

Противотуберкулезная активность производных бензамида и бензойной кислоты

Сечко О. Г., Слабко И. Н., Царенков В. М.

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. В результате экспериментов, посвященных изучению противотуберкулезной активности десяти соединений, синтезированных в ИБОХ НАН Беларуси — семи производных бензамида и трех производных бензойной кислоты, — установлено, что производное бензами-



да — 3-[4-(2-фторбензол)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид и производное бензойной кислоты — 4-[(2-метил-5-нитрофенил)амино]метил} бензойная кислота в концентрации 200 мкг/мл полностью подавляют рост *Mycobacterium terrae* 15755, причем в такой же концентрации, как и противотуберкулезное лекарственное средство первого ряда рифампицин в условиях эксперимента.

Ключевые слова: производные бензамида, производные бензойной кислоты, противотуберкулезная активность, минимальная ингибирующая концентрация.

Введение. Бензамид представляет собой амид бензойной кислоты (рисунок 1).

Производные бензамида имеют широкий спектр фармакологических эффектов — антимикробное, анальгезирующее, противосудорожное, противовоспалительное и противоопухолевое действие, оказывают воздействие на сердечно-сосудистую систему и т. д. [1]. Поэтому синтез и изучение фармакологической активности новых производных бензамида является актуальным.

Бензойная кислота — это ароматическая карбоновая кислота (рисунок 2), которая встречается в тканях растений и животных и может синтезироваться микроорганизмами.

Производные бензойной кислоты также имеют ряд фармакологических эффектов — противогрибковый, антибактериальный и т. д. [2, 3]. Кроме того, активно исследуется потенциальная противовирусная активность производных бензойной кислоты с помощью *in silico* подходов в отношении SARS-CoV-2 — возбудителя заболевания COVID-19 [4].

Так, E. Kalinichenko et al. синтезировали производные бензамида и бензойной кислоты в Институте биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси (ИБОХ НАН Беларуси) и исследовали их противоопухолевую активность. Ряд производных продемонстрировали значительную активность в отношении клеток K562. Биологическая оценка показала, что большинство синтезированных производных бензамида и бензойной кислоты проявляют многоцелевой профиль и высокую ингибирующую активность в отношении киназ EGFR, KDR, PDGFRa, HER-4 и InsR. Результаты этого исследования имеют важное потенциальное применение при разработке новых противоопухолевых препаратов [5].

В данной статье представлены результаты исследования противотуберкулезной активности производных бензамида и бензойной кислоты, которые были синтезированы в ИБОХ НАН Беларуси. Борьба с туберкулезом осуществляется на международном уровне и усложнена наличием приобретенной устойчивости микобактерий [6]. Таким образом, с ростом значений показателей заболеваемости, распространенности и абсолютного числа больных с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) микобактерий туберкулеза возрастает потребность в новых соединениях, обладающих противотуберкулезной активностью.

Цель работы — исследование противотуберкулезной активности производных бензамида и бензойной кислоты.

Материалы и методы. Исследование противотуберкулезной активности производных бензамида и бензойной кислоты проводили на штамме *Mycobacterium terrae* 15755 с использованием метода разведений в плотной питательной среде в чашках Петри. Данный штамм является непатогенным и рекомендован для использования в качестве модельного для определения противотуберкулезной активности [7]. Для оценки противотуберкулезной активности использовали визуальную оценку роста *Mycobacterium terrae* в плотной питательной среде в чашках Петри. Метод серийных разведений основан на создании последовательных разведений изучаемого вещества в питательной среде в порядке геометрической или арифметической прогрессии. В нашем эксперименте концентрация изучаемых соединений в ряду серийных разведений убывала в геометрической прогрессии с коэффициентом 2. Для этого был приготовлен исходный раствор изучаемого соединения в диметилсульфоксиде (ДМСО) с концентрацией 2000 мкг/мл, который затем добавляли в питательную среду Миддлбрука 7Н9 с глицерином (Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol) для получения требуемых концентраций (200 и

