

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292923** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.05.26

(51) Int. Cl. **C07D 471/04** (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.11.10

(54) **СПОСОБ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ 1,3-ДИ(п-НИТРОФЕНИЛ)-7Н-ПИРИДО[2,3-
с]КАРБАЗОЛА КАК СРЕДСТВА С АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ И АНТИФУНГАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТЬЮ**

(96) **2022000104 (RU) 2022.11.10**

(74) Представитель:
Пантюшина Е.Н. (RU)

(71)(72) Заявитель и изобретатель:
**ФАЛЬКО ДЕНИС
АЛЕКСАНДРОВИЧ (RU)**

(57) Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, а именно к соединениям, обладающим антибактериальными и фунгицидными свойствами, и касается способа использования 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо[2,3-с]карбазола как средства с высокой бактерицидной и фунгицидной активностью, в том числе по отношению к антибиотикоустойчивым микроорганизмам. Способ использования 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо[2,3-с]карбазола как средства с фунгицидной и антибактериальной активностью, включающий введение 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо[2,3-с]карбазола в среду, содержащую штаммы бактерий или грибов.

A1

202292923

202292923

A1

Способ использования 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо(2,3-с)карбазола как средства с антибактериальной и антифунгальной активностью

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, а именно к соединениям, обладающим антибактериальными и фунгицидными свойствами, и касается способа использования 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо[2,3-с]карбазола как средства с высокой антибактериальной и антифунгальной активностью, в том числе по отношению к антибиотикоустойчивым микроорганизмам. Эти свойства данного соединения могут быть использованы для подавления патогенной микрофлоры как в ветеринарии, так и в медицине.

Известно использование производных карбазолов как средств с антибактериальными свойствами или антифунгальными (противогрибковыми) свойствами. Активность того или иного соединения определяется заместителями, входящими в его состав.

Так, например, известны свойства производных N13-метилиндоло[2,3-а]пирроло[3,4-с] карбазол -5,7-диона, содержащих при N13-атоме азота гетероцикла метильную группу, при N12-атоме азота гетероцикла углеводные остатки пяти- или шестичленных сахаров и, независимо, остатки S- или R-аминокислот при N6 атоме азота гетероцикла как противоопулевых антибиотиков (патент RU 2755572, опубл. 17.09.2021, МПК: C07H 19/23, A61P 35/00).

Однако, известным производным карбазола характерна активность именно в качестве противоопухолевых средств.

Известно применение 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо[2,3-с]карбазола в качестве флюорохрома (авторское свидетельство №658131, 14.02.1977 г, МПК: C07D 215/12). Однако известное соединение никогда не использовали и не рассматривали в качестве средства с фунгицидными и антибактериальными свойствами.

Ближайшим аналогом выбран 1-стирил-3(п-аминофенил)-7н-пиридо[2,3-с] карбазол, обладающий противомикробной активностью, в том числе к антибиотикоустойчивым микроорганизмам (авторское свидетельство №565501, 16.02.10976 г, C07D 471/02).

Однако для данного соединения не установлены антифунгальные свойства и оно не находит промышленного применения в связи со сложностью синтеза.

В рамках данного изобретения предлагается способ использования известного производного карбазола - 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо[2,3-с]карбазола, как средства с антибактериальными и антифунгальными свойствами.

Техническим результатом изобретения является расширение области применения 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо[2,3-с]карбазола, а именно применения в качестве средства, которое обладает высокими антибактериальными, в том числе по отношению к антибиотикоустойчивым видам микроорганизмов, и антифунгальными (противогрибковыми) свойствами.

Технический результат достигается для способа использования 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо(2,3-с)карбазола, включающего введение 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо(2,3-с)карбазола в среду, содержащую штаммы бактерий или грибов.

Среда может содержать штаммы бактерий, относящихся к *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, в том числе грамположительных или грамотрицательных. Также данное соединение может применяться в качестве антибиотика по отношению к другим типам аналогичных бактерий.

Среда может содержать грибки, относящиеся, в частности, к *Candida albicans*, либо к другим типам грибов, например, *Malassézia furfur* (вид дрожжевых грибов, обитающих на коже большинства людей и животных), *Trichophyton* (род грибов, который включает в себя паразитические виды), *Microsporum canis* и *Microsporum ferrugineum*.

На фигуре 1 представлена общая структурная формула 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо(2,3-с)карбазола.

Ниже представлен пример реализации заявляемого способа.

16 г 3-аминокарбазола смешивают с 13,28 г п-нитробензальдегида, 14,56 г п-нитроацетсфенона, 35 мл изобутилового спирта, 5 мл диметилсульфоксида (ДМСО) и при постоянном перемешивании смесь нагревают на кипящей водяной бане до температуры $t = 80 - 85^{\circ}\text{C}$. Полученную смесь выдерживают в течение 30-40 минут. После чего в полученную смесь прибавляют 0,2 мл концентрированной соляной кислоты. И выдерживают смесь ещё 3,5 - 4 часа. После чего смесь охлаждают до комнатной температуры, а затем помещают в холодильник на 8-10 часов при температуре $t = -4 - -10^{\circ}\text{C}$. Выпавшую в осадок твёрдую часть отфильтровывают и приливают 5 мл спирта и 0,5 мл водного аммиака. Полученную смесь нагревают в течение 5 - 10 мин. на кипящей водяной бане до температуры $t = 40 - 60^{\circ}\text{C}$. После чего, твёрдый осадок отфильтровывают, добавляют 50 мл смеси метанола с толуолом (1:1) и перекристализовывают. Получают 21 г 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо[2,3-с]карбазола

в виде кристаллического вещества оранжевого цвета, плавящегося при 340 °С с разложением. Выход продукта составил 44%.

Элементный анализ полученного соединения выполнен на полуавтоматическом С,N,H-анализаторе 5E-CHN2200.

Элементный анализ:

Найдено %: С 70,1 70,2; Н 3,12 3,2; N 11,8 11,2

Вычислено %: С 70,5; Н 3,48; N 12,19

Брутто формула $C_{27}H_{16}N_4O_4$

Дополнительно проводилось изучение структуры синтезированного вещества методом инфракрасной спектроскопии. ИК-спектры регистрировали с помощью ИК-Фурье спектрометра FTIR-8400S «Shimadzu» в области 400-4000 cm^{-1} .

Полученное соединение 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо[2,3-с]карбазол было испытано на антибактериальную и антифунгальную активность. Исследования проводилось на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ГОУ ВПО ЧГМА «Читинская государственная медицинская академия». При этом проводилась серия опытов с концентрацией вещества (1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо[2,3-с]карбазол) 2000 мкг/мл и 2500 мкг/мл.

Исследования (испытания) антимикробной данного соединения проведены в отношении 5 музейных тест-штаммов (*Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecalis* H22, *Candida albicans* 24433 ATCC, *Escherichia coli* 3912/41, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* 204) и 15 клинических штаммов, обладающих полирезистентностью к антимикробным препаратам. Использовался количественный метод посева с подсчетом выросших колоний на опытных и контрольных чашках. Предварительный отбор полирезистентных штаммов был проведен согласно рекомендациям EUCAST, версия 12.0. Бактерицидная активность рассчитывалась в % от общего количества колоний на контрольных чашках

Были приготовлены, разлиты и подсушены опытные чашки с испытуемыми концентрациями соединения и контрольные чашки. Из суточных культур штаммов микроорганизмов с помощью стандарта мутности McFarland были приготовлены взвеси с концентрацией микроорганизмов 10^6 КОЕ/мл в 0,85% растворе NaCl. Культуры засеивались на поверхность опытных и контрольных чашек в двух повторностях в количестве 10^5 . Инкубировали в термостате при 37°C 48±3 часа.

После термостатирования производился учет выросших колоний в опытных и контрольных чашках с подсчетом % подавления роста тест-штаммов.

Данное соединение в обеих концентрациях (2000 и 2500 мкг/мл) подавило рост всех штаммов (музейных и клинических) стафилококков, энтерококков, эшерихий, грибов рода Кандида на 100%. Рост колоний клебсиел при концентрации соединения 2000 мкг/мл был подавлен на 35%, при 2500 мкг/мл - на 100% (Таблица).

Таблица.

Наименования тест-штаммов	Устойчивость к антимикробным препаратам	Подавление роста при концентрации 2000 мкг/мл	Подавление роста при концентрации 2500 мкг/мл
<i>S. aureus</i> 25923	-	100%	100%
<i>S. aureus</i> , клинические изоляты	Пенициллины, цефалоспорины, макролиды, тетрациклины, хлорамфеникол	100%	100%
<i>E. faecalis</i> H22	-	100%	100%
<i>E. faecalis</i> , клинические изоляты	Аминогликозиды, фторхинолоны, оксазолидионы.	100%	100%
<i>E. coli</i> 3912/41	Пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, аминогликозиды	100%	100%
<i>E. coli</i> , клинические изоляты	Пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, аминогликозиды	100%	100%
<i>K. pneumoniae</i> 244	-	40%	100%
<i>K. pneumoniae</i> , клинические изоляты	Пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы	30%	100%
<i>C. albicans</i> 24433 ATCC	-	100%	100%
<i>C. albicans</i> , клинические изоляты	Азолы	100%	100%

Результаты исследований (испытаний) показали значительную эффективность соединения 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо[2,3-с]карбазол в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов и грибов рода Кандида вне

зависимости от полирезистентности к антимикробным препаратам. Содержание 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо(2,3-с)карбазола в данной серии исследований составляло от 2000 мкг до 2500 мкг на 1 мл среды, содержащей штаммы бактерий или грибов. Из таблицы видно, что для некоторых штаммов полное подавление роста колоний происходит при содержании 2000 мкг на 1 мл среды. Для некоторых штаммов при незначительном увеличении содержания (до 2500 мкг) происходит подавление роста сразу от 30% до 100%. Оценка минимальных эффективных количеств 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо(2,3-с)карбазола для подавления роста каждого вида штамма не проводилась, в связи с чем содержание данного вещества как антибактериального и антифунгального средства на 1 мл среды может быть меньше 2000 мкг или больше 2500 мкг в зависимости от вида конкретного штамма бактерий или грибов.

При рассмотрении обработанных раствором данного соединения микроорганизмов под люминесцентным микроскопом найдено, что они люминисцируют красным светом. Это говорит о поверхностной адсорбции 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо[2,3-с]карбазола и позволяет сделать вывод о том, что его антибактериальное действие обусловлено нейтрализацией жизненно важных центров на поверхностных мембранах микроорганизмов. Что объясняет одновременно антибактериальный и антифунгальный эффект. Такой механизм бактерицидного действия делает невозможным «привыкание» микроорганизмов к его воздействию. Соединение имеет преимущество перед 1-стирил-3(п-аминофенил)-7н-пиридо [2,3-с] карбазол и современными антибиотиками. Вещество перспективно в плане возможного применения для борьбы с внешней инфекцией людей и животных.

Приведенные примеры реализации подтверждают достижение технического результата, а именно расширение области применения 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо[2,3-с]карбазола, которое обладает высокими бактерицидными, в том числе по отношению к антибиотикоустойчивым видам микроорганизмов, и фунгицидными (противогрибковыми) свойствами. Что позволяет использовать его в качестве лекарственного препарата для лечения людей и животных.

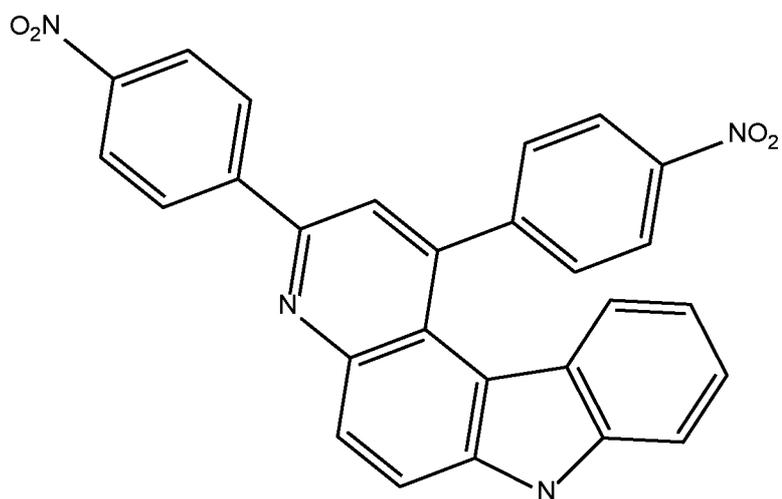
Формула изобретения

1. Способ использования 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо(2,3-с)карбазола как средства с фунгицидной и антибактериальной активностью, включающий введение 1,3-ди(п-нитрофенил)-7Н-пиридо(2,3-с)карбазола в среду, содержащую штаммы бактерий или грибков.

2. Способ использования по п.1, в котором среда содержит штаммы бактерий, относящихся к *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, в том числе грамположительных или грамотрицательных.

3. Способ использования по п.1, в котором среда содержит грибки, относящиеся к *Candida albicans*.

**Способ использования 1,3-ди(п-нитрофенил)-
7Н-пиrido(2,3-с)карбазола как средства с
фунгицидной и антибактериальной
активностью**



Фиг. 1

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

Номер евразийской заявки:

202292923

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07D 471/04 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C07D 471/04, A61K 31/437, A61P 31/04, 31/10

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, ESPACENET, REAXYS, GOOGLE, EMBASE

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A, D	SU 658131 A1(ЧИТИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО) 1979-04-25 пример 4	1-3
A	SU 492517 A1 (ЛЕТУНОВ В.И. и др.) 1976-03-10 пример 1	1-3
A	EP 0008556 A1 (AGENCE NATIONALE DE VALORIZATION DE LA RECHERCHE) 1980-03-05 формула, реферат	1-3
A	Козлов Н.С. и др. Конденсация Арилиден-3-аминокарбазолов с Метилкетонами. ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК БССР, 1978, Том XXII, №6, с.519-522	1-3

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
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«У» - 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: **30/01/2023**

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


А.В. Чебан