (1,1 - 1,1) | 1,1 (1,0 - 1,1) | 1,1 (1,1 - 1,2) | 1,1 (1,0 - 1,2) | H= 3,067; df=3, p=0,3815 |
| Легкие | 0,22 (0,19 - 0,23) | 0,22 (0,19 - 0,24) | 0,235 (0,22 - 0,27) | 0,255 (0,23 - 0,27) | H= 5,532; df=3, p=0,1367 |
| Селезенка | 0,18 (0,18 - 0,19) | 0,185 (0,18 - 0,19) | 0,19 (0,18 - 0,20) | 0,215 (0,21 - 0,22) | H= 13,474; df=3, p=0,0014 |
| Почки | 0,365 (0,36 - 0,39) | 0,375 (0,38 - 0,38) | 0,395 (0,37 - 0,40) | 0,39 (0,39 - 0,39) | H= 7,406; df=3, p=0,06 |

| Мыши-самки | | | | | |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|
| Сердце | 0,895 (0,88 – 0,93) | 0,94 (0,93 – 0,95) | 0,895 (0,89 – 0,92) | 0,92 (0,91 – 0,93) | H= 3,849; df=3, p=0,2783 |
| Печень | 1,1 (1,1 - 1,1) | 1,15 (1,1 - 1,2) | 1,1 (1,1 - 1,1) | 1,15 (1,10 – 1,20) | H= 4,476; df=3, p=0,2145 |
| Легкие | 0,245 (0,24 – 0,27) | 0,265 (0,25–0,27) | 0,265 (0,25 – 0,28) | 0,28 (0,27 – 0,28) | H= 3,754; df=3, p=0,2893 |
| Селезенка | 0,18 (0,18 - 0,19) | 0,195 (0,19–0,20) | 0,22 (0,21 – 0,23) | 0,22 (0,22 – 0,23) | H= 16,264; df=3, p=0,001 |
| Почки | 0,39 (0,39 - 0,39) | 0,395 (0,39–0,40) | 0,40 (0,39 – 0,41) | 0,40 (0,39 – 0,40) | H= 5,121; df=3, p=0,1632 |

Согласно данным таблицы 2, видно, что статистически значимые отличия у мышей-самцов всех групп выявлены в массе сердца и селезенки ($p < 0,05$), но величина массы сердца и селезенки во всех опытных группах находится в пределах нормы. В массе печени, легких и почек у мышей-самцов всех групп отличия были статистически незначимы ($p > 0,05$).

У мышей-самок всех групп статистически значимые отличия выявлены в массе селезенки ($p < 0,05$), но величина массы селезенки во всех опытных группах находится в пределах нормы. В массе сердца, печени, легких и почек у мышей-самок всех групп отличия были статистически незначимы ($p > 0,05$).

В каждой из опытных групп мышей обоего пола на 2-ой, 7-ой и 14-ый день эксперимента не наблюдалось статистически значимое изменение массы тела по сравнению с контрольной группой (таблица 3) ($p > 0,05$).

Результаты эксперимента на крысах

Установлено статистически значимое увеличение массы тела крыс обоего пола на протяжении эксперимента. Во всех опытных группах и в контрольной группе $p = 0,028$ (критерий Уилкоксона). Масса тела крыс на протяжении эксперимента увеличилась следующим образом: у крыс-самцов группы №1 в среднем на 24,0 г; у крыс-самцов группы №2 в среднем на 24,0 г; у крыс-самцов группы №3 в среднем на 23,3 г; у крыс-самцов группы №4 (контрольной) в среднем на 24,1 г; у крыс-самок группы №1 в среднем на 24,5 г; у крыс-самок группы №2 в среднем на 23,3 г; у крыс-самок группы №3 в среднем на 23,7 г; у крыс-самок группы №4 (контрольной) в среднем на 23,7 г. В каждой из опытных групп крыс обоего пола на 2-ой, 7-ой и 14-ый день эксперимента не наблюдалось статистически значимое изменение массы тела по сравнению с контрольной группой ($p > 0,05$), кроме крыс-самцов группы №2 – у них на 2, 7 и 14-ый день эксперимента наблюдалось статистически значимое увеличение массы тела по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

По окончании эксперимента после забоя животных определяли массу стресс-компетентных органов крыс – сердца, печени, легких, селезенки и почек (таблица 3).

Таблица 3 – Показатели массы сердца, печени, легких, селезенки и почек (г, Ме (Q1-Q3)) крыс опытных и контрольной групп

| Орган | Масса органа, г | H-критерий |
|-------|-----------------|------------|
|-------|-----------------|------------|

| | Группа 1 (100 мг/кг) | Группа 2 (500 мг/кг) | Группа 3 (2000 мг/кг) | Группа 4 (контроль) вода | Краскела- Уоллиса |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Крысы-самцы | | | | | |
| Сердце | 1,0 (0,9 - 1,0) | 0,9 (0,9 - 0,9) | 1,0 (1,0 - 1,0) | 1,0 (1,0 - 1,0) | H= 10,0625; df=3, p=0,018 |
| Печень | 8,0 (7,9 - 8,1) | 7,9 (7,9 - 7,9) | 8,0 (7,9 - 8,0) | 7,9 (7,9 - 8,0) | H= 5,92; df=3, p=0,1156 |
| Легкие | 1,7 (1,6 - 1,7) | 1,6 (1,6 - 1,7) | 1,7 (1,7 - 1,8) | 1,7 (1,7 - 1,7) | H= 14,52; df=3, p=0,0023 |
| Селезенка | 1,1 (1,1 - 1,2) | 1,05 (1,0 - 1,1) | 1,0 (1,0 - 1,1) | 1,1 (1,0 - 1,1) | H= 3,31; df=3, p=0,3463 |
| Почки | 2,05 (2,0 - 2,1) | 1,95 (1,9 - 2,1) | 2,0 (2,0 - 2,1) | 2,0 (1,9 - 2,0) | H= 1,824; df=3, p=0,6097 |
| Крысы-самки | | | | | |
| Сердце | 1,05 (1,0 - 1,1) | 1,0 (1,0 - 1,0) | 1,0 (1,0 - 1,1) | 1,0 (1,0 - 1,1) | H= 1,438; df=3, p=0,6968 |
| Печень | 8,4 (8,4 - 8,5) | 8,4 (8,3 - 8,4) | 8,0 (8,0 - 8,1) | 8,0 (7,9 - 8,1) | H= 18,227; df=3, p=0,0004 |
| Легкие | 1,8 (1,8 - 1,8) | 1,7 (1,7 - 1,8) | 1,7 (1,6 - 1,7) | 1,75 (1,7 - 1,8) | H= 6,953; df=3, p=0,0734 |
| Селезенка | 1,25 (1,2 - 1,3) | 1,15 (1,1 - 1,2) | 1,1 (1,0 - 1,1) | 1,1 (1,1 - 1,2) | H= 10,938; df=3, p=0,0121 |
| Почки | 2,1 (2,1 - 2,2) | 2,05 (2,0 - 2,1) | 2,0 (1,9 - 2,1) | 2,0 (2,0 - 2,0) | H= 10,364; df=3, p=0,0157 |

Согласно данным таблицы 3, видно, что статистически значимые отличия у крыс-самцов всех групп выявлены в массе сердца и легких ($p < 0,05$), но величина массы сердца и легких во всех опытных группах находится в пределах нормы. В массе печени, селезенки и почек у крыс-самцов всех групп отличия были статистически незначимы ($p > 0,05$).

У крыс-самок всех групп статистически значимые отличия выявлены в массе печени, селезенки и почек ($p < 0,05$), но величина массы печени, селезенки и почек во всех опытных группах находится в пределах нормы. В массе сердца и легких у крыс-самок всех групп отличия были статистически незначимы ($p > 0,05$).

При оценке острой токсичности не было отмечено ранней и отдаленной гибели экспериментальных животных, получавших 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид, поэтому определение уровня LD_{50} не представляется возможным. В связи с этим LD_{50} составляет более 2000 мг/кг. Таким образом, 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид является практически нетоксичным соединением – относится к 5-му классу токсичности по модифицированной классификации Организации экономического содействия и развития (OECD) и согласно гармонизированной системе классификации опасности и маркировки химической продукции (GHS) относится к 5-му классу токсичности – то есть обладает относительно низкой острой токсичностью. LD_{50} 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида значительно выше, чем LD_{50} препарата I

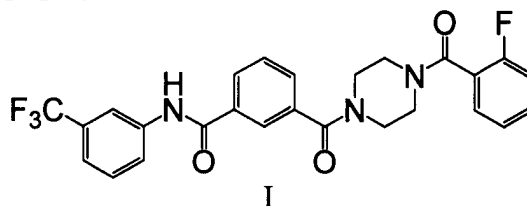
ряда для лечения туберкулеза изониазида (LD_{50} изониазида составляет 170 мг/кг при внутрижелудочном введении мышам [7]), что характеризует 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид как значительно менее токсичное соединение.

Источники информации

1. Шульгина М. В. и др. Патогенные и условно-патогенные микобактерии. – 2018.
2. Клиническое руководство по диагностике и лечению туберкулеза и его лекарственно-устойчивых форм / Е. М. Скрыгина [и др.]. – Минск, 2017. – 140 с.
3. Вольф С. Б. Нежелательные побочные реакции на химиотерапию туберкулеза // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2016. – №. 3 (55). – С. 141-146.
4. Griffiths P.A., Babb J.R., Fraise A.P. Mycobacterium terrae: a potential surrogate for Mycobacterium tuberculosis in a standard disinfectant test // Journal of Hospital Infection. – 1998 – Vol. 38 No3. – P. 183-192.
5. Antimycobacterial properties of 5H-[1,3,4]thiadiazolo[2,3b]quinazolin-5-one derivatives / O. G. Sechko [et al.] // Revista Farmaceutica a Moldovei. – 2020. – № 1–4. – С. 27–29.
6. Siddiqi S.H., Rüsç-Gerdes S. MGIT™ procedure manual for BACTEC™ MGIT 960™ TB System // Geneva, Switzerland: Foundation for innovative new diagnostics. – 2006.
7. Brennan, P. J. Isoniazid / P. J. Brennan, D. B. Young // Tuberculosis (Edinb). – 2008. – Vol. 88. – No2. – P. 112-116.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)-фенил]бензамид формулы I:



2. Способ получения соединения по п.1, заключающийся в том, что изофталевую кислоту обрабатывают оксалилхлоридом в тетрагидрофуране в присутствии диметилформамида, полученный изофталойл дихлорид последовательно конденсируют с 3-(трифторметил)анилином и 1-(2-фторбензоил)пиперазином в тетрагидрофуране с добавлением эквимолярного количества триэтиламина и выделяют целевой продукт методом кристаллизации.
3. Применение соединения по п.1 в качестве антимикробного агента, обладающего противотуберкулезной активностью.

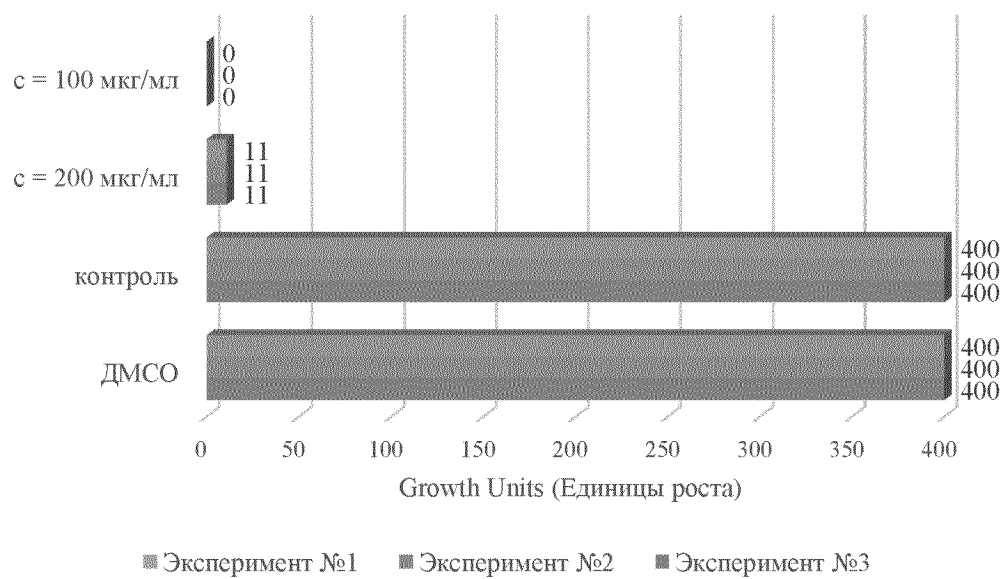


Рисунок 1

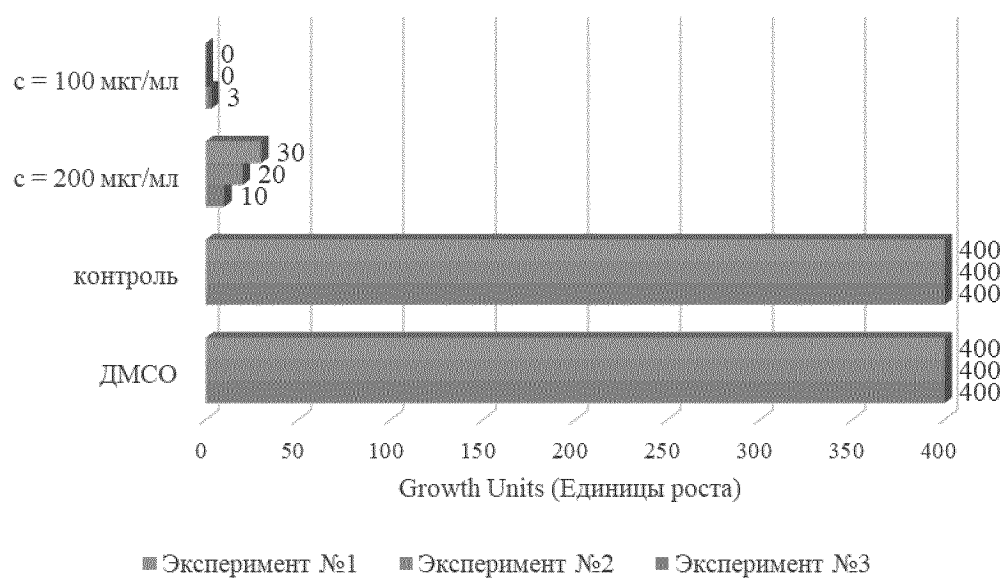


Рисунок 2

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202293116

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07D 295/192 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C07D 295/192; A61K 31/495; A61P 31/06

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, Reaxys, Patentscope, Espacenet, USPTO, Google Patents, Google Scholar

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

| Категория* | Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей | Относится к пункту № |
|------------|---|----------------------|
| X | СЕЧКО О.Г. и др. Противотуберкулезная активность производных бензамида и бензойной кислоты. БГМУ В АВАНГАРДЕ МЕДИЦИНСКОЙ НАУКИ И ПРАКТИКИ, 2021, № 6, с. 540-546 [онлайн] [найдено 2023-02-08] Найдено в < http://rep.bsmu.by/handle/BSMU/33692?show=full > реферат, с. 541 последний абзац, табл. 1 пример 8, табл. 2, фиг. 5 | 1, 3 |
| Y | с. 541 строки 26-44 | 2 |
| X | СЕЧКО О.Г., ЦАРЕНКОВ В.М. Сравнение химической структуры гибридного производного бензамида на основе изофталевой кислоты и [2 (3)-фторбензоил]-пиперазина с химическими структурами противотуберкулезных препаратов. ТЕХНОЛОГИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ: МАТЕРИАЛЫ 86-Й НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПРОФЕССОРСКО-ПРЕПОДАВАТЕЛЬСКОГО СОСТАВА, НАУЧНЫХ СОТРУДНИКОВ И АСПИРАНТОВ, Минск, 31 января - 12 февраля 2022, с. 298-300 [онлайн] [найдено 2023-02-08] Найдено в < https://elib.belstu.by/handle/123456789/46278 > с. 298 первый абзац, фиг. 1 | 1, 3 |
| Y | KALINICHENKO E et al. Synthesis, biological activities and docking studies of novel 4-(arylaminoethyl) benzamide derivatives as potential tyrosine kinase inhibitors. MOLECULES, 2019, Vol. 24, № 19, 3543 doi: 10.3390/molecules24193543 с. 6 схема 2, с. 16 п. 3.2.4.1., с. 20 п. 3.2.7. | 1, 2 |
| A | RU 2737434 C2 (ФОРМА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.) 2020-11-30 с. 95 строки 1-10, 30-40 | 1 |

последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 09/02/2023

Уполномоченное лицо:
Заместитель начальника Управления экспертизы
Начальник отдела химии и медицины

 А.В. Чебан