



УКРАЇНА

(19) UA (11) 3849 (13) U

(51) 7 C07C1/00, C07C51/06

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) ЗАСТОСУВАННЯ МОНО- ТА ДИЗАМІЩЕНИХ АМІДІВ ФЕНАЗИН-1-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ ЯК ІНГІБІТОРІВ MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS

1

2

(21) 2004032218

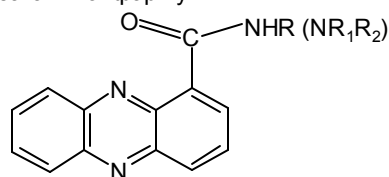
(22) 25.03.2004

(24) 15.12.2004

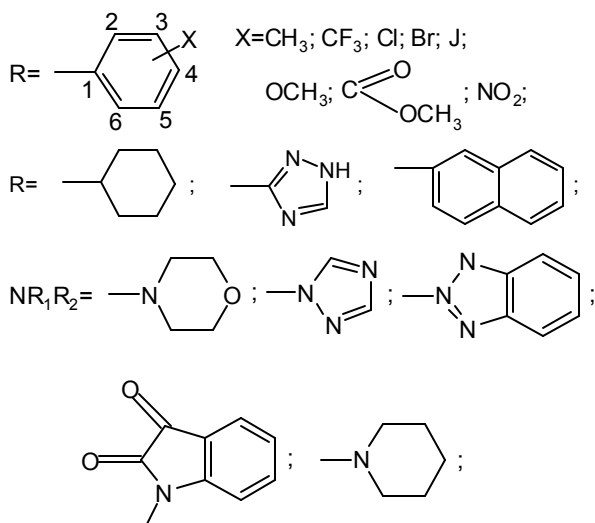
(46) 15.12.2004, Бюл. № 12, 2004 р.

(72) Алексєєва Інна Володимирівна, Пальчиковська Лариса Гнатівна, Костіна Валентина Григорівна, Де Логу Алесандро, ІТ, Швед Анатолій Давидович  
(73) ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Застосування активних сполук з ряду моно- та дизаміщених амідів феназин-1-карбонкової кислоти загальної формули



де

а R і NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> - залишки органічних сполук ароматичної або неароматичної природи, як інгібіторів *Micobacterium tuberculosis*.

Пропонована корисна модель відноситься до фармакології і стосується гетероциклічних сполук, що мають протитуберкульозну активність в ряду моно- та дизаміщених амідів феназин-1-карбонкової кислоти (ФКК-1), а також до молекулярної біології, де може бути застосована у наукових дослідженнях.

Відомі клінічні препарати, що широко застосовуються при лікуванні туберкульозу - ізоніазид, ріфампіцин, ПАСК, клофазимін, ембутол та інші [1. De Logu at all. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002, 49, p.p. 275-282; 2. Dickmson J.M. and Mitchison D.A., Tubercle, 1987, 68, p.p. 183-193; 3. Abrams, D.I at all. Journal of Infectious Diseases, 1993, 167, p.p. 1459-63; 4. Reddy V.V. at all. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1999, 43, p.p.615-623], належать до різних класів хімічних речовин, але збігаються за результатом дії - пригнічують ріст *Micobacterium tuberculosis* in vivo.

Недоліки згаданих клінічних препаратів полягають у значній токсичності (ізоніазид, ріфампіцин, ембутол), низькій розчинності (ріфампіцин) та значній собівартості. Чи не головною проблемою лікування туберкульозу є виникнення широкого спектру резистентних штамів *Micobacterium tuberculosis* до існуючих лікарських засобів. Лікування хворих у цих випадках є довготривалим, високовартісним і потребує застосування препаратів резервного ряду.

Найбільш близьким до пропонованої корисної моделі за результатом, що досягають, є клінічний препарат клофазимін, дія якого направлена на пригнічення росту *Micobacterium tuberculosis* in vivo [3. Abrams, D.I at all, Journal of Infectious Diseases, 1993, 167, p.p. 1459-63, 4. Reddy V.V. at all. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1999, 43, p.p.615-623]. Згаданий препарат має менше токсичних проявів. Він застосовується при лікуванні клінічних

(13) U

(11) 3849

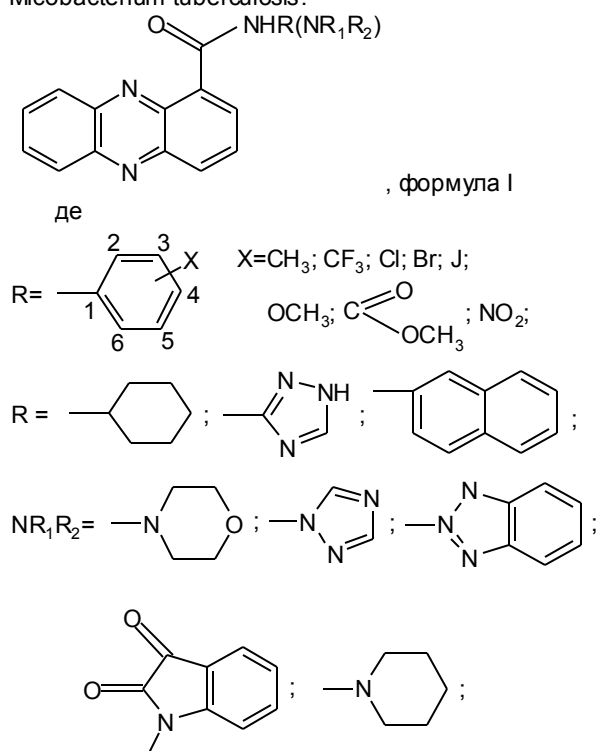
(19) UA

ізолятів з множинною резистентністю, але йому притаманні такі небажані властивості, як занадто низька розчинність, пігментація, а також висока собівартість.

В основу пропонованої корисної моделі покладено задачу створення такої речовини, що стала б основою препарату, який би мав меншу токсичність, кращу розчинність та не поступався б існуючим препаратам по ефективності дії.

Поставлена задача вирішується шляхом виявлення активних сполук у ряду моно- та дизаміщених амідів феназин-1-карбонової кислоти шляхом синтезу відповідних похідних (зокрема, для ариламідів - із різним позиційним розташуванням замісників у фенільному циклі), визначення їхньої інгібіторної дії стосовно *Micobacterium tuberculosis* та виявлення серед них такого інгібітора *Micobacterium tuberculosis*, на базі якого можна було б створити препарат, що мав би більшу розчинність, меншу токсичність та не поступався б існуючим препаратам по ефективності дії.

Поставлена задача вирішується завдяки пропонуваним речовинам, а саме, застосуванню активних сполук з ряду моно- та дизаміщених амідів феназин-1-карбонової кислоти загальної формули I, де R і NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> - залишки органічних сполук ароматичної або неароматичної природи, як інгібіторів *Micobacterium tuberculosis*.



Процес виконують у два етапи. На першому - синтезують низку вищезгаданих похідних ФКК-1 (Фізикохімічні характеристики феноламідів ФКК-1 надані у Таб. 1). На другому - визначають *in vitro* ефективності інгібіторної дії цих сполук, щодо пригнічення росту *Micobacterium tuberculosis*.

Заміщені амід феназин-1-карбонової кислоти - є похідними природної речовини - вторинного метаболіту (ФКК-1) з антибіотичною дією, що, як

відомо, продукують деякі лінії *Pseudomonas fluorescens*.

Аміди феназин-1-карбонової кислоти (сполуки формули 1) можна вважати аналогами клофазіміну - через однакову трициклічну феназинову систему, з другого боку - аналогами ізоніазиду, як аміду карбонової кислоти, та з третього - ріфампіцину, як природного антибіотика.

Значна кількість клінічних ізолятів *Micobacterium tuberculosis*, резистентних до відомих протитуберкульозних препаратів, та обмежена кількість самих препаратів робить пропонування винахід актуальним, щодо розширення арсеналу перспективних кандидатів на лікарські засоби відповідної дії.

Заміщені амід феназин-1-карбонової кислоти пропонуються, як корисна модель зі значною протитуберкульозною дією *in vitro* з подальшою можливістю підвищення їхньої специфічної антимікробної активності. Протитуберкульозна дія *in vitro* деяких представників заміщених ариламідів ФКК-1 дорівнює або удвоє вища за активність клофазіміна, вони мають кращу розчинність та їхній спосіб одержання значно простіший.

Технічний результат - виявлення у сполук IV та VI (таблиця 1) інгібіторних властивостей щодо *Micobacterium tuberculosis* H37Rv, *Micobacterium kansasii* та штамів мікобактерій, резистентних до ізоніазиду з мінімальною інгібуючою концентрацією (MIC) 0,78 µg/ml та 0,39 µg/ml.

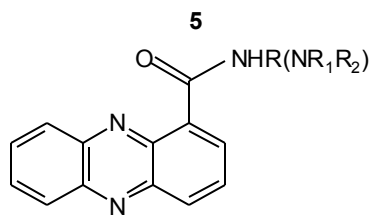
Суть корисної моделі пояснюється на табличних матеріалах (Табл. 2, 3, 4), де показана залежність пригнічуючої дії (MIC) сполук від структури фенільного замісника амідного фрагмента.

Корисна модель ілюструється наступними прикладами.

#### Приклад 1

Синтез амідів ФКК-1. До суспензії 1 ммоль ФКК-1 в 10 мл сухого толуола по черзі додають 1,4 ммоль хлористого тіонілу і 1,4 ммоль піридину. Реакційну масу витримують протягом 20 хвилин при 70°C з подальшим охолодженням до кімнатної температури і вносять надлишок (2-3 ммоль) відповідного аміну. Контроль за перебігом реакції здійснюють за допомогою тонко-шарової хроматографії на пластівках фірми „Merck” у системі розчинників - толуол:ізопропанол (90:10). Після завершення синтезу розчинники випаровують до сухого залишку, додають 10 мл води або спирту і залишають суміш на декілька годин. Осад продукту у вигляді грубих кристалів відфільтровують, ретельно промивають на фільтрі водою. Кристалізацію продукту проводять з органічних розчинників. Фізико-хімічні характеристики одержаних сполук наведені у таблиці 1. Будову синтезованих амідів ФКК-1 переконливо доведено методом хімічного аналізу, хроматографії та методами <sup>14</sup>І ЯМР спектроскопії. Спектри ПМР записані в дейтерірованому диметилсульфоксиді на приладі „Varian-300” з внутрішнім стандартом - тетраметилсиланом. ІЧ-спектри записані на спектрометрі UR-20 у таблетках KBr.

Цим методом було синтезовано амід феназин-1-карбонової кислоти загальної формули



**3849**

**6**

Тепер ці сполуки досліджуються на протиту-  
беркульозну дію.

Таблиця 1

Фізико-хімічні характеристики моно- та дизаміщених амідів  
феназин-1-карбонової кислоти, що пройшли біотестування

Сполука	Вихід, %	Замісник: R/NR <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	Т.топ., С° (розчинник)	<sup>1</sup> H-ЯМР спектр, хім. зсув, м. ч.		
				Амідн. протон	Протони фена- зинової систе- ми	Інші протони
PCA-1	64		175-178 (бутанол-1)	12,425	8,641 д (1H) 8,494 м (3H) 8,326 д (1H) 8,074 м (2H)	8,034 м (2H) 7,682 т (1H) 7,548 д(1H)
PCA-2	51		185-186 (толуол)	-	8,275 м (3H) 7,977 м (3H) 7,880 т (1H)	4,000 д (1H) 3,815 м (3H) 3,559 м (2H) 3,447 м (1H) 3,120 т (2H)
PCA-3	73		195-197 (толуол)	-	8,254 м (3H) 7,973 м (3H) 7,814 т (1H)	3,929 м (1H) 3,738 м (1H) 3,110 м (2H) 1,703 м (4H) 1,522 м (1H) 1,345 м (1H)
PCA-4	69		192-195 (бутанол-1)	12,867	8,826 д (1H) 8,410 м (2H) 8,289 д(1H) 8,033 м (3H)	7,937 д (2H) 7,415 т (2H) 7,148 т (1H)
PCA-5	80		157-158 (бутанол-1)	12,784	8,804 д(1H) 8,382 т (2H) 8,266 д(1H) 8,036 м (3H)	7,658 д (1H) 7,258 т (1H) 6,924 т (2H) 2,417 с (3H)
PCA-6	61		219-225 (ацето- нітрил)	12,714	8,802 д(1H) 8,357 т (2H) 8,225 д(1H) 8,035 м (3H)	7,797 т (2H) 6,931 т (2H) 3,799 с (3H)

Приклад 2. Визначення чутливості *Micobacterium tuberculosis*, інших мікобактерій та клінічних ізолятів, резистентних до ізоніазиду по відношенню до заміщених амідів ФКК-1. Антибак-  
теріальну дію оцінювали за впливом різних конче-  
нтрацій синтезованих сполук на ріст *Micobacterium tuberculosis*.

МІС похідних ФКК-1 та еталонного (референс) препарату - ізоніазиду визначали стандартним методом двократних розведень [7. Hawkins J.E., Wallace R.J. & Brown B.A (1991), Antibacterial susceptibility tests: mycobacteria. In: Manual of Clinical Microbiology 5<sup>th</sup> edn., (Balows, A., Hausler W. J., Hermann K.L., Isenderg H.D. & Shdomy H.J., Eds),

p.p. 1138-52. American Society for Microbiology, Washington, DC.] у планшетах з 24 лунками.

Коротко, до 1 мл 7H11 агару (Difco Laboratories Detroit, MI, USA) додавали 10% AODC (oleic acid-albumin-dextrose-catalase), що містив досліджувані речовини і ізоніазид у визначених концентраціях, додавали 10 мкл бактеріальної суспензії з конче-  
трацією 1.5x10<sup>3</sup> клітин/мл та інкубували при 37° С у атмосфері 5% CO<sub>2</sub> протягом 21 доби. МІС визна-  
чали як мінімальну концентрацію препарату, що повністю пригнічувала видимий ріст *Micobacterium tuberculosis*. Дані досліджень наведені у Табл. 2, 3, 4.

Таблиця 2

In-vitro активність заміщених амідів феназин-1-карбонової кислоти проти *M. tuberculosis* та інших видів мікобактерій

Сполуки	MIC [µg/ml]				
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. kansasii</i>
PCA-1	0,78	>200	>200	>200	0,78
PCA-2	200	>200	>200	>200	200
PCA-3	200	>200	>200	>200	200
PCA-4	3,12	>200	>200	>200	3,12
PCA-5	100	>200	>200	>200	12,5
PCA-6	0,78	>200	>200	>200	0,78
PCA-7	200	>200	>200	>200	100
PCA-8	>200	>200	>200	>200	>200
PCA-9	>200	>200	>200	>200	>200

Таблиця 3

In vitro активність вибраних феніламідів феназин-1-карбонової кислоти проти ізолятів мікобактерій, резистентних до ізоніазиду

	MIC [µg/ml]			
	PCA-1	PCA-4	PCA-6	Isoniazid
<i>M. kansasii</i> N.C. 10268.07	0.78	1.56	1.56	3.12
<i>M. bovis</i> N.C. 10772.02	25	3.12	3.12	0.78
<i>M. chelonae</i> spp. abscessus N.C. 10882.02	>100	>100	>100	>100
<i>M. szulgai</i> N.C. 10831.03	>100	3.12	3.12	0.78
<i>M. gordonae</i> N.C. 10267.05	50	1.56	1.56	>25
<i>M. fortuitum</i> N.C. 10394.02	>100	>100	>100	6.25
<i>M. avium</i> ATCC 19421	>100	>100	>100	>25

Таблиця 4

In vitro активність PCA-1 проти клінічних ізолятів *M. tuberculosis* у тому числі і резистентних до ізоніазиду

<i>M. tuberculosis</i> Clinical isolate	MIC [ug/ml]		<i>M. tuberculosis</i> clinical isolate	MIC [µg/ml]	
	PCA-1	ISONIAZID		PCA-1	ISONIAZID
Ang	0.78	0.39	Med	0.78	0.19
Are	0.78	0.39	Mel	1.56	0.19
Bac	0.78	12.5	Mon	0.39	0.39
Bias	1.56	12.5	Pac	0.78	0.19
Care	0.78	0.19	Pal	0.39	0.19
Cari	0.78	0.39	Pin	0.39	0.19
Dei	0.78	0.19	Pir	0.78	0.19
Fio	0.78	25.0	Por	0.78	12.5
Flo	0.78	0.19	Sau	0.78	0.04
Giu	0.78	0.19	Sea	0.78	0.19
Gio	0.78	12.5	Spi	0.39	0.19
Loi	0.78	0.19	Tid	0.78	0.19
Mas	0.78	0.19	Zuc	0.78	0.39

Усе викладене вище свідчить про значну інгібіторну активність феніламідів ФКК-1 (PCA-1, PCA-4, PCA-6), стосовно *Micobacterium tuberculosis* та інших мікобактерій. Молекулярний дизайн, що проводиться, відкриває перспективи розробки на основі цього класу сполук хімотерапевтичного протитуберкульозного препарату. Розширення арсеналу лікарських засобів, специфічних до міко-

бактерій, може вирішити проблему лікування туберкульозу як у людей, так і сільськогосподарських тварин, та подолати проблему резистентних до існуючих хіміопрепаратів збудників цієї тяжкої інфекції.

Джерела інформації:

1. De Logo, A., Onnis, V., Saddi, B., Congiu, C., Schivo, M.L. and Cocco, M.T., Activity of New Class

of Isonicotinoylhydrazones used alone and in combination with isoniazid, rifampicin, ethambutol, para-aminosalicylic acid and clofazimine against *Micobacterium tuberculosis*// *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2002. - 49. - P. 275-282.

2. Dickinson J.M. and Mitchison D.A. In vitro activity of new rifamycins against rifampicin-resistant *Micobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex// *Tubercle*. - 1987. - 68. - P. 183-193.

3. Abrams, D.I., Matchell, T.F., Child, C.C., Shiboski, S.C., Brosgart, C.L. & Mass, M.M., Clofazimine as prophylaxis for disseminated *Micobacterium avium* complex infection in AIDS// *Journal of Infectious Diseases*. - 1993. - 167. - P. 1459-1463.

4. Reddy, V.M., O'Sullivan, J.F., Gangadharam P.R.J. Antimycobacterial activities of

riminophenazines// *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 1999. - 43. - P. 615-623.

5. Патент US 5763443 A, МКИ: A61K 31/495; C07D 241/46. Способ лечения ракового заболевания и фармацевтически активные реминифеназины (Medlen C. E., Anderson R., O'Sullivan, J.F.) от 28.10.1996.

6. Патент US 6,387,902 B1. МКИ: A61K 31/50; C07D 241/46. Phenazine Compounds, Methods and Pharmaceutical Compositions for Inhibiting PARP (J.Zhang, K. L.Tays, Jia-He Li), 14.05.2002 p.

7. Hawkins J.E., Wallace R.J. & Brown B.A (1991), Antibacterial susceptibility tests: mycobacteria. In *Manual of Clinical Microbiology* 5<sup>th</sup> edn., (Balows, A., Hausler W.J., Hermann K.L., Isenderg H.D. & Shdomy H.J., Eds), p.p. 1138-52. American Society for Microbiology, Washington, DC.