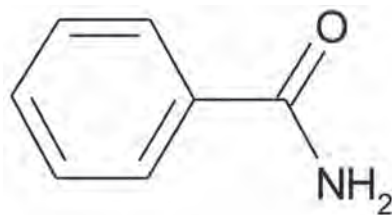


Рисунок 1 — Структурная формула бензамида

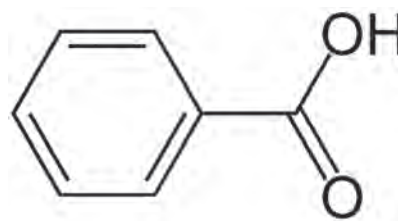


Рисунок 2 — Структурная формула бензойной кислоты

100 мкг/мл). Для получения концентрации 150 мкг/мл готовили исходный раствор изучаемого соединения в ДМСО с концентрацией 1500 мкг/мл. Затем культуру микобактерий высевали во все анализируемые растворы. Кроме того, выполнялись два контрольных опыта. Первый контрольный опыт выполнялся для контроля влияния растворителя — для этого использовали ДМСО в таком же количестве, как и в образцах с максимальной концентрацией анализируемого вещества (200 мкг/мл), который добавляли в питательную среду Миддлбрука 7Н9 с глицерином, затем культуру микобактерий высевали в анализируемый раствор. Второй контрольный опыт выполнялся для контроля роста культуры, поэтому не содержал никаких добавок. 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 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 микобактерицидным действием и используются для лечения туберкулеза [8].

Результаты и их обсуждение. Результаты определения антимикукобактериальных свойств десяти соединений, производных бензамида и бензойной кислоты представлены в таблице 1, где показан наблюдаемый рост *Mycobacterium terrae* 15755 при различных концентрациях изучаемых соединений — 100 мкг/мл и 200 мкг/мл, рост *Mycobacterium terrae* 15755 в присутствии рифампицина, изониазида, этамбутола и рост *Mycobacterium terrae* 15755 в присутствии только растворителя (ДМСО) — без добавления исследуемых соединений.

Таблица 1 — Антимикукобактериальные свойства производных бензамида и бензойной кислоты

№	Химическое название соединения	100,0 мкг/мл	200,0 мкг/мл
1	4-{{(2-метил-5-нитрофенил)амино}метил}-N-(4-{{2-(метилкарбамоил)пиридин-4-ил}окси}фенил) бензоат	++++	+++
2	4-{{(4-{{2-(метилкарбамоил)пиридин-4-ил}окси}фенил)амино}метил}-N-[3-(трифлюорометил)фенил]бензамид	++++	++
3	Диэтил (4-(((4-((2-(метилкарбамоил)пиридин-4-ил)окси)фенил)амино)метил)бензоил) глутамат	++++	+++
4	N-(3-(4-метил-1Н-имидазол-1-ил)-5-(трифлюорометил)фенил)-4-(((4-(пиридин-2-ил)пиримидин-2-ил)амино)метил)бензамид	++++	++++
5	Диэтил (4-(((4-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)амино)метил)бензоил)глутамат	++++	+++
6	4-{{[4-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил]амино}метил}-N-[3-(трифлюорометил)фенил]бензамид	++++	++++
7	4-((4-(2-флюоробензоил)пиперазин-1-ил)метил)бензойная кислота	++++	++
8	3-[4-(2-фторбензол)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)-фенил]бензамид	++++	—
9	4-{{(2-метил-5-нитрофенил)амино}метил} бензойная кислота	++++	—
10	4-гидрокситилбензойная кислота	++++	++++
11	Рифампицин	+	—
12	Изониазид	—	—
13	Этамбутол	—	—
14	Контроль растворителя (ДМСО)	—	++++
15	Контроль культуры (<i>M. terrae</i> 15755)	++++	

Примечание. «++++» — обильный рост, «+++» — сильный рост, «++» — слабый рост, «+» — незначительный рост, «—» — отсутствие роста.

Все десять исследуемых соединений в концентрации 100 мкг/мл не подавляют рост микобактерий.

Соединение 1 — производное бензамида — 4-{{(2-метил-5-нитрофенил)амино}метил}-N-(4-{{2-(метилкарбамоил)пиридин-4-ил}окси}фенил)бензоат в концентрации 200 мкг/мл подавляет рост микобактерий с обильного роста до сильного роста.



Соединение 2 — производное бензамида — 4-{{(4-{{2-(метилкарбамоил)пиридин-4-ил}окси}фенил)амино}метил}-N-[3-(трифлуорометил)фенил]бензамид в концентрации 200 мкг/мл подавляет рост микобактерий с обильного роста до слабого роста.

Соединение 3 — производное бензамида — диэтил (4-(((4-((2-(метилкарбамоил)пиридин-4-ил)окси)фенил)амино)метил)бензоил)глутамат в концентрации 200 мкг/мл подавляет рост микобактерий с обильного роста до сильного роста.

Соединение 4 — производное бензамида — N-(3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифлуорометил)фенил)-4-(((4-(пиридин-2-ил)пиримидин-2-ил)амино)метил)бензамид в концентрации 200 мкг/мл не подавляет рост микобактерий.

Соединение 5 — производное бензамида — диэтил (4-(((4-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)амино)метил)бензоил)глутамат в концентрации 200 мкг/мл подавляет рост микобактерий с обильного роста до сильного роста.

Соединение 6 — производное бензамида — 4-{{(4-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)амино}метил}-N-[3-(трифлуорометил)фенил]бензамид в концентрации 200 мкг/мл не подавляет рост микобактерий.

Соединение 7 — производное бензойной кислоты — 4-((4-(2-флуоробензоил)пиперазин-1-ил)метил)бензойная кислота в концентрации 200 мкг/мл подавляет рост микобактерий с обильного роста до слабого роста.

Соединение 8 — производное бензамида — 3-[4-(2-фторбензол)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)-фенил]бензамид в концентрации 200 мкг/мл полностью подавляет рост микобактерий (рисунок 3).

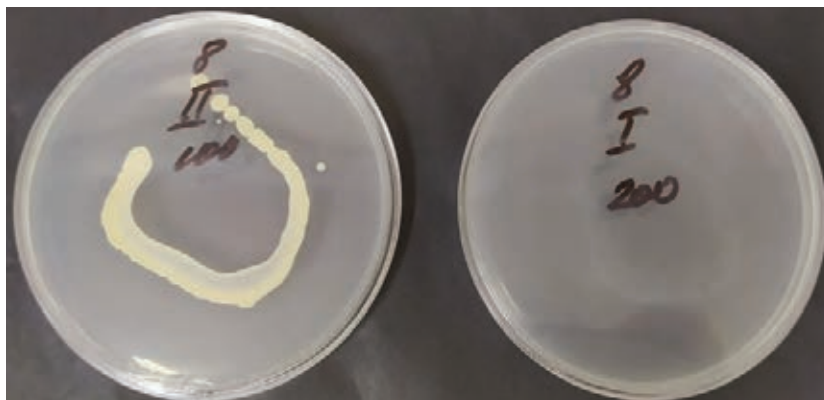


Рисунок 3 — Рост микобактерий в присутствии соединения № 8 в концентрации 100 мкг/мл (слева) и 200 мкг/мл (справа)

Соединение 9 — производное бензойной кислоты — 4-{{(2-метил-5-нитрофенил)амино}метил}бензойная кислота в концентрации 200 мкг/мл полностью подавляет рост микобактерий (рисунок 4).

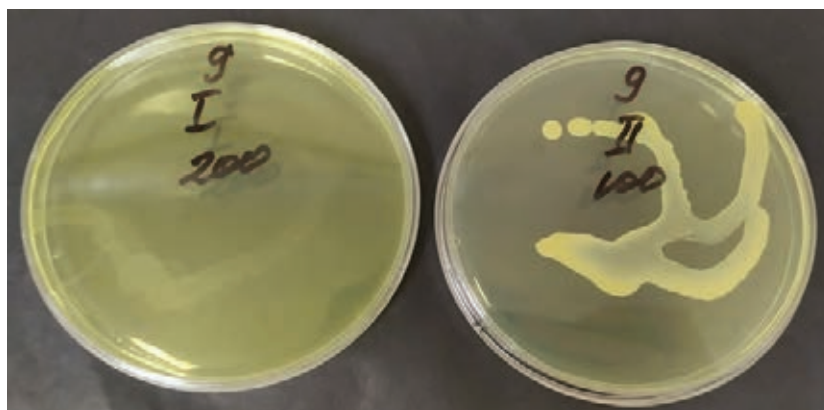


Рисунок 4 — Рост микобактерий в присутствии соединения № 9 в концентрации 100 мкг/мл (справа) и 200 мкг/мл (слева)

Соединение 10 — производное бензойной кислоты — 4-гидрокситилбензойная кислота в концентрации 200 мкг/мл не подавляет рост микобактерий.

Рифампицин, который используется в настоящее время для лечения туберкулеза и является препаратом первого ряда, в концентрации 200 мкг/мл полностью подавляет рост микобактерий.

В ходе ранее проведенных исследований нами было установлено, что изониазид, который используется в настоящее время для лечения туберкулеза и является препаратом первого ряда, в концентрациях 50 мкг/мл и 100 мкг/мл полностью подавляет рост микобактерий и этамбутол, который используется в настоящее время для лечения туберкулеза и является препаратом первого ряда, в концентрациях 25 мкг/мл и 50 мкг/мл полностью подавляет рост микобактерий [9].

Таким образом среди изученных соединений наибольший интерес для дальнейшего изучения представляют соединения № 8, структурная формула которого представлена на рисунке 5, и соединение № 9, структурная формула которого представлена на рисунке 6. У обоих соединений МИК оказалась 200 мкг/мл — такая же как у рифампицина в условиях эксперимента, поэтому дальнейшие эксперименты были посвящены изучению противотуберкулезной активности этих двух соединений и были выполнены в нескольких повторностях.

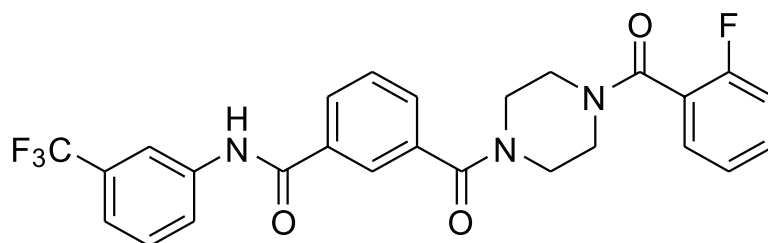


Рисунок 5 — Структурная формула соединения № 8 - 3-[4-(2-фторбензол)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)-фенил]бензамид

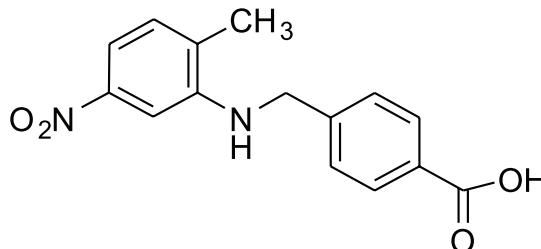


Рисунок 6 — Структурная формула соединения № 9 4-[(2-метил-5-нитрофенил)амино]метил} бензойная кислота

Результаты определения противотуберкулезной активности соединения № 8 и соединения № 9 представлены в таблице 2, где показан наблюдаемый рост *Mycobacterium terrae* 15755 в различных концентрациях изучаемых соединений — 100 мкг/мл, 150 мкг/мл и 200 мкг/мл.

Таблица 2 — Антимикобактериальные свойства соединений № 8 и № 9

Химическое название соединения	100,0 мкг/мл	150,0 мкг/мл	200,0 мкг/мл
3-[4-(2-фторбензол)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)-фенил]бензамид (соединение № 8)	++++	+++	—
	++	+++	—
	++	+++	—
	+	++	—
	+++	+++	—
4-[(2-метил-5-нитрофенил)амино]метил} бензойная кислота (соединение № 9)	++++	+++	—
	++	+++	—
	+++	+++	+

Примечание. «++++» — обильный рост, «+++» — сильный рост, «++» — слабый рост, «+» — незначительный рост, «—» — отсутствие роста.

Соединение № 8 в концентрации 200 мкг/мл полностью подавляет рост микобактерий во всех пяти экспериментах.

Соединение № 9 в концентрации 200 мкг/мл полностью подавляет рост микобактерий в двух экспериментах из трех, в одном эксперименте наблюдается незначительный рост микобактерий.

Заключение. В результате экспериментов, посвященных изучению противотуберкулезной активности десяти соединений, синтезированных в ИБОХ НАН Беларуси — семи производных бензамида и трех производных бензойной кислоты, установлено, что одно производное бензамида — 3-[4-(2-фторбензол)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид (соединение № 8) и одно производное бензойной кислоты — 4-[(2-метил-5-нитрофенил)амино]метил} бензойная кислота (соединение № 9) в концентрации 200 мкг/мл полностью подавляют рост *Mycobacterium terrae* 15755, причем в такой же концентрации, как и противотуберкулезное лекарственное средство первого ряда рифампицин в условиях эксперимента. Полученные результаты были подтверждены серией экспериментов, выполненных в нескольких повторностях: соединение № 8 во всех пяти экспериментах в концентрации 200 мкг/мл подавляет рост микобактерий, соединение № 9 в двух экспериментах из трех полностью подавляет рост микобактерий, в одном эксперименте наблюдается незначительный рост микобактерий.

Авторы выражают благодарность и глубокую признательность доктору химических наук, члену-корреспонденту Национальной академии наук, заместителю директора по научной и инновационной работе государственного научного учреждения «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» Калиниченко Елене Николаевне за предоставленные для исследования соединения.

Литература

1. Asif, M. Pharmacological potential of benzamide analogues and their uses in medicinal Chemistry / M. Asif // Modern Chemistry Applications. — 2016. — Vol. 4, № 4. — P. 1–10.
2. Benzoic acid derivatives with improved antifungal activity: Design, synthesis, structure–activity relationship (SAR) and CYP53 docking studies / S. Berne [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry. — 2015. — Vol. 23, № 15. — P. 4264–4276.
3. Synthesis and antimicrobial activity of the hybrid molecules between amoxicillin and derivatives of benzoic acid / Z. Li [et al.] // Drug. Development. Research. — 2021. — Vol. 82, № 2. — P. 198–206.
4. Molecular Docking Study on Several Benzoic Acid Derivatives against SARS-CoV-2 / A. Stefaniu [et al.] // Molecules. — 2020. — Vol. 25, № 24. — P. 5828.
5. Synthesis, Biological Activities and Docking Studies of Novel 4-(Arylaminomethyl) benzamide Derivatives as Potential Tyrosine Kinase Inhibitors / Kalinichenko E. [et al.] // Molecules. — 2019. — Vol. 24, № 19. — P. 3543.
6. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. — Geneva: World Health Organization Report 2020 [Интернет]. — Mode of access: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>. — Date of access: 05.04.2021.
7. Griffiths, P. A. *Mycobacterium terrae*: a potential surrogate for *Mycobacterium tuberculosis* in a standard disinfectant test / P. A. Griffiths, J. R. Babb, A. P. Fraise // J. of Hospital Infection. — 1998. — Vol. 38, № 3. — P. 183–192.
8. Сводное руководство ВОЗ по лечению лекарственно-устойчивого туберкулеза. Копенгаген: Европейское региональное бюро ВОЗ. — 2019. — Лицензия CC BY-NC-SA 3.0 IGO
9. 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.

Antituberculosis activity of benzamide derivatives and benzoic acid derivatives

Sechko O. G., Slabko I. N., Tsarenkov V. M.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

As a result of experiments devoted to the study of the anti-tuberculosis activity of ten compounds synthesized at the Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus — seven derivatives of benzamide and three derivatives of benzoic acid, it was found that the benzamide derivative — 3-[4-



(2-fluorobenzoyl)piperazin-1-carbonyl]-N-[3- (trifluoromethyl)-phenyl]benzamide and a benzoic acid derivative — 4-{{(2-methyl-5-nitrophenyl)amino}methyl}benzoic acid in the concentration 200 µg/ml completely inhibit the growth of *Mycobacterium terrae* 15755, accordingly minimum inhibitory concentration is the same as concentration of the first-line anti-tuberculosis drug rifampicin in experimental conditions — 200 µg/ml.

Keywords: derivatives of benzamide, derivatives of benzoic acid, anti-tuberculosis activity, minimum inhibitory concentration.

Поступила 13.07.2021