



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.26.2.013>
УДК 615.281.9:616.24-002.5:547.5



Сечко О.Г.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Противотуберкулезная активность, молекулярный докинг и параметры биодоступности 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]- N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 12.03.2023

Принята: 19.04.2023

Контакты: SechkoOG@bsmu.by

Резюме

Цель. Исследовать противотуберкулезную активность нового синтетического производного бензамида – 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)-фенил]бензамида, выявить мишень для активности в отношении *Mycobacterium tuberculosis* и установить механизм взаимодействия с прогнозируемой мишенью методом молекулярного докинга, *in silico* определить и сравнить физико-химические свойства и фармакокинетические параметры производного бензамида и эффективных противотуберкулезных соединений.

Материалы и методы. Исследование противотуберкулезной активности осуществляли методом пропорций в жидкой питательной среде Миддлбрук 7H9 с использованием BACTEC™ MGIT™ 960 на двух штаммах: лекарственно-чувствительном лабораторном референс-штамме *M. tuberculosis* H37Rv и клиническом штамме с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Для поиска мишени *M. tuberculosis* к производному бензамида использовали сервис SEA Search Service. Молекулярный докинг выполняли в программе UCSF Chimera 1.16 с использованием расширения AutoDock Vina 1.1.2. *In silico* исследование проводили с использованием сервиса SwissADME.

Результаты. Исследуемое соединение в концентрации 100 мкг/мл полностью подавляет рост патогенных лекарственно-чувствительного референс-штамма *M. tuberculosis* H37Rv и клинического штамма *M. tuberculosis* с МЛУ.

Выявлена мишень для активности в отношении *M. tuberculosis* и установлен механизм взаимодействия исследуемого вещества методом молекулярного докинга. Определено, что 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид обладает высокой аффинностью к активному центру фермента еноил-[ацил-переносящий белок]-редуктазы (НАДН) (InhA), образует комплекс, обладающий низким отрицательным значением свободной энергии связывания $\Delta G = -11,9$ ккал/моль. Установлено, что исследуемое соединение образует участки связывания с ферментом InhA, аналогичные изониазиду, поэтому, вероятно, имеет схожий с ним механизм противотуберкулезного действия.

Представлены определенные *in silico* параметры биодоступности производного бензамида и сравнение их с параметрами биодоступности эффективных противотуберкулезных соединений. Ряд параметров биодоступности исследуемого соединения лучше, чем у используемых в настоящее время эффективных соединений. Производное бензамида по своим физико-химическим свойствам соответствует критериям Липински, Вебера, Эгана и Мюге и частично соответствует критериям Гоуза (1 из 3) и так же, как и изониазид, пипразинамид и этамбутол, согласно *in silico* прогнозу, пассивно всасывается в ЖКТ и не связывается с Р-гликопротеином. *In silico* прогноз показал, что молекула исследуемого соединения способна ингибировать четыре из пяти основных изоформ цитохрома P450 – CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A и не способна ингибировать CYP1A2.

Заключение. Результаты молекулярного докинга подтверждают результаты исследования противотуберкулезной активности *in vitro* и позволяют сделать вывод о перспективности 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида для дальнейших исследований.

Ключевые слова: 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид, противотуберкулезная активность, молекулярный докинг, карты биодоступности, карта абсорбции, критерии Липински, Вебера, Эгана, Мюге, Гоуза

Sechko O.
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Antitubercular Activity, Molecular Docking and Bioavailability Parameters of 3-[4-(2-Fluorobenzoyl) Piperazine-1-Carbonyl]-N-[3-(Trifluoromethyl)Phenyl] Benzamide

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 12.03.2023
Accepted: 19.04.2023
Contacts: SechkoOG@bsmu.by

Abstract

Aim. Investigate the anti-tuberculosis activity of a new synthetic benzamide derivative – 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)-phenyl]benzamide, identify the potential for activity against *Mycobacterium tuberculosis* and establish the mechanism of interaction with a predicted target by molecular docking, *in silico* to determine and compare the physicochemical properties and pharmacokinetic parameters of a benzamide derivative and effective anti-tuberculosis compounds.

Materials and methods. The study of anti-tuberculosis activity was carried out by the proportion method in Middlebrook 7H9 liquid nutrient medium using BACTEC™ MGIT™ 960 on two strains: a drug-susceptible laboratory reference strain of *M. tuberculosis* H37Rv and a multidrug-resistant (MDR) clinical strain. The SEA Search Service was used to search

for the target of *M. tuberculosis* to the benzamide derivative. Molecular docking was performed in the UCSF Chimera 1.16 program using the AutoDock Vina 1.1.2 extension. The *in silico* study was carried out using the SwissADME service.

Results. The test compound at a concentration of 100 µg/ml completely inhibits the growth of pathogenic drug-susceptible *M. tuberculosis* reference strain H37Rv and clinical *M. tuberculosis* strain with MDR.

A target for activity against *M. tuberculosis* was identified and the mechanism of interaction of the test substance by molecular docking was established. It has been determined that 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide has a high affinity for the active site of the enzyme enoyl-[acyl-carrying protein]-reductase (NADH) (InhA), since it forms a stable complex with a low negative binding free energy $\Delta G = -11.9$ kcal/mol. It was found that the test compound forms binding sites with the InhA enzyme, similar to isoniazid, therefore, it probably has a similar mechanism of anti-tuberculosis action.

The bioavailability parameters of the benzamide derivative determined *in silico* and compared with those of effective anti-tuberculosis compounds are presented. A number of bioavailability parameters of the test compound are better than currently used effective compounds. The benzamide derivative, in terms of its physicochemical properties, meets the criteria of Lipinski, Veber, Egan and Muegge and partially meets the Ghose criteria (1 out of 3) and, like isoniazid, pyrazinamide and ethambutol, according to *in silico* prognosis, is passively absorbed in the gastrointestinal tract and does not bind with P-glycoprotein. *In silico* prediction showed that the molecule of the studied compound is capable of inhibiting four of the five main isoforms of cytochrome P450 – CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A and is not able to inhibit CYP1A2.

Conclusion. The results of molecular docking confirm the results of the *in vitro* antituberculous activity study and allow us to conclude that 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide is promising for further studies.

Keywords: 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide, anti-tuberculosis activity, molecular docking, bioavailability radar, brain or intestinal estimated permeation method, Lipinski, Veber, Egan criteria, Muegge, Ghose

■ ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез является тяжелым инфекционным заболеванием и глобальной проблемой здравоохранения. Несмотря на положительные результаты борьбы с туберкулезом отмечается рост формирующейся множественной и широкой лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*. В связи с этим растет потребность в поиске новых соединений, обладающих противотуберкулезной активностью [1, 2]. В предыдущих исследованиях нами установлено, что 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид в концентрации 200 мкг/мл полностью подавляет рост штамма *Mycobacterium terrae* 15755 [3, 4], рекомендованного для использования в качестве модельного для определения противотуберкулезной активности [5]. В такой же концентрации

противотуберкулезный препарат I ряда рифампицин подавляет рост штамма *Mycobacterium terrae* 15755 в условиях эксперимента [3].

Вычислительные эксперименты *in silico* могут отталкиваться как от молекулы-мишени – тогда идет поиск способной к взаимодействию с ней химической структуры, так и от соединения – тогда идет поиск молекулярной мишени, с которой сможет вступить во взаимодействие исследуемое вещество [6]. В нашем исследовании осуществляется поиск молекулярной мишени исходя из химической структуры соединения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовать противотуберкулезную активность нового синтетического производного бензамида – 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида. Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- исследовать противотуберкулезную активность 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида в отношении патогенного лекарственно-чувствительного лабораторного референс-штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv;
- исследовать противотуберкулезную активность 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида в отношении патогенного клинического штамма с множественной лекарственной устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis*;
- выявить мишень для активности в отношении *Mycobacterium tuberculosis*;
- установить механизм взаимодействия 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида с прогнозируемой мишенью методом молекулярного докинга;
- *in silico* определить и сравнить ADME (от англ. – всасывание, распределение, метаболизм и экскреция) параметры 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида с ADME параметрами эффективных противотуберкулезных соединений.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – новое синтетическое производное бензамида – 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид (рис. 1), который был синтезирован в Институте биоорганической химии Национальной академии наук Республики Беларусь.

Метод исследования противотуберкулезной активности. Определение чувствительности микобактерий к исследуемому соединению выполняли с помощью модифицированного метода пропорций в жидкой питательной среде Миддлбрук 7H9 с использованием автоматизированной системы BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson, USA). Принцип работы автоматизированной системы заключается в сравнении скорости роста микобактерий в контрольной пробирке и в пробирке с исследуемым соединением [7]. Рост микобактерий вызывает усиление флюоресценции. Флюоресценция становится видимой при облучении пробирки ультрафиолетовым светом и автоматически регистрируется в единицах роста (GU – growth units) фотодатчиками, встроенными в прибор. Значение GU=400 является максимальным

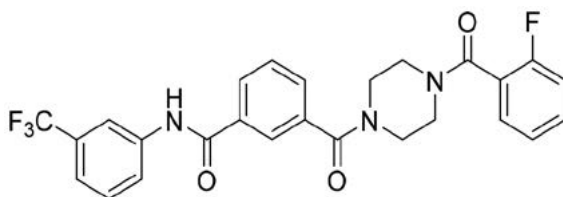


Рис. 1. Химическая структура 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида

Fig. 1. Chemical structure of 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide

и означает активный рост микобактерий, значение GU=0 является минимальным, означает отсутствие роста микобактерий. Пробирки MGIT инкубируются при температуре 37 °C. Степень флюоресценции каждой пробирки регистрируется прибором автоматически каждые 60 минут.

Эксперимент считается завершенным, когда единица роста (GU) в контрольной пробирке достигает своего максимального значения 400 (в течение 4–13 дней). Когда в автоматизированной системе BACTEC™ MGIT™ 960 зафиксировано максимальное значение единицы роста, равное 400 в контрольной пробирке, системой автоматически фиксируются показатели единицы роста в пробирках с исследуемым соединением.

Отбор и подготовка лабораторных штаммов микобактерий туберкулеза для проведения исследования. Из лабораторной коллекции государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии» для проведения исследования было отобрано 2 штамма:

- штамм лекарственно-чувствительных *Mycobacterium tuberculosis* – лабораторный референс-штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv NCTC 7416 (ATCC 9360);
- клинический штамм *Mycobacterium tuberculosis* NRLB-21 с множественной лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным лекарственным препаратам – изониазиду, рифампицину, этамбутолу, пипразинамиду, амикацину, этионамиду, моксифлоксацину, левофлоксацину и чувствительностью к линезолиду, клоfazимину, бедаквилину и деламамиду. Клинический штамм был выделен в 2021 году из мокроты впервые выявленных пациентов до начала проведения им противотуберкулезной терапии.

Приготовление и посев суспензии исследуемых штаммов микобактерий из плотной среды. Добавляли 4 мл бульона Миддлбука 7H9 в стерильную пробирку. Затем собирали стерильной петлей как можно больше колоний микобактерий с плотной питательной среды и переносили в пробирку. Проводили контроль мутности суспензии по стандарту Макфарланда и готовили суспензию микобактерий так, чтобы мутность суспензии соответствовала концентрации микобактерий 10^8 КОЕ/мл.

В пробирку MGIT с 7,0 мл питательной жидкой среды Миддлбрук 7H9, соблюдая правила асептики, добавляли 0,8 мл обогатительной ростовой добавки BACTEC MGIT OADC (олеиновая кислота, альбумин, декстроза и каталаза) и вносили 0,5 мл суспензии микобактерий, с целью получить равную величину КОЕ возбудителя

в одном миллилитре среды (КОЕ/мл, приблизительно 10^5 – 10^6). Затем в пробирку вносили 0,1 мл раствора исследуемого соединения. Каждую пробирку плотно закрывали крышкой и тщательно перемешивали смесь.

Приготовление раствора исследуемого соединения. Для исследования концентрации 200 мкг/мл: исследуемое соединение растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 16,8 мг/мл (исходный раствор), раствор подвергали стерилизующей фильтрации. Требуемую конечную концентрацию (200 мкг/мл) получали при добавлении 0,1 мл исходного раствора в пробирку MGIT со средой, добавкой и суспензией микроорганизмов (конечный объем был равен 8,4 мл).

Для исследования концентрации 100 мкг/мл: исследуемое соединение растворяли в ДМСО в концентрации 8,4 мг/мл (исходный раствор), раствор подвергали стерилизующей фильтрации. Требуемую конечную концентрацию (100 мкг/мл) получали при добавлении 0,1 мл исходного раствора в пробирку MGIT со средой, добавкой и суспензией микроорганизмов (конечный объем был равен 8,4 мл).

Каждую концентрацию и отдельно растворитель (ДМСО) исследовали трижды.

Поиск мишени *Mycobacterium tuberculosis* к лиганду 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамиду. Для поиска мишени *Mycobacterium tuberculosis* к лиганду 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамиду использовали сервис для предсказания мишеней лекарственных средств SEA Search Service [8]. SEA Search Service на основании коэффициента Танимото проверяет химическое сходство молекул с лигандами, действие на мишени которых уже изучено и известно.

Молекулярный докинг. Молекулярный докинг проводили в UCSF Chimera 1.16 с использованием расширения AutoDock Vina 1.1.2. Кристаллическую структуру мишени фермента InhA в комплексе с изониазид-НАДН заимствовали из Банка данных белков (<https://www.rcsb.org>; PDB ID: 4TRO) с разрешением 1,40 Å [9] и с разрешением 2,00 Å, полученных методом рентгеновской дифракции (<https://www.rcsb.org>; PDB ID: 2IDZ) [10]. Подготовку фермента, определение размеров и положения активного центра фермента, визуализацию взаимодействия и связей комплекса белок-лиганд и анализ результатов осуществляли в программе Chimera 1.16 и с помощью сервера ProteinsPlus. В роли лиганда использовали новое синтетическое производное бензамида – 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид. Значение свободной энергии связывания (ккал/моль) лиганда с мишенью рассчитывали с помощью классической оценочной функции AutoDock Vina. Параметры, задаваемые программой для выполнения докинга, были следующие: проведение моделирования в условиях безводной среды, удаление неполярных атомов водорода и игнорирование программой цепей, создаваемых нестандартными остатками аминокислот.

In silico определение ADME параметров. Оптимизация ADME параметров оригинального соединения является наиболее важным и сложным процессом на этапе разработки, влияет на биодоступность препарата и позволяет раскрыть потенциал соединения для последующих этапов исследования. Для in silico определения ADME параметров использовали сервер SwissADME [11]. ADME параметры определяли у 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида и у эффективных противотуберкулезных соединений – изониазида, рифампицина, этамбутола и пипразинамида, которые использовали для выполнения сравнения.

Для того, чтобы предсказать наличие или отсутствие теоретически высокой биодоступности у 3-[4-(2-фторбензил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида при пероральном приеме и спрогнозировать его абсорбцию при пероральном приеме, осуществили прогноз физико-химических свойств, фармакокинетических параметров и проверили исследуемые соединения на соответствие критериям Липински [12], Вебера [13], Эгана [14], Мюге [15] и Гоуза [16]. Если исследуемое соединение соответствует всем критериям, значит оно имеет теоретически высокую биодоступность при пероральном приеме. Данные критерии не могут рассматриваться строго, однако учитывая их, можно предотвратить ряд трудностей на следующих этапах фармацевтической разработки.

Критерии Липински: молекулярная масса не более 500 г/моль; MLOGP не более 5; не более 5 доноров водородной связи (NH и/или OH групп) и не более 10 акцепторов водородной связи (суммарное количество атомов N и O).

Критерии Вебера: количество вращающихся связей ≤ 10 , площадь полярной поверхности ≤ 140 .

Критерии Эгана: WLOGP $\leq 5,88$, площадь полярной поверхности $\leq 131,6$.

Критерии Мюге: $200 \leq$ молекулярная масса ≤ 600 , $-2 \leq$ XLOGP ≤ 5 , площадь полярной поверхности ≤ 150 , количество циклов ≤ 7 , атомов углерода > 4 , количество гетероатомов > 1 , количество вращающихся связей ≤ 15 , акцепторов водородной связи ≤ 10 , доноров водородной связи ≤ 5 .

Критерии Гоуза: $160 \leq$ молекулярная масса ≤ 480 , $-0,4 \leq$ WLOGP $\leq 5,6$, $40 \leq$ молярная рефрактивность ≤ 130 , $20 \leq$ количество атомов ≤ 70 .

Сервер SwissADME прогнозирует способность молекулы связываться с Р-гликопротеином и изоформами цитохрома P450. Р-гликопротеин – АТФ-связывающий транспортный белок семейства ABC, играющий важную роль в регуляции абсорбции, распределения и экскреции ксенобиотиков, защищает центральную нервную систему от действия ксенобиотиков [17]. Изоформы цитохрома P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) участвуют в метаболической биотрансформации лекарственных средств [18]. Молекулярные структуры стандартизировали путем получения формата отображения молекулярных моделей Canonical SMILES для использования методологии «отпечатков пальцев».

На основе шести физико-химических свойств (липофильность (Log P), размер молекулы (молекулярная масса), полярность молекулы (площадь полярной поверхности), растворимость (Log S), гибкость молекулы (количество вращающихся связей) и насыщенность (фракция Csp³)) с помощью сервера SwissADME сгенерировали карты биодоступности для исследуемых нами соединений. Попадание в розовую область карты биодоступности означает наличие у соединения подходящих свойств, обеспечивающих высокую биодоступность при пероральном введении. Подходящими свойствами в данном случае являются Log P от $-0,7$ до $+5,0$, молекулярная масса от 150 до 500 г/моль, площадь полярной поверхности молекулы от 20 до 130 Å², log S от $-6,0$ до 0,0, доля атомов углеродов в sp³-гибридизации не менее 25% и наличие не более 9 вращающихся связей.

На основе двух параметров – липофильность и площадь полярной поверхности – с помощью сервера SwissADME сгенерировали карту абсорбции BOILED-Egg (Brain Or Intestinal EstimateD permeation method – метод оценки проникновения в головной мозг или кишечник) [19], которая графически демонстрирует вероятность

пассивной всасываемости в ЖКТ, вероятность пассивного перехода через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и дополнена сведением о возможности молекулы связываться с Р-гликопротеином.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования противотуберкулезной активности растворителя исследуемого соединения. Во всех экспериментах растворитель диметилсульфоксид (ДМСО) демонстрировал максимальный показатель единицы роста 400 GU (рис. 2, 3). Это свидетельствует о том, что условия проведения эксперимента обеспечивают хороший рост исследуемых микобактерий; растворитель не ингибирует рост лабораторного референс-штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и клинического штамма *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью.

Результаты исследования противотуберкулезной активности 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида на лабораторном референс-штамме *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv NCTC 7416 (ATCC 9360). Показатель единиц роста GU=0 был зафиксирован во всех трех пробирках MGIT, в которые добавляли исследуемое соединение в концентрации 100 мкг/мл (рис. 2).

В каждой из трех пробирок MGIT, в которые добавляли исследуемое соединение в концентрации 200 мкг/мл, показатель единиц роста GU составил 11, что означает

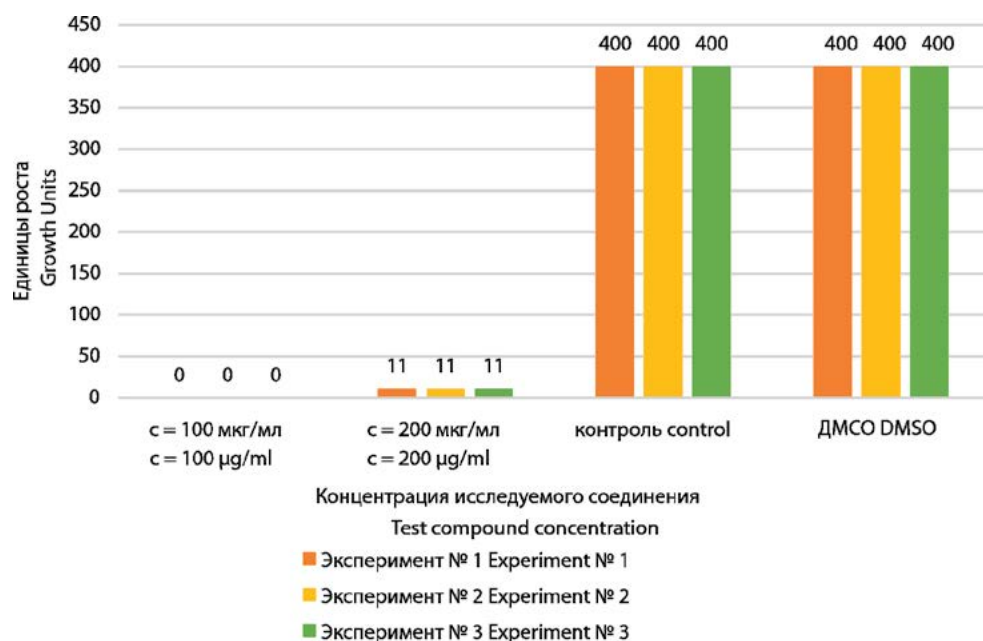


Рис. 2. Противотуберкулезная активность 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида в концентрациях 100 и 200 мкг/мл и растворителя ДМСО в отношении лабораторного референс-штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv NCTC 7416 (ATCC 9360)

Fig. 2. Antitubercular activity of 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide in concentrations 100 and 200 µg/ml and solvent dimethyl sulfoxide against the laboratory reference strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv NCTC 7416 (ATCC 9360)

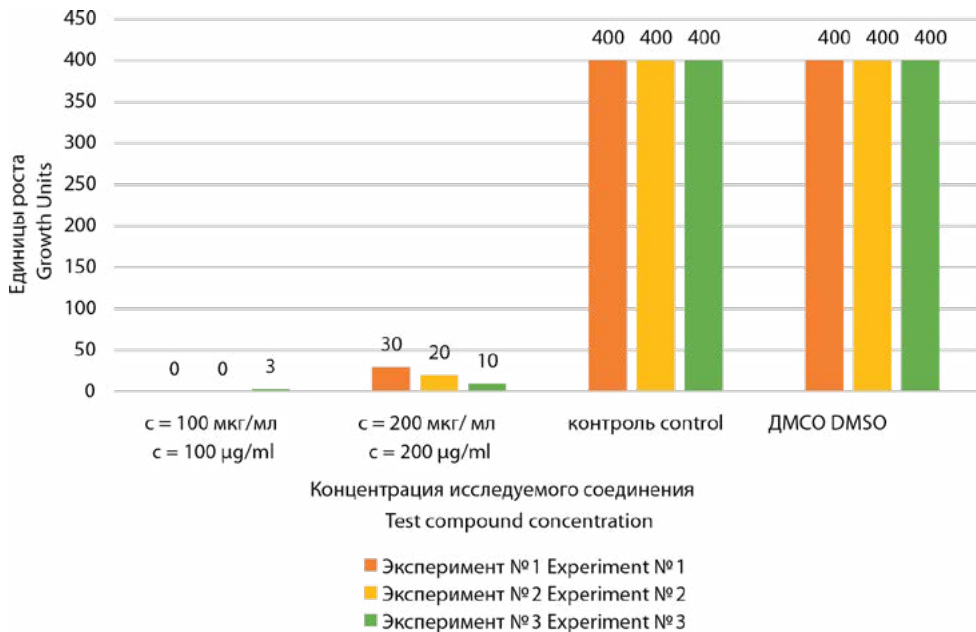


Рис. 3. Противотуберкулезная активность 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида в концентрациях 100 и 200 мкг/мл и растворителя ДМСО в отношении клинического штамма *Mycobacterium tuberculosis* NRLB-21 с множественной лекарственной устойчивостью

Fig. 3. Antitubercular activity of 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide in concentrations of 100 and 200 µg/ml and solvent dimethyl sulfoxide against the clinical multidrug resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* NRLB-21

незначительный рост микобактерий. Поэтому можно утверждать, что исследуемое соединение в концентрации 200 мкг/мл значительно подавляет рост лабораторного референс-штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (рис. 2).

Для концентраций 100 и 200 мкг/мл результаты были зафиксированы в первых пробирках через 9 суток 16 часов, во вторых пробирках – через 9 суток 19 часов, в третьих пробирках – через 10 суток 5 часов.

Результаты исследования противотуберкулезной активности производного бензамида – 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида на клиническом штамме *Mycobacterium tuberculosis* NRLB-21 с множественной лекарственной устойчивостью. В двух пробирках MGIT с исследуемым соединением в концентрации 100 мкг/мл наблюдали отсутствие роста микобактерий, в них показатель единиц роста GU=0. В третьей пробирке MGIT наблюдали почти полное отсутствие роста микобактерий, в ней GU=3. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемое соединение в концентрации 100 мкг/мл полностью подавляет рост клинического штамма *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (рис. 3).

В пробирках MGIT, в которые добавляли исследуемое соединение в концентрации 200 мкг/мл, наблюдали следующий рост клинического штамма *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью: в первой пробирке

GU=30, во второй пробирке GU=20, в третьей пробирке GU=10. Такие значения GU свидетельствуют о незначительном росте микобактерий, поэтому можно утверждать, что исследуемое соединение в концентрации 200 мкг/мл значительно подавляет рост клинического штамма *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (рис. 3).

Для концентраций 100 и 200 мкг/мл результаты были получены в первых пробирках – через 11 суток, во вторых пробирках – через 11 суток 3 часа, в третьих пробирках – через 11 суток 12 часов.

Результаты поиска мишени *Mycobacterium tuberculosis* к лиганду 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамиду. На основании коэффициента Танимото установлено, что таргетным ферментом является фермент *Mycobacterium tuberculosis* еноил-[ацил-переносащий белок]-редуктаза (НАДН), или его другое обозначение InhA (рис. 4).

Значение коэффициента Танимото для лиганда 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида составляет 0,43 (указан в последнем столбце на рис. 5).

Фермент InhA катализирует НАДН-зависимое восстановление двойной связи белка-носителя 2-транс-еноил-ацила в одном из этапов работы системы FAS II (рис. 6).

Система FAS II участвует в биосинтезе предшественников миколовых кислот – меромиколатов клеточной стенки *Mycobacterium tuberculosis*. Механизм действия противотуберкулезного препарата I ряда изониазида заключается в связывании активной формы изониазида, которая представляет собой комплекс изониазид-НАДН (рис. 7), с ферментом InhA, что приводит к нарушению синтеза клеточной стенки микобактерий.

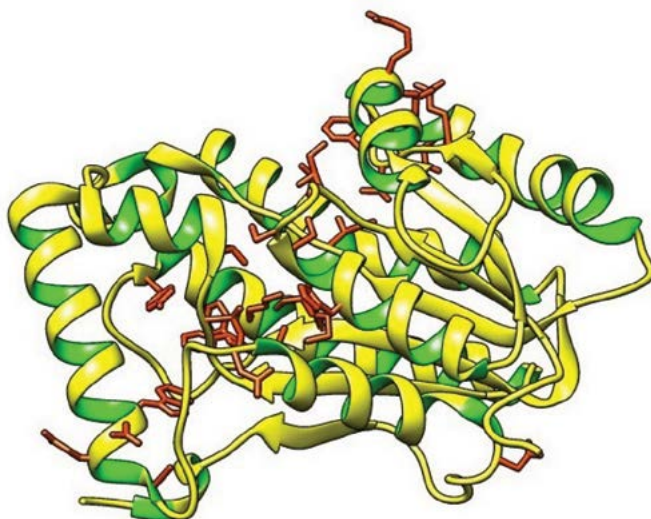


Рис. 4. Кристаллическая структура еноил-[ацил-переносащий белок]-редуктазы (НАДН) (InhA) (из Protein Data Bank, PDB ID: 4TRO)

Fig. 4. Crystal structure of enoyl-[acyl-carrier protein]-reductase (NADH) (InhA) (from Protein Data Bank, PDB ID: 4TRO)



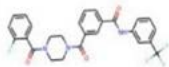
Query	Target Key	Target Name	Description	P-Value	MaxTC
 compound_1	RXFP1_HUMAN	RXFP1	Relaxin receptor 1	3.135e-213	0.58
	KCNK9_HUMAN	KCNK9	Potassium channel subfamily K member 9	5.842e-153	0.50
	TRPV4_HUMAN	TRPV4	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4	2.23e-124	0.43
	BRAF_HUMAN	BRAF	Serine/threonine-protein kinase B-raf	3.102e-88	0.44
	A1Z199_HUMAN	BCR/ABL fusion	BCR/ABL p210 fusion protein	1.472e-85	0.35
	APOB_HUMAN	APOB	Apolipoprotein B-100	3.032e-77	0.36
	RHOA_HUMAN	RHOA	Transforming protein RhoA	2.453e-67	0.37
	MTP_HUMAN	MTP	Microsomal triglyceride transfer protein large subunit	5.88e-67	0.34
	FGR_MOUSE	Fgr	Tyrosine-protein kinase Fgr	1.602e-30	0.30
	INH4_MYCTU	InhA	Enoyl-facyl-carrier-protein reductase [NADH]	2.595e-30	0.43

Рис. 5. Скриншот сервиса SEA Search Service с выявленной мишенью *Mycobacterium tuberculosis* для лиганда 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида
Fig. 5. Screenshot of the SEA Search Service showing the target of *Mycobacterium tuberculosis* for the ligand 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide

Система FAS II у *Mycobacterium tuberculosis* значительно отличается от системы FAS II у млекопитающих, поэтому фермент InhA является перспективной мишенью для разработки новых противотуберкулезных препаратов [20–23].

Результаты молекулярного докинга. Исследование модели комплекса 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид-InhA (рис. 8A) показывает, что исследуемое соединение связывается с активным центром фермента и образует большое количество межмолекулярных взаимодействий,

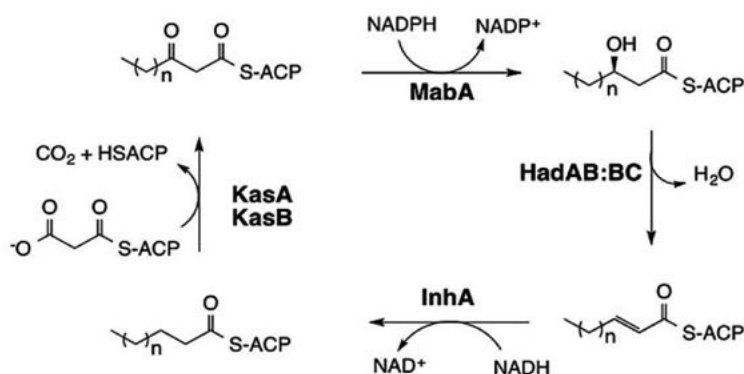


Рис. 6. Схематическое представление работы системы FAS II
Fig. 6. Schematic representation of the operation of the FAS II system

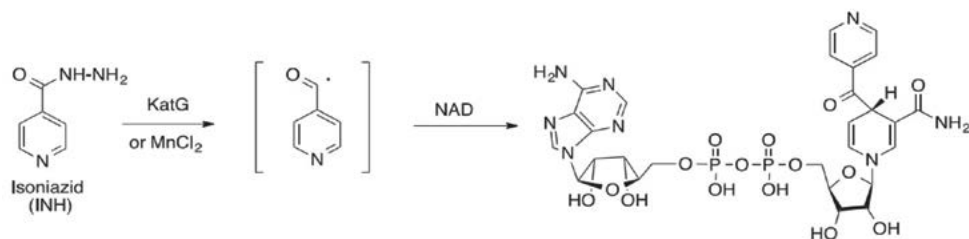


Рис. 7. Механизм образования комплекса изониазид-НАДН
Fig. 7. The mechanism of formation of the Isoniazid-NADH complex

включающих водородные связи, гидрофобные взаимодействия, π - π -стэкинг и ван-дер-ваальсовы контакты. На рис. 8В видно, в каком положении молекула 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид связывается с InhA по сравнению с изониазид-НАДН.

Эффективность межмолекулярных взаимодействий 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида с мишенью InhA подтверждает низкое отрицательное значение свободной энергии связывания $\Delta G = -11,9$ ккал/моль, свидетельствующее о высоком химическом родстве исследуемого соединения к мишени InhA. Доминирующую роль в образовании комплекса

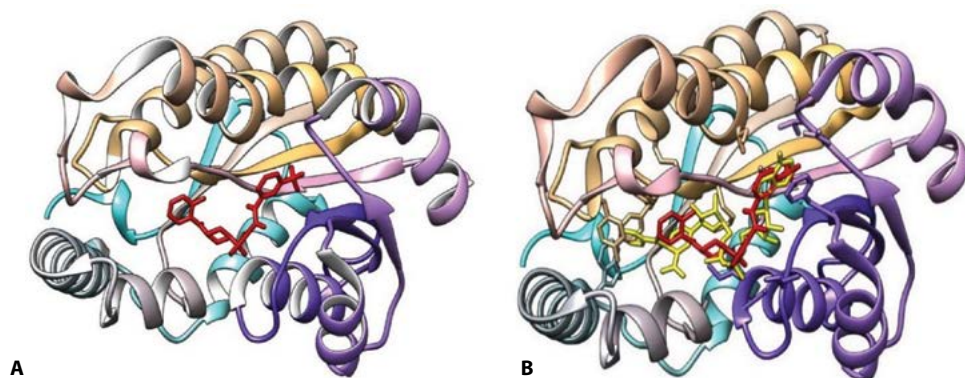


Рис. 8. 3D-структуры комплексов (PDB ID: 4TRO), построенные в Chimera 1.16: А – 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид с ферментом InhA; В – 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид и сокристаллизованный изониазид-НАДН с ферментом InhA. 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид красного цвета, комплекс изониазид-НАДН – желтого цвета
Fig. 8. 3D structures of complexes: А – 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide with InhA enzyme; В – 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide and Isoniazid-NADH co-crystallized with InhA enzyme. 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide red, isoniazid-NADH complex yellow

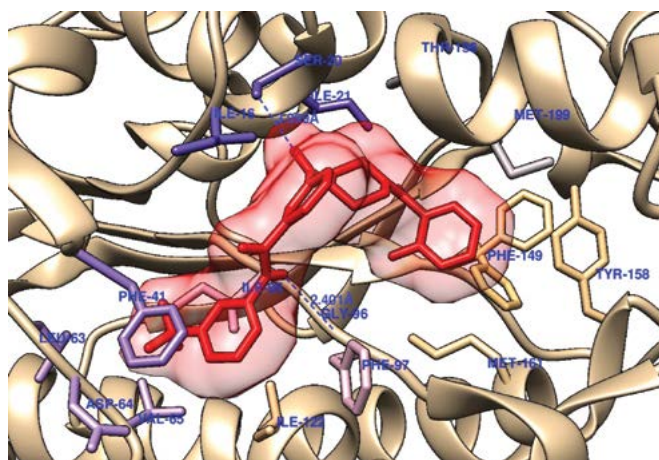


Рис. 9. 3D-модель взаимодействия 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида с ферментом InhA (PDB ID: 4TRO), построенная в Chimera 1.16. Синяя пунктирная линия – водородная связь

Fig. 9. 3D-model of the interaction of 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide with the InhA enzyme. Blue dotted line – hydrogen bond

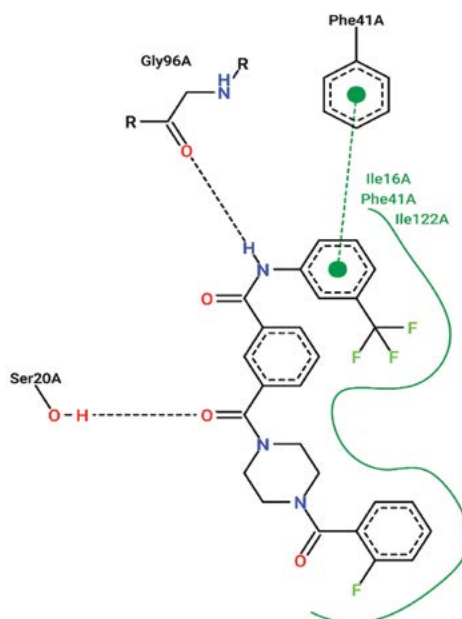


Рис. 10. 2D-модель взаимодействия комплекса 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида с ферментом InhA (PDB ID: 4TRO), построенная с помощью сервера ProteinsPlus. Черная пунктирная линия – водородная связь, зеленая пунктирная линия – π - π -стэкинг, зеленая волнистая линия – гидрофобные взаимодействия

Fig. 10. 2D-model of the interaction of 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide with the InhA enzyme. Black dotted line – hydrogen bond, green dotted line – π - π stacking, green wavy line – hydrophobic interactions

Таблица 1
Связи и межмолекулярные взаимодействия, реализующиеся в комплексе 3-[4-(2-фторбензоил) пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида с ферментом InhA
Table 1
Bonds and intermolecular interactions in the complex of 3-[4-(2-fluorobenzoyl)piperazine-1-carbonyl]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide with the InhA enzyme

Водородные связи	
Водородная связь (донор...акцептор)	Расстояние, Å
N1H1...Gly-96	2,401
Ser-20...O ₂	3,099
Гидрофобные взаимодействия	
Ile-16, Phe-41, Ile-122	
π-π-стэкинг	
C6H4CF3-Phe-41	
Ван-дер-ваальсовы взаимодействия*	
Ile-16 (6), Ile-21 (3), Ile-95 (5), Ile-122 (6), Val-65 (4), Gly-96 (2), Met-161 (3), Met-199 (1), Phe-41 (13), Phe-97 (1), Phe-149 (2), Ser-20 (2), Tyr-158 (1), Asp-64 (1), Thr-196 (1), Leu-63 (1)	

Примечание: * аминокислотные остатки фермента InhA, формирующие ван-дер-ваальсовы контакты с исследуемым соединением, в скобках указано число взаимодействий.

лиганд-InhA играют связи и межмолекулярные взаимодействия, представленные на рис. 9, 10 и в табл. 1.

Исследование модели комплекса изониазид-НАДН-InhA показывает, что доминирующую роль в образовании комплекса играют 11 водородных связей – с аминокислотами Asp-64, Val-65, Ile-95, Lys-165, Ile-194, Ile-21, Thr-196, Ser-20, Gly-14 фермента,

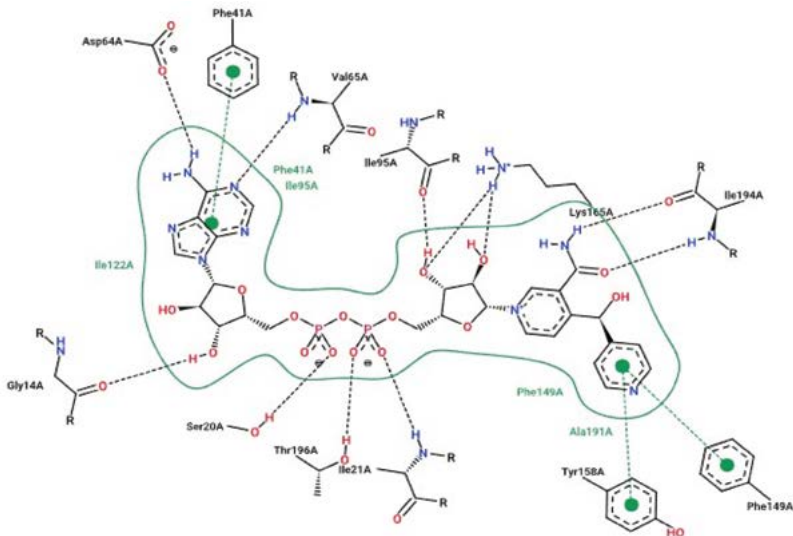


Рис. 11. 2D-модель взаимодействия комплекса изониазид-НАДН с ферментом InhA (PDB ID: 2IDZ), построенная с помощью сервера ProteinsPlus. Черная пунктирная линия – водородная связь, зеленая пунктирная линия – π-π-стэкинг, зеленая волнистая линия – гидрофобные взаимодействия
Fig. 11. 2D-model of the interaction of the isoniazid-NADH complex with the InhA enzyme. Black dotted line – hydrogen bond, green dotted line – π-π stacking, green wavy line – hydrophobic interactions



гидрофобные взаимодействия с аминокислотами Ile-122, Phe-41, Ile-95, Ala-191, Phe-149 и 3 нековалентных взаимодействия π - π -стэкинги между бензольным кольцом исследуемого соединения и бензольным кольцом аминокислот Phe-41, Phe-149 и Tyr-158 (рис. 11).

3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид и изониазид-НАДН образуют схожие участки связывания с ферментом – водородную связь с аминокислотой Ser-20, гидрофобные взаимодействия с аминокислотами Ile-122 и Phe-41 и π - π -стэкинг с аминокислотой Phe-41, поэтому вероятно, что 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид имеет схожий с изониазидом механизм противотуберкулезного действия.

Результаты *in silico* определения физико-химических свойств и фармакокинетических параметров

Физико-химические параметры (табл. 2) исследуемого соединения 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида и эффективных противотуберкулезных соединений анализировали по критериям Липински и получили следующие результаты:

- все соединения, кроме рифампицина, имеют молекулярную массу меньше 500 г/моль;
- Log P у всех соединений меньше 5;
- количество акцепторов водородных связей не превышает 10 у всех соединений, кроме рифампицина;
- количество доноров водородных связей не превышает 5 у всех соединений, кроме рифампицина.

Таким образом, исследуемое соединение соответствует всем критериям Липински, как и изониазид, этамбутол и пиразинамид, а рифампицин соответствует только по значению Log P.

В ходе анализа по критериям Вебера установлено, что у всех соединений, кроме рифампицина, площадь полярной поверхности не превышает $140 \text{ \AA}^2$ и у всех соединений количество вращающихся связей меньше 10. Таким образом, исследуемое соединение соответствует всем критериям Вебера, как и изониазид, этамбутол и пиразинамид, а рифампицин соответствует только по количеству вращающихся связей.

В ходе анализа по критериям Эгана установлено, что у всех соединений Log P $\leq 5,88$ и площадь полярной поверхности у всех соединений, кроме рифампицина, $\leq 131,6 \text{ \AA}^2$. Таким образом, исследуемое соединение соответствует всем критериям Эгана, как и изониазид, этамбутол и пиразинамид, а рифампицин соответствует только по значению Log P.

В ходе анализа по критериям Мюге получили следующие результаты:

- исследуемое соединение и этамбутол попадают в диапазон значения молярной массы от 200 до 600 г/моль, у изониазида и пиразинамида молярная масса меньше, а у рифампицина больше;
- Log P у всех соединений находится в диапазоне от -2 до $+5$;
- площадь полярной поверхности у всех соединений, кроме рифампицина, $\leq 150 \text{ \AA}^2$;
- количество ароматических колец у всех соединений меньше 7;
- количество атомов углерода у всех соединений больше 4;
- количество гетероатомов у всех соединений больше 1;

Таблица 2

ADME параметры исследуемого соединения и эффективных противотуберкулезных соединений

Table 2

ADME parameters of test compound and effective antituberculous compounds

Соединение	Физико-химические свойства									
	Молекулярная масса, г/моль	Количество атомов, отличных от водорода	Фракция Csp3	Количество вращающихся связей	Число акцепторов водородных связей	Число доноров водородных связей	Log P	Log S	Молекулярная рефракция	Площадь полярной поверхности (Å²)
Иссл. соедин-е C ₂₆ H ₂₁ F ₄ N ₃ O ₃	499,46	36	0,19	8	7	1	4,27	−5,38	131,46	69,7
Изониазид C ₆ H ₇ N ₃ O	137,14	10	0,00	2	3	2	−0,35	−0,56	35,13	68,0
Рифампицин C ₄₃ H ₅₈ N ₄ O ₁₂	822,9	59	0,53	5	14	6	2,23	−7,55	230,18	216,7
Этамбутол C ₁₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	204,31	14	1,00	9	4	4	0,60	−0,46	58,11	64,5
Пиразинамид C ₅ H ₅ N ₃ O	123,11	9	0,00	1	3	1	−0,37	−0,65	30,13	68,9
Фармакокинетические параметры										
	Всасываемость в ЖКТ	Переход через ГЭБ	Субстрат Р-гликопротеина	Изоформы цитохрома Р450						
				Ингибитор CYP1A2	Ингибитор CYP2C19	Ингибитор CYP2C9	Ингибитор CYP2D6	Ингибитор CYP3A4		
Иссл. соедин-е	высокая	нет	нет	нет	да	да	да	да		
Изониазид	высокая	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет		
Рифампицин	высокая	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет		
Этамбутол	высокая	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет		
Пиразинамид	высокая	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет		



Окончание таблицы 2

Свойства «подобия лекарства»					
	Критерии Липински	Критерии Вебера	Критерии Эгана	Критерии Мюеге	Критерии Гоуза
Иssl. соедин-е	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	не соответствует
Изониазид	соответствует	соответствует	соответствует	не соответствует	не соответствует
Рифампицин	не соответствует	не соответствует	не соответствует	не соответствует	не соответствует
Этамбутол	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Пиразинамид	соответствует	соответствует	соответствует	не соответствует	не соответствует

- количество вращающихся связей у всех соединений меньше 15;
- число акцепторов водородных связей у всех соединений, кроме рифампицина, меньше 10, у рифампицина 14;
- число доноров водородных связей у всех соединений, кроме рифампицина, меньше 5, у рифампицина 6.

Таким образом, исследуемое соединение и этамбутол соответствуют всем критериям Мюеге, а изониазид, рифампицин и пиразинамид частично соответствуют критериям Мюеге – изониазид соответствует по значению Log P, площади полярной поверхности, количеству ароматических колец, количеству атомов углерода, количеству гетероатомов, количеству вращающихся связей, числу акцепторов водородных связей, числу доноров водородных связей, рифампицин соответствует по значению Log P, количеству ароматических колец, количеству атомов углерода, количеству гетероатомов, количеству вращающихся связей, пиразинамид соответствует по значению Log P, площади полярной поверхности, количеству ароматических колец, количеству атомов углерода, количеству гетероатомов, количеству вращающихся связей, числу акцепторов водородных связей и числу доноров водородных связей.

В ходе анализа по критериям Гоуза получили следующие результаты:

- этамбутол попадает в диапазон значения молярной массы от 160 до 480 г/моль, а остальные соединения нет;
- Log P у всех соединений находится в диапазоне от –0,4 до +5,6;
- молекулярная рефракция только у этамбутола находится в диапазоне от 40 до 130.

Таким образом, только этамбутол соответствует всем критериям Гоуза, остальные соединения соответствуют только по значению Log P.

На основе шести физико-химических свойств (липофильность (Log P), размер молекулы (молекулярная масса), полярность молекулы (площадь полярной поверхности), растворимость (Log S), гибкость молекулы (количество вращающихся связей)

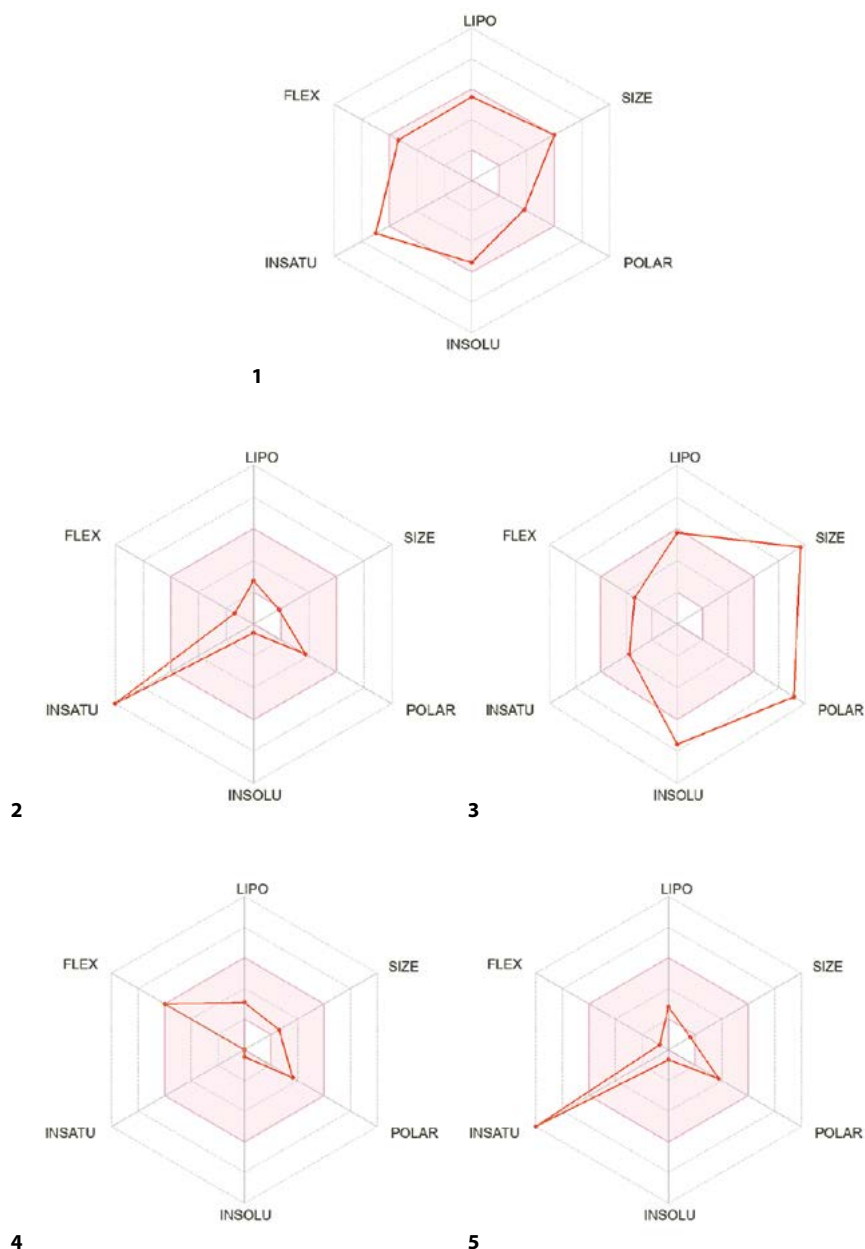


Рис. 12. Карты биодоступности производного бензамида и эффективных противотуберкулезных соединений. LIPO – липофильность, SIZE – размер молекулы, POLAR – полярность, INSOLU – нерастворимость, INSATU – насыщенность, FLEX – гибкость. 1 – производное бензамида; 2 – изониазид; 3 – рифампицин; 4 – этамбутол; 5 – пиразинамид

Fig. 12. Bioavailability maps of benzamide derivative and effective anti-tuberculosis compounds. LIPO – lipophilicity, SIZE – molecular size, POLAR – polarity, INSOLU – insolubility, INSATU – saturation, FLEX – flexibility. 1 – benzamide derivative; 2 – isoniazid; 3 – rifampicin; 4 – ethambutol; 5 – pyrazinamide



и насыщенность (фракция C_{sp^3}) сервер SwissADME сгенерировал карты биодоступности для исследуемых нами соединений (рис. 12).

Попадание в розовую область (рис. 12) означает наличие у соединения подходящих свойств, обеспечивающих высокую биодоступность при пероральном введении.

На рис. 12 видно, что 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид имеет подходящие свойства, гарантирующие высокую биодоступность при пероральном введении, и лишь по параметру «насыщенность» есть небольшое отклонение от заданной нормы, так как доля атомов углеродов в sp^3 -гибридизации составляет 19% (табл. 2), что меньше требуемых 25%. Изониазид и пиразинамид (рис. 12), аналогично исследуемому нами соединению, имеют отклонение по одному такому же параметру «насыщенность», потому что в молекуле изониазида и пиразинамида атомы углерода в sp^3 -гибридизации вообще отсутствуют (табл. 2). Рифампицин (рис. 12) по половине параметров – липофильность, гибкость молекулы и насыщенность молекулы – попал в розовую зону, а по оставшейся половине параметров есть отклонения – молекулярная масса

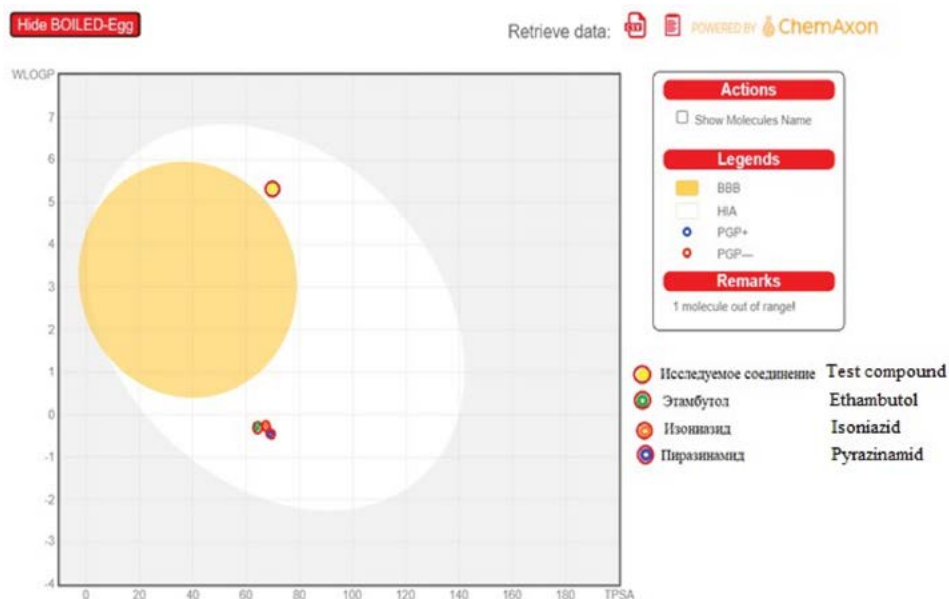


Рис. 13. Карта абсорбции исследуемого соединения и эффективных противотуберкулезных соединений: BBB – пассивное проникновение молекулы через ГЭБ; HIA – пассивное всасывание молекулы в ЖКТ; PGP+ – молекула связывается с р-гликопротеином; PGP– – молекула не связывается с р-гликопротеином; TPSA – площадь полярной поверхности; WLOGP – LogРоктанол/вода

Fig. 13. Absorption map of test compound and effective antituberculous compounds: BBB – passive penetration of the molecule through the BBB; HIA – passive absorption of the molecule in the gastrointestinal tract; PGP+ – the molecule binds to p-glycoprotein; PGP– – molecule does not bind to p-glycoprotein; TPSA – polar surface area; WLOGP – LogP octanol/water

составляет 822,9 г/моль, что не входит в диапазон от 150 до 500 г/моль, площадь полярной поверхности молекулы составляет 216,7 Å², что не входит в диапазон от 20 до 130 Å², и Log S составляет –7,55, что меньше –6 (табл. 2).

На основе двух параметров – липофильность и площадь полярной поверхности (табл. 2) – сервер SwissADME сгенерировал карту абсорбции BOILED-Egg, которая графически демонстрирует вероятность пассивной всасываемости в ЖКТ, вероятность пассивного перехода через ГЭБ и дополнена сведением о возможности молекулы связываться с Р-гликопротеином (рис. 13).

На рис. 13 видно, что молекула 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид, так же как и молекулы изониазида, этамбутола и пипразинамида, пассивно всасывается в ЖКТ и не связывается с Р-гликопротеином.

Молекула 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид согласно результатам *in silico* прогноза способна ингибировать четыре из пяти основных изоформ фермента цитохрома P450 – CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A и не способна ингибировать CYP1A2 (табл. 2). Ингибирование изоформ фермента цитохрома P450 может приводить к нежелательным реакциям из-за изменения клиренса и накопления молекулы или ее метаболита в организме. Изониазид, пипразинамид, этамбутол и рифампицин не ингибируют пять вышеназванных изоформ цитохрома P450.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид в концентрации 100 мкг/мл полностью подавляет рост лабораторного референс-штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и клинического штамма *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью. При этом во всех экспериментах контроль и растворитель (ДМСО) демонстрировали максимальный показатель единицы роста 400 GU, что свидетельствует о том, что условия проведения эксперимента обеспечивали хороший рост исследуемых бактерий и ДМСО не ингибировал рост микобактерий.

3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид обладает высокой аффинностью к активному центру фермента еноил-[ацил-переносающий белок]-редуктазы (НАДН), образует комплекс, обладающий низким отрицательным значением свободной энергии связывания $\Delta G = -11,9$ ккал/моль, что свидетельствует о высокой энергии сродства к мишени. Установлено, что исследуемое соединение и изониазид-НАДН образуют схожие участки связывания с ферментом – водородную связь с аминокислотой Ser-20, гидрофобные взаимодействия с аминокислотами Ile-122 и Phe-41 и π - π -стэкинг с аминокислотой Phe-41, поэтому вероятно, что 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид имеет схожий с изониазидом механизм противотуберкулезного действия, заключающийся в ингибировании фермента InhA.

Результаты молекулярного докинга подтверждают результаты исследования противотуберкулезной активности *in vitro*, что позволяет сделать вывод о том, что 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид является перспективным соединением для проведения дальнейших исследований.

In silico анализ молекулы 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида, основанный на 6 физико-химических свойствах



(липофильность, размер молекулы, полярность молекулы, растворимость, гибкость молекулы и насыщенность), показал, что производное бензамида имеет подходящие свойства, гарантирующие высокую биодоступность при пероральном введении, и лишь по параметру «насыщенность» есть небольшое отклонение от заданной нормы.

Молекула 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамида согласно *in silico* прогнозу способна ингибировать четыре из пяти основных изоформ фермента цитохрома P450 – CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A и не способна ингибировать CYP1A2. Ингибирование изоформ цитохрома P450 может приводить к нежелательным реакциям из-за изменения клиренса молекулы и накопления молекулы или ее метаболита в организме.

Ряд параметров биодоступности исследуемого соединения лучше, чем у эффективных противотуберкулезных соединений. 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид по своим физико-химическим свойствам соответствует критериям Липински, Вебера, Эгана и Муге и частично соответствует критериям Гоуза (1 из 3) и так же, как и изониазид, пиразинамид и этамбутол, согласно *in silico* прогнозу, пассивно всасывается в ЖКТ и не связывается с Р-гликопротеином. Рифампицин частично соответствует всем вышеперечисленным критериям (Липински – соответствует 1 из 4, Вебера – 1 из 2, Эгана – 1 из 2, Муге – 5 из 9), этамбутол, наоборот, соответствует всем критериям. Пиразинамид соответствует критериям Липински, Вебера и Эгана и частично соответствует критериям Муге (8 из 9) и Гоуза (1 из 3), что свидетельствует о том, что данные критерии не могут рассматриваться строго, однако учитывая их, можно предотвратить ряд трудностей на следующих этапах фармацевтической разработки.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. WHO 2022 Global TB Report. Available at: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022> (accessed 5 January 2023).
2. O'Neill J. *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. Review on Antimicrobial Resistance. Wellcome Trust and HM Government.* 2016. Available at: https://amrreview.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf (accessed 6 January 2023).
3. Sechko O., Slabko I., Tsarenkov V. Antitubercular activity of benzamide and benzoic acid derivatives. *BSMU is at the forefront of medical science and practice.* 2021;11:540–546.
4. Sechko O., Tsarenkov V., Kalinichenko E., Bojok T. Screening studies of the antimicrobial activity of new synthetic benzamide conjugates against *Mycobacterium terrae* and some other pathogens. *News of pharmacy.* 2022;3(97):81–92. doi: 10.52540/2074-9457.2022.3.81
5. Griffiths P.A., Babb J.R., Fraise A.P. *Mycobacterium terrae*: a potential surrogate for *Mycobacterium tuberculosis* in a standard disinfectant test. *The Journal of hosp infect.* 1998;38(3):183–192. doi: 10.1016/s0195-6701(98)90273-0
6. From *in vivo* and *in vitro* studies to *in silico* methodology. *News of Education and Science Development of the Russian Academy of Natural Sciences.* 2016;2:91–96.
7. Siddiqi S.H., Rüsch-Gerdes S. *MