

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на тему

«Химическая разработка биологически активной субстанции на основе пиперидинсодержащих сложных эфиров и амидов фторбензойных кислот» на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D074800 – «Технология фармацевтического производства»

Исаевой Ұлжалғас Бақытжанқызы

Актуальность темы исследования: Постановлением Правительства Республики Казахстан от 24 ноября 2022 года № 945 с 2020 года реализуется комплексный план по развитию фармацевтической и медицинской промышленности на 2020 – 2025 годы. Отсутствие в стране научных исследовательских центров и фармацевтических кластеров по разработке инновационных лекарственных средств и медицинских изделий, низкий уровень инновационных технологий, наукоемких инновационных лекарственных средств и медицинских изделий, недостаточность лабораторий для проведения доклинических исследований и лабораторий для проведения медицинских испытаний, недостаточность подготовленных научных кадров и работников для фармацевтических производств в соответствии с международными стандартами (GMP) затрудняет развитие фармацевтической промышленности в стране.

Несмотря на развитие инновационных и передовых направлений исследований в области разработки новых лекарственных препаратов, а также на научные открытия прошлого века, проблема инфекционных болезней остается актуальной во всех без исключения странах мира. Об этом свидетельствуют данные ВОЗ, которые показывают, что смертность больных от инфекционных болезней занимает третье место в мире после неинфекционных заболеваний (ИБС, инсульт, ХОБЛ), а в странах с низким уровнем доходов смертность от инфекционных заболеваниях стоит на первом месте. Одной из причин неэффективности проводимого лечения является возросший уровень распространения лекарственной устойчивости возбудителя инфекции, что приводит к снижению или полной потере эффективности проводимой терапии и, соответственно, к необходимости поиска новых медикаментозных средств.

Значение химиопрофилактики и химиотерапии как способа борьбы с бактериальными инфекциями трудно переоценить, особенно в плане своевременной защиты населения в экстренных эпидемических ситуациях.

Поэтому исследование и разработка новых лекарственных средств, а также совершенствование методов оценки их качества для обеспечения максимальной терапевтической эффективности и безопасности является одной из главных задач фармацевтической химии.

Насыщенные азагетероцикланы вследствие их высокого потенциала биологического действия и технологической простоты синтеза, являются объектами исследований многих крупных мировых фармацевтических фирм и университетских исследовательских центров. Основные достижения данного

направления азаетероциклической химии заключаются в синтезе полифункциональных производных замещенных азаетероциклов, привлекающих интерес химиков всего мира из-за широкого спектра проявляемой ими биологической активности. Введение в молекулу производных азаетероцикланов других фармакофорных фрагментов приводит к появлению у них как ожидаемых, так и неожиданных видов биологической активности.

Актуальность исследований диссертационной работы определяется следующими основными факторами: необходимостью как создания биологически активных препаратов с минимальными побочными эффектами для практической медицины, так углубления и расширения теоретических представлений, связанных с решением вопросов структурных особенностей и биологического действия в ряду изучаемых азаетероцикланов и их модифицированных производных с использованием широких возможностей тонкого органического синтеза для получения фармакологически активных соединений.

Цель исследования:

Химическая разработка потенциально биологически активной субстанции на основе С- и N-замещенных пиперидинов, циклических аминов, путем введения в молекулу фрагментов, придающих молекуле противоинфекционные, в том числе противомикробные/фунгицидные свойства, разработка технологической схемы получения.

Задачи исследования:

1. Синтез пиперидинсодержащих сложных эфиров и амидов фторбензойных кислот, получение их водорастворимых форм;
2. Исследование пространственного строения полученных соединений с использованием физико-химических методов ИК, ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии, тонкослойной хроматографии (ТСХ), элементного микроанализа;
3. Определение *in vitro* противоинфекционной/противомикробной/фунгицидной активности, цитотоксичности, острой токсичности соединений;
4. Стандартизация, определение стабильности и спецификации качества потенциально биологически активной субстанции.
5. Разработка технологической схемы получения биологически активной субстанции.

Методы исследования:

Методы классической органической химии, физико-химические, биологические, фармацевтико-технологические, фармакологические, статистические.

Объекты исследования:

N-алкил-, N-алкоксиалкил-, N-арилалкил-4-оксопиперидины, 4,4-дизамещенные производные пиперидинов, амиды фторбензойных кислот с потенциальной фармакологической активностью.

На пути к реализации поставленной цели предусматривается решение ряда синтетических и аналитических (определение тонкого

пространственного строения синтезированных структур, выяснение влияния введения природы и положения различных заместителей в структуру пиперидинового цикла и амидов на биологическую активность) задач.

Предмет исследования:

Химические процессы, приводящие к получению объектов исследования и целевых продуктов их химических превращений, а также изучение тонкой структуры и свойств синтезированных соединений.

Синтез пиперидинсодержащих сложных эфиров и амидов фторбензойных кислот, получение их водорастворимых солей, определение их тонкого строения с использованием комплекса современных физико-химических методов, изучение противомикробной, в том числе антибактериальной, противогрибковой, фунгицидной, цитотоксической активности соединений, выявление взаимосвязи «структура-биологическая активность». Стандартизация потенциально биологически активной субстанции и разработка технологии его производства.

Основные положения, выносимые на защиту:

1) новые теоретические и прикладные аспекты развития химии насыщенных азотистых гетероциклов, циклических аминов, направленного молекулярного дизайна новых фармакологически активных С- и N-замещенных пиперидинов и фторосодержащих амидов в качестве потенциальных противомикробных препаратов, их структурных особенностей и конформационного анализа;

2) новые синтоны для получения потенциально биологически активных веществ;

3) рекомендации к углубленному медико-биологическому исследованию с целью получения на их основе противомикробных препаратов:

- AIP-15, AIP-16, AIP-17, AIP-21, AIP-23 и AIP-29, как вещества для борьбы с возбудителем *Staphylococcus aureus*;

- AIP-23, как вещества для борьбы с возбудителем *Escherichia Coli*;

- AIP-19, AIP-20 и AIP-21 как вещества для борьбы с возбудителем *Candida albicans*;

- AIP-18, AIP-24, AIP-27, AIP-28 в качестве противовирусных средств.

4) взаимосвязь «структура-активность»;

5) технологическая схема получения биологически активной субстанции гидрохлорида 1-бензил-4-(*n*-фтор-бензоилоксиимино)пиперидина (AIP-15);

6) Результаты изучения стабильности, токсичности и спецификации качества биологически активной субстанции гидрохлорида 1-бензил-4-(*n*-фтор-бензоилоксиимино)пиперидина (AIP-15).

Научная новизна исследования:

В настоящее время существует огромное число производных пиперидина, обладающих уникальными фармакологическими свойствами, однако до сих пор не ослабевает интерес к химии пиперидина. В настоящей работе проведен молекулярный дизайн новых потенциальных фармакологически активных γ -пиперидинов, имеющих у атома азота пиперидинового цикла алкил-, алкоксиалкил-, арилалкильные заместители. Дизайн осуществлялся в двух

направлениях: 1) направленная модификация стартовых аминокетонов, аминов с учетом базы данных по фармакологической активности соединений-лидеров (прототипов). 2) конструирование структур путем введения новых фармакофорных фрагментов в стартовые молекулы.

Для получения целевых структур использованы препаративно простые методы тонкого органического синтеза - восстановление боргидридом натрия, этилирование в условиях реакции Фаворского, оксимирования, циангидриновый синтез, ацилирование вторичных и третичных пиперидолов, пиперидинкетоксимов, пиперидинкарбоновых кислот, ацилирование аминов *пара*-, *мета*-, *орто*-фторбензоилхлоридами по Шоттену-Бауману.

Конечные продукты проведенных модификаций являются потенциальными противоинфекционными, в том числе противомикробными/фунгицидными и антибактериальными препаратами.

Модификации осуществлены с участием карбонильной группы, находящейся при С-4 пиперидинового цикла, гидроксильных групп, а также аминогруппы в циклических аминах.

В качестве строительных блоков, введенных в молекулу исходных γ -пиперидонов и приведших к биологически активным соединениям, являются этилильная, гидроксильная, карбоксильная группы, оксимный фрагмент, ацильные остатки различных карбоновых кислот - адамантанкарбоновой, *о*-, *м*-, *п*-фторбензойных кислот.

Разработаны условия ацилирования синтезированных пиперидолов, а также аминов, направленно приводящие к новым пиперидинсодержащим производным и фторсодержащим амидам.

На основании данных ИК спектроскопии и спектроскопии ЯМР ^{13}C установлено строение полученных соединений.

Среди синтезированных соединений выявлен ряд веществ, обладающих высокой противоинфекционной активностью. Наиболее активные из них рекомендованы для углубленного медико-биологического изучения с целью создания на их основе противоинфекционных средств.

В ходе проведенных микробиологических исследований в опытах *in vitro* показано, что можно выделить для дальнейших исследований на клинических штаммах следующие соединения:

AIP-15, *AIP-16*, *AIP-17*, *AIP-21*, *AIP-23* и *AIP-29*, как вещества для борьбы с возбудителем *Staphylococcus aureus*;

AIP-23, как вещества для борьбы с возбудителем *Escherichia coli*;

AIP-17, *AIP-19*, *AIP-20* и *AIP-21*, как вещества для борьбы с возбудителем *Candida albicans*.

В результате изучения совместного действия антимикробных препаратов сравнения и лигандов было установлено, что гидрохлорид 1-бензил-*п*-фторбензоилоксикетоксимпиперидина (*AIP-15*) проявляет синергетический эффект в комбинации с гентамицином в отношении мультирезистентного тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC ВАА-39.

Соединения *AIP-15*, *AIP-19*, *AIP-20* и *AIP-21* в комбинации с нистатином также проявляют синергетический эффект и в отношении грибов рода

Candida, при данных комбинациях происходит снижение значений минимальных подавляющих концентраций антимикотика до 4 раз.

Соединения *AIP-18*, *AIP-24*, *AIP-27* и *AIP-29* проявили противовирусную активность в отношении вируса А/Н1N1 при 1/2 максимальной исследуемой концентрации ЦТК₅₀.

Гидрохлорид 1-бензил-*n*-фторбензоилоксикетоксимпиперидина (*AIP-15*) стандартизирован, изучены его стабильность и острая токсичность.

Практическая значимость работы прежде всего состоит в накоплении и развитии научных представлений о пиперидиновых соединениях, методах их синтеза, строении, свойствах, которые могут впоследствии использоваться при целенаправленном конструировании и идентификации еще более сложных систем и помогут предсказывать их поведение. Вторым, но не менее важным достижением проведенного исследования, является перспективность развития дальнейших исследований по химии 4,4-дизамещенных производных пиперидина и амидов. Синтезированные соединения прошли испытания на кафедре фармацевтических технологий «Казахского национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова», в лабораториях микробиологии и вирусологии АО «Научный центр противоинфекционных препаратов», в лаборатории микробиологии АО МНПХ «Фитохимия», г. Караганда. В результате фармакологического скрининга установлено, что ряд соединений проявляют противоинфекционную активность, и были рекомендованы для углубленного изучения их фармакологических свойств.

Личный вклад докторанта: По теме диссертационной работы соискателем самостоятельно проведен обзор отечественной и зарубежной литературы, выполнены практические работы по всем поставленным задачам, обобщены полученные результаты. Это подтверждается результатами исследований, полученных в лабораторных и производственных условиях с использованием современных аппаратов и оборудования. Достоверность и обоснованность результатов исследования подтверждается направленностью на решение актуальной проблемы, выполнением работ, нормативных документов в современном исследовательском центре и научных проектах.

Выводы

Проведена химическая модификация молекул ряда *N*-замещенных 4-оксопиперидинов и соединений - лидеров с целью получения новых инновационных фармацевтических субстанции (лигандов):

По Шоттен-Бауману синтезированы ряд потенциально биологически активных циклических амидов фторбензойных кислот.

На основе ацетиленового (казкаинового) спирта путем ацилирования 4-фтор-, 3-фтор-, 2-фтор-бензоилхлоридами синтезированы соответствующие сложные эфиры *пара*-, *мета*-, *орто*-фторбензойных кислот.

На основе *N*-(алкоксиалкил)-4-оксопиперидинов синтезированы 4,4-дизамещенные производные. Синтезированы пиперидинсодержащие сложные эфиры адамантанкарбоновой кислоты.

С целью поиска новых лекарственных веществ в ряду производных пиперидина на основе [1-(2-этоксиэтил)-,1-(3-этоксипропил)-, 1 бензил]-пиперидин-4-онов восстановлением натрийборгидридом в изопропанол с хорошими выходами наработаны соответствующие вторичные спирты.

На основе [1-(2-этоксиэтил)-, 1-(3-этоксипропил)-, 1-бензил-]-4-гидроксипиперидинов проведено ацилирование 3-фтор-, 2,6-дифтор- 4-(трифторметил)-бензоилхлоридами с образованием соответствующих гидрохлоридов сложных эфиров фторбензойных кислот, имеющих в ароматическом цикле один, два и три атома фтора.

Проведен синтез и наработка кетоксипиперидина, в качестве промежуточного полупродукта реакции с целью дальнейших трансформаций, взаимодействием солянокислого гидроксилamina с 1-бензил-4-оксопиперидином в присутствии щелочи в этаноле.

С целью введения одного, двух и трех атомов фтора, нафтоилоксигруппы и фрагмента адамантана в структуры пиперидинов, а также с целью выяснения влияния на противоинфекционную активность соединений ацилированием полученного кетоксима 1-бензил-4-оксопиперидина 4-фтор-бензоилхлоридом, 3-фтор-бензоилхлоридом, 2-фтор-бензоилхлоридом, 2,6-дифторбензоилхлоридом, 4-(трифторметил) бензоилхлоридом синтезированы гидрохлориды сложных эфиров фторбензойных кислот, а также ацилированием N-бензилпиперидинкетоксима нафтоилхлоридом и адамантанкарбонилхлоридом получены соответствующие гидрохлориды сложных эфиров нафтойной и адамантанкарбоновой кислот.

Циангидриновый синтез, как наиболее простой препаративный способ введения карбоксильной группы в молекулу пиперидина, использован для получения потенциальных биологически активных пиперидинкарбоновых кислот, имеющих у атома азота пиперидинового цикла алкильные и арилалкильные радикалы. Получены кристаллические циангидрины [1-метил-, 1-пропил-, 1-бензил-, 1-(2-фенилэтил-)]-4-кетопиперидинов с выходами 75,5-83,3% путем взаимодействия соответствующих пиперидин-4-онов с ацетонциангидрином. Реакция проводилась при комнатной температуре без растворителя, с добавлением небольшого количества (2-3 капли) воды. Далее с целью получения аминокислот проведен их кислотный гидролиз с образованием [1-метил-, 1-пропил-, 1-бензил-, 1-(2-фенилэтил-)]-4-гидрокси-4-карбоксихлоридов. Гидролиз циангидринов проводился концентрированной соляной кислотой и проходил при комнатной температуре.

С целью изучения реакционной способности гидроксильной группы и с целью изучения реакционной способности гидроксильной группы и последующего выяснения влияния природы ацильного остатка, в частности введения фрагмента циклопропана и фторфенильного фрагмента в структуры пиперидинов на фармакологические свойства были синтезированы сложные эфиры циклопропанкарбоновой и *n-,m-,o*-фторбензойных кислот по гидроксильной группе гидрохлоридов N-замещенных 4-гидрокси-4-карбоксихлоридов пиперидинов.

Строение синтезированных веществ установлено на основании данных ИК спектроскопии и спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C .

Выявлены некоторые корреляции «структура-активность»: эфиры адамантанкарбоновой кислоты, соединения под шифрами АІР-5, АІР-6 высокоэффективны в отношении всех взятых в эксперимент музейных микроорганизмов, перспективны для дальнейших углубленных исследований:

- как вещество для борьбы с возбудителем *Staphylococcus aureus*;
- как вещество для борьбы с возбудителем *Escherichia coli*;
- как вещества для борьбы с возбудителем *Candida albicans*.

Совмещение в пиперидиновом цикле атома фтора, этоксиэтильного радикала у атома азота и тройной связи в четвертом положении привело к проявлению антимикробной активности, в частности, оказалось, что введение атома фтора в структуру казкаина привело к проявлению противомикробной активности, атом фтора в орто- положении оказался оптимальным в проявлении противомикробной активности, так гидрохлорид *o*-фторбензоата 1-(2-этоксиэтил)-4-этинил-4-гидроксипиперидина (казкаина) проявил относительно более широкий диапазон противомикробной активности: в отношении *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, дрожжевого грибка *Candida albicans*.

Введение *n*-фтор-бензоилоксигруппы и *m*-фтор-бензоилоксигруппы в структуру *N*-бензилпиперидинкетоксима привело к высокоэффективным противомикробным препаратам, так из всех 15-ти изученных соединений на противоионфекционную активность в эксперименте *in vitro* только два соединения, в частности, соединение 2.35 под шифром АІР-15 (гидрохлорид 1-бензил-4-(*n*-фтор-бензоилоксиимино)пиперидина) и соединение 2.36 под шифром АІР-16 (гидрохлорид 1-бензил-4-(*m*-фтор-бензоилоксиимино)пиперидина) проявили высокую эффективность в отношении мультирезистентного штамма *Staphylococcus aureus* АТСС ВАА-39 в концентрации от 31 мкг/мл до 63 мкг/мл.

Взаимное усиление антимикробной активности наблюдается также при совместном действии АІР-15 с гентамицином, АІР-15 с амоксициллином и АІР-16 с гентамицином в отношении множественно устойчивого тест-штамма *Staphylococcus aureus* АТСС ВАА-39 проявляющегося в виде синергизма, снижая их МБК в несколько раз.

Введение трех атомов фтора в структуру *N*-этоксиэтилпиперидина, соединение под шифром АІР-23 проявил эффективность в отношении мультирезистентного штамма *Escherichia coli* АТСС ВАА-196 250 мкг/мл, АІР-23 является единственным соединением, который проявил эффективность по этому показателю.

При изучении *in vitro* совместного действия антифунгального препарата нистатина с гетероорганическими производными в отношении референс-штамма *Candida albicans* АТСС 10231 установлено, что АІР-19, АІР-20 и АІР-21 проявляют синергетический эффект, уменьшая значения минимальных фунгицидных концентраций двух составляющих. АІР-19, АІР-20 и АІР-21 являются сложными эфирами *N*-бензил пиперидинкетоксима.

Проведено изучение цитотоксичности *in vitro* новых производных пиперидинов AIP-15, AIP-16, AIP-17, AIP-18, AIP-19, AIP-20, AIP-21, AIP-22, AIP-23, AIP-24, AIP-25, AIP-26, AIP-27, AIP-28 и AIP-29 на линии клеток MDCK. Показано, что из всех исследуемых гетероорганических производных наименьшей токсичностью для клеток MDCK, обладают соединения AIP-17, AIP-25, AIP-26, AIP-27 и AIP-28.

Противовирусную активность проявили соединения ряда пиперидинкарбоновых кислот и их сложных эфиров, среди 30-ти изученных соединений, только 4 соединения в той или иной степени проявили противовирусную активность. Показано, что соединение AIP-28 подавляет репликацию 100 инфекционных доз вируса на $1,2 \log_2$ по сравнению с контрольной группой только в максимально исследуемой концентрации – 1,85 мг/мл. Соединение AIP-18 подавляет репликацию 100 инфекционных доз вируса на $2,0 \log_2$ по сравнению с контрольной группой в концентрациях 0,0650 и 0,0325 мг/мл. Соединение AIP-24 в концентрации 0,035 мг/мл подавляет 100 инфекционных доз вируса гриппа A/H1N1 на $2,0 \log_2$, а в концентрациях 0,0175 и 0,0088 мг/мл на $1,0 \log_2$. Соединение AIP-27 способно подавлять 100 инфекционных доз вируса на $1,0 \log_2$, а соединение AIP-29 на $2,0 \log_2$ только в максимально используемых концентрациях (4,75 и 0,08 мг/мл соответственно).

Разработана технологическая схема соединения AIP-15, состоящая из 5 этапов: Подготовка сырья; проведение реакции; осаждение; выделение продукта; укупорка, упаковка, маркировка. Продукт стандартизирован. Вещество AIP-15 выявлено стабильность в течение двух лет при температуре $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ и относительной влажности $(60 \pm 5)\%$. В результате исследований на мышах вещество было классифицировано как соединение с низкой токсичностью. При введении вещества AIP-15 в дозе 5000 мг/мл на мышиную массу смерть животного не выявлена.

Апробация результатов диссертации

Основные результаты диссертационного исследования представлены на конференциях: XIV Международная научно-практическая конференция молодых ученых и студентов «Научная дискуссия: актуальные вопросы, достижения и инновации в медицине» (Душанбе, Таджикистан 19 апреля 2019 г.), XX Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, май 2019 г.), Международная научно-практическая конференция «XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии» (Санкт-Петербург, сентябрь 2019 г.); Международная научно-практическая конференция «XXI Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry» (Санкт-Петербург, сентябрь 2019 г.), Международная конференция «Современные проблемы химии и технологии органических веществ и материалов» (Алматы, 2019 г.), VIII Всероссийская конференция посвященная 60-летию ЗАО «Химпром» «Актуальные вопросы химической технологии и защиты окружающей среды» (Чебоксары, 16-17 апреля 2020 г.), III Международная научно-практическая конференция «Формирование и перспективы развития научной школы

фармации: преемственность поколений» (Алматы, 16 октября 2020 г.), Международная научно-практическая конференция «Тенденции, перспективы и инновационные подходы развития химической науки, производства и образования в условиях глобализации» (Алматы, 3 ноября 2021 г.), Международная научно-практическая конференция «Тонкий органический синтез-2021» (Алматы, 3 сентября 2021 г.), Международная научная конференция молодых ученых «Наука и инновации» (Ташкент, 20 октября 2022ж.), Форум молодых ученых государств-участников СНГ «Наука без границ» в рамках программы мероприятий по празднованию 300-летия Российской академии наук (Нижний Новгород, 1-3 ноября 2022 г.).

Публикации

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 24 научных работах, в том числе:

- 4 статей опубликованы в изданиях, входящих в перечень утвержденный Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК;

- 1 статья опубликована в международном научном издании, входящем в базу Scopus;

- 17 тезисов и материалов опубликованы на республиканских и международных научных конференциях;

- Получено 2 патента Республики Казахстан на полезную модель.

Связь работы с планом государственных и научных программ:

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ в АО «Институт химических наук им. А.Б. Бектурова» по темам: «Физико-химические основы создания неорганических, органических, полимерных соединений, систем и материалов с необходимыми свойствами» (Научно-техническая программа № BR05234667) (2018-2020 г.), «Разработка оригинальных отечественных инновационных фармацевтических субстанций с противомикробной активностью (лигандов)» (Проект грантового финансирования Министерства образования и науки Республики Казахстан № AP05131065) (2018-2020 гг.), «Инновационные материалы многофункционального назначения на основе природного сырья и техногенных отходов» (Научно-техническая программа №BR10965255) (2021-2023 гг.).

Достоверность и обоснованность работы: Обоснованность и достоверность результатов, выводов и заключений, сформулированных в диссертации, связанных с синтезом новых производных ряда С- и N-замещенных пиперидинов и фторсодержащих амидов подтверждается на основании данных комплекса методов физико-химического анализа (ИК-, ЯМР ¹³С спектроскопия, элементный анализ, тонкослойная хроматография). Результаты, касающиеся биологической активности впервые полученных автором соединений подтверждены результатами биологических тестов соединений (в приложении имеются соответствующие акты испытаний) и охранными документами на предмет изобретений. В диссертационной работе автор применяет апробированные в тонком органическом синтезе методики

экспериментов и установления пространственного строения шестичленных циклических систем.

Объем и структура диссертации

Диссертация содержит 204 страниц, 55 таблиц и 15 рисунков, состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения экспериментальных результатов, технологической части, заключения, приложения и списка использованной литературы, включающего 160 наименований.