

(11) Patent numeris: **4712**

(51) Int. Cl.⁶: **C07D 487/18**
A61K 31/14

(21) Paraiškos numeris: **99-154**

(22) Paraiškos padavimo data: **1999 12 27**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2000 07 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2000 10 25**

(72) Išradėjas:

Antanas Stankevičius, LT
Algimantas Petras Matusevičius, LT
Aidas Grigonis, LT
Laimutė Marija Stankevičienė, LT

(73) Patent savininkas:

Lietuvos Veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, 3022 Kaunas, LT
Kauno medicinos universiteto Kardiologijos institutas,
Sukilėlių g. 17, 3007 Kaunas, LT

(54) Pavadinimas:

N-karbamoilmetilheksametilentetraamonio dariniai, pasižymintys
antimikrobinio poveikiu

(57) Referatas:

Šiame išradime pateikiamas N-karbamoilmetilheksametilentetraamonio chloridas, pasižymintis antimikrobinio aktyvumu. Išradime taip pat pateikta jo sintezė, antimikrobinis aktyvumas bei ūmus toksiškumas. Patentuojamas junginys pasižymi mažu toksiškumu ($LD_{50}=2890$ mg/kg). Nustatyta, kad tai plataus antimikrobinio spektro medžiaga. Ji ypač efektyvi prieš Salmonella spp. ir Pseudomonas aeruginosa bakterijas.

Išradimas priklauso farmacijos sričiai, nes gali būti naudojamas kaip antimikrobinis vaistas veterinarijos, medicinos ir kitoms sritims.

Iš daugelio antimikrobinų medžiagų artimiausi analogai yra banzoalkonijaus chloridas ir dovicilas-200. Cheminiu požiūriu jie, kaip ir siūlomas junginys yra ketvirtiniai amonio dariniai. Tačiau antimikrobinio poveikiu efektyvesnis yra banzoalkonijaus chloridas. Pastarojo darbinė koncentracija 0,01-0,1%, o dovicilo-200 – 0,1-0,2%. Pagal suvestinę lentelę apžvalginame straipsnyje (Г. Я. Легин, 2-бром-2-нитропропан-1,3-диол (бронопол) и его производные: синтез, свойства, применение (обзор). Хим. фармацевт. журнал, 1996, 30, № 4, стр. 54-64.) matosi, kad banzoalkonijaus chloridas tiek gramteigiamas (Gr+), tiek gramneigiamas (Gr-) bakterijas, tiek grybelius (mielėms panašius ir pelėsinius) vienintelis iš daugelio antimikrobiškai veikia mažiausiomis koncentracijomis.

Banzoalkonijaus chlorido toksiškumą nusako jo LD_{50} , kuri mūsų duomenimis baltoms pelėms *per os* yra 100 mg/kg. Todėl jis priskiriamas prie vidutiniškai toksiškų medžiagų. Vis dėlto jau yra buvę apsinuodijimų (M. Van Berkel, F. A. de Wolff / Survival after acute benzalkonium chloride poisoning. // "Hum. Toxicol.", 1988, 7, № 2, 191-193 (angl.). Р. Ж. «Токсикология» 1988 г. 9. 75. 442; В. Janiak / Viruzide und Spermizide mit einem Gehalt an quaternären Ammoniumsalzen // Pat. 3706484 VFR. Р. Ж. «Химия» 1989 г. 90201 П.)

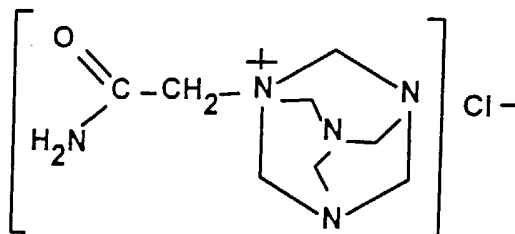
Banzoalkonijaus chloridas, ištirpintas vandenyje nepakankamai efektyvus į tokius mikrobus kaip *Salmonella spp.* (К. Ш. Досанов / Некоторые аспекты механизма действия препарата ниртан и перекиси водорода на бактерии. // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук. Министерство сельского хозяйства СССР. Всесоюзный научно – исследовательский институт ветеринарной санитарии (03. 00. 07. – Микробиология), Москва, 1979 г.) ir *Pseudomonas aeruginosa* (J. Plocek, A. Lukaš, P. Majer / Farm. obzor. - 1988. - Vol. 57, № 6. - p. 257-269.). Aišku, didinant koncentraciją, galima pasiekti gerą efektą ir į tik ką minėtus mikrobus. Tačiau su vidutinio toksiškumo banzoalkonijaus chlorido didelėmis koncentracijomis dirbti reikėtų atsargiai.

Šio išradimo esmę sudaro naujai sintezuotų N-karbamoilmetil heksametilentetraamonio darinių geras vandeninių tirpalų antimikrobinis poveikis ir žymiai mažesnis toksiškumas. Efektingiausias iš jų yra N-karbamoilmetil heksametilentetraamonio chloridas (lab. šifras U-77). Jo aktyvumas į Gr+ ir Gr- bakterijų atstovus, lyginant su banzoalkonijaus chloridu (lab. šifras BALcl)

naudojant difuzinį duobelių metodą (V. Girdzijauskas, D. Vikonytė - Vasiljevienė, H. Borisevičienė, V. Kantauskas / Mikrobų jautrumo antibiotikams nustatymas. // Medicininės mikrobiologijos praktinis vadovas. Valstybinė politinės ir mokslinės literatūros leidykla, Vilnius, 1961 m., 113; W. Köhler, H. Mochmann / Resistenztestung gegen Antibiotika. // Grundriß der Medizinischen Mikrobiologie. Vierte Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1975, 615.) matyti, kad stipriausiu antimikrobinio veikimu pasižymi U-77. Į *E. coli*, *Streptococcus agalactiae* ir *Staphylococcus aureus* bakterijas U-77 ir banzoalkonijaus chloridas veikia beveik vienodai, tačiau *Salmonella spp.* vystymąsi U-77 slopina beveik du kartus stipriau. Į cheminėms medžiagoms atsparias *Pseudomonas aeruginosa* bakterijas U-77 taip pat veikia stipriau už banzoalkonijaus chloridą.

Nustačius toksiškumą (tuo pačiu metodu kaip ir banzoalkonijaus chloridui) gauta, kad U-77 yra mažai toksiška medžiaga. Jos $LD_{50}=2890$ mg/kg, t. y. beveik 29 kartus mažiau toksiška, nei banzoalkonijaus chloridas.

Tuo būdu yra visiškai akivaizdu, kad U-77 gali būti panaudota kaip efektingai veikianti, netoksiška antimikrobinė medžiaga. Jos struktūrinė formulė:



U-77

N-Karbamoilmetil heksametilentetraamonio chlorido (U-77) sintezė

Apvaliadugnėje 100 cm³ talpos kolbutėje su grįžtamuoju šaldytuvu ištirpinama šildant 2,8 g (0,02 molio) farmakopėjinio heksametilentetramino 30 - yje cm³ trichlormetano, pridėjame 1,87 g (0,021 molio) chloracetamido ir mišinį šildome vonioje 4 h prie 80°C (kad trichlormetanas virtų). Reakcijos eiga buvo sekama chromatografiškai kas 0,5 h.. Atšalus mišiniui iki kambario temperatūros baltos kristalinės nuosėdos surenkamos ant filtro, plaunamos keletą kartų karštu trichlormetanu (po 20 cm³). Gautos medžiagos vienalytiškumas tikrintas

chromatografiškai ant silufolo – UV254 plokštelės eliuentu naudojant tirpiklių mišinį iš butanolio – etanolio – acto rūgšties ir vandens santykiu 8:2:1:3. Gauta 3,18 g (68%).

Dėmės ryškinome jodo garuose. R_f 0,28. Lydimosi (skilimo) temperatūra 121-123°C. Elementinės analizės duomenys: išskaičiuota: N 29,85%; Cl 15,14%. $C_8H_{17}ON_3Cl$. Gauta: N 29,73%; Cl 14,85%.

Taip buvo pirmą kartą sintezuotas U-77 ir pateiktas biologiniams tyrimams.

Antimikrobinio aktyvumo tyrimas ir jo kiekybiniai rodikliai

Mikroorganizmų jautrumą tiriamajai U-77 medžiagai nustatėme naudodami difuzinį duobelių metodą (V. Girdzijauskas, D. Vikonytė - Vasiljevienė, H. Borisevičienė, V. Kantauskas / Mikrobus jautrumo antibiotikams nustatymas. // Medicininės mikrobiologijos praktinis vadovas. Valstybinė politinės ir mokslinės literatūros leidykla, Vilnius, 1961 m., 113; W. Köhler, H. Mochmann / Resistenztestung gegen Antibiotika. // Grundriß der Medizinischen Mikrobiologie. Vierte Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1975, 615.): mėsos peptono agarą išpilstėme į Petri lėkštes po ~40 ml. Ant pilnai paruošto mėsos peptono agaro užsėjome vieną kurių nors iš šių bakterijų *E. coli*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella enteritidis* Gartneri, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* buljoninę kultūrą. Po to, išsiurbiant terpę, darėme 9 šulinėlius (8 mm. diametro): vieną centre, aštuonis iš šonų ratu. Į šulinėlius lašinome po 1 lašą mėsos peptono agaro, kad tiriamoji medžiaga nepatektų po terpę. Į šoninius šulinėlius lašinome po 0,1 ml skirtingos koncentracijos (0,05-10%) tiriamos medžiagos vandeninio tirpalo, o į centrinį šulinėlį nieko nelāšino (kontrolė). Lėkštes laikėme termostate 18-24 val. 37°C temperatūroje. Bakteriostatinį medžiagų veikimą įvertinome, matuojant apie šulinėlį esančios sterilios zonos diametrą milimetrais.

1 lentelėje pateikti tyrimų *in vitro* rezultatai. U-77 bakteriostatinį aktyvumą palyginome su benzoalkonijaus chloridu bakteriostatinio aktyvumu. Norėdami gauti tikslesnius duomenis su kiekviena bakterijų kultūra ir tiriamos medžiagos koncentracija atlikome po 8 tyrimus.

1 lentelė. U-77 benzoalkonijaus chlorido aktyvumo palyginamasis įvertinimas

Tiriamoji medžiaga	Konc. %	Tiriamos medžiagos poveikis į bakterijų kultūrą ir sterilios zonos diametras milimetrais				
		<i>E. coli</i>	<i>S. cholerae suis</i>	<i>S. enteritidis Gartneri</i>	<i>Str. agalactiae</i>	<i>Staph. aureus</i>
BALcl	1	25,1±0,4	17,0±0,3	15,8±0,1	26,8±0,6	26,3±0,4
U-77	1	25,6±0,4	32,4±1,4 ^{4*}	30,1±0,7 ^{4*}	31,6±0,4 ^{4*}	28,9±0,9 ^{2*}

Pastaba: P<0,05 - *, P<0,02 - ^{2*}, P<0,01 - ^{3*}, P<0,001 - ^{4*}, BALcl - benzoalkonijaus chloridas, U-77 - naujos tiriamosios vaistinės medžiagos laboratorinis šifras.

Iš duomenų, pateiktų 1 lentelėje, matome kad U-77 pasižymi platesniu bakteriostatinio veikimo spektru už benzoalkonijaus chloridą. Jis gerai veikia ir Gr+ (*Streptococcus agalactiae* ir *Staphylococcus aureus*), ir Gr- (*E. coli*, *Salmonella cholerae suis* ir *Salmonella enteritidis Gartneri*) bakterijas. Tuo tarpu 1% benzoalkonijaus chlorido tirpalas prastokai veikia *Salmonella spp.*

Papildomai ištyrėme benzoalkonijaus chlorido ir U-77 bakteriostatinį aktyvumą į labai atsparias *Pseudomonas aeruginosa* (kamienai L001, L002, L003, L004) bakterijas. Norėdami gauti tikslesnius duomenis su kiekviena medžiaga atlikome po 8 tyrimus. Gauti rezultatai pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė. U-77 ir benzoalkonijaus chlorido aktyvumas į *Pseudomonas aeruginosa* bakterijas

Tiriamoji medžiaga	Konc. %	Tiriamos medžiagos poveikis į bakterijų kultūrą ir sterilios zonos diametras milimetrais			
		L001	L002	L003	L004
BALcl	1	15,5±0,3	18,0±0,3	15,6±0,2	15,8±0,3
U-77	1	19,6±0,8 ^{4*}	19,4±0,4 ^{3*}	19,4±0,6 ^{4*}	19,7±0,5 ^{4*}

Pastaba: P<0,05 - *, P<0,02 - ^{2*}, P<0,01 - ^{3*}, P<0,001 - ^{4*}

Pseudomonas aeruginosa bakterijas U-77 tirpalas veikia šiek tiek stipriau už benzoalkonijaus chloridą. Tik kamienas L002 vienodai jautrus abiejoms

medžiagoms. Atsižvelgdami į tai, kad *Pseudomonas aeruginosa* bakterijos yra labai atsparios cheminių medžiagų poveikiui, galime teigti, kad U-77 prieš jas veikia gana efektyviai.

Ūmaus toksiškumo tyrimas ir jo kiekybiniai rodikliai

U-77 junginio ūmų toksiškumą nustatėme atlikdami bandymus su baltomis pelėmis. Tiriamosios medžiagos toksiškumo įvertinimui buvo paimta 30 nelinijinių, abiejų lyčių 20-22 g svorio baltų pelių. Bandoma vaistinė medžiaga zondo pagalba buvo suduota tiesiai į skrandį (viso 5 skirtingos dozės). Kiekvienai dozei panaudota po 6 peles. Po preparato sudavimo pelės buvo stebimos 5 dienas, kreipiant dėmesį į bendrą savijautą, judrumą, jautrumą dirgikliams, apetitą ir gaišimo laiką. Pagrindiniu kriterijumi buvo pasirinktas pelių gaišimas nuo atitinkamos dozės. Nugaišusias peles skrodėme ir apžiūrėjome vidaus organus. Gautus duomenis apdorojome Ličfildo ir Uilkoksono (1949), modifikuotu Z. Roto, metodu (Л. Беленький / Метод Литчфилда и Уилкоксона (1949) // Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Государственное издательство медицинской литературы, Ленинград 1963.). Naudojantis probitiniu tinkleliu ir nomogramomis apskaičiavome bandomųjų vaistinių medžiagų LD_{16} , LD_{50} (bei jos patikimumo ribas) ir LD_{84} . Remiantis gautais duomenimis, pagal farmakologijos ir chemioterapijos reikalavimus buvo nustatyta bandomosios medžiagos toksiškumo klasė. 3 lentelėje pateikti U-77 ūmaus toksiškumo parametrai baltoms pelėms.

Remiantis gautais duomenimis ir atsižvelgdami į chemioterapijos reikalavimus, galime teigti, kad U-77 priklauso mažai toksiškų medžiagų grupei, nes LD_{50} (tai vidutinė mirtina dozė. Ji reiškia veikliosios medžiagos kiekį, kuris įduotas tam tikru būdu, sukelia 50% eksperimentinių gyvūnų mirtį) yra šios grupės parametru ribose (500-5000 mg/kg).

3 lentelė. U-77 ūmaus toksiškumo parametrai baltoms pelėms

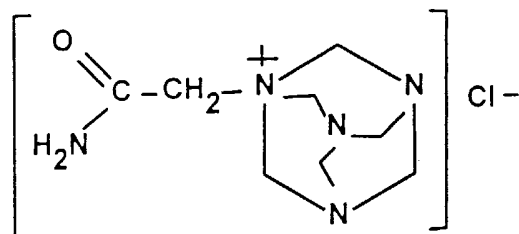
Prepara- rato dozė, mg/kg	Ste- bimas efek- tas	Stebimo efekto %	Laukia- mo efekto %	Stebimo ir laukiamo efektų skirtu- mas, %	Dėme- nys χ^2	Bando- mojo reikšmė χ^2	Reikšmė χ^2 , kai $P=0,05$	Patikimumo apskaičiavimo ribos, LD_{50}				Toksiškumo parametrai, mg/kg		
								S	N'	fED ₅	$\bar{u}$	LD ₁	LD ₅	LD ₅
1000	0/6	4,4	14,0	9,6	0,075									
2000	2/6	33,3	23,8	9,5	0,049									
3000	3/6	50,0	53,4	3,4	0,0048	2,14	7,82	1,65	18	1,38		1720	2890	4800
4000	4/6	66,6	74,0	7,4	0,0281									
5000	6/6	92,0	71,4	20,6	0,2									

Lentelėje pateiktos reikšmės detaliai parašytos šiam šaltiniui: Л. Беленький / Метод Литчфилда и Уилкоксона (1949) // Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Государственное издательство медицинской литературы, Ленинград 1963.

U-77 LD₁₆ yra 1720 mg/kg, LD₅₀ - 2890 mg/kg (patikimumo ribos 2094,2 - 3988,2 mg/kg) ir LD₃₄ - 4800 mg/kg.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. N-karbamoilmetil heksametilentetraamonio chloridas, turintis formulę:



2. Junginys pagal 1 punktą, skirtas naudoti kaip antimikrobinis vaistas, ypač prieš bakterijas *Salmonella spp.*, ir *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Junginys pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jo toksiškumas $LD_{50} = 2890 \text{ mg/kg}$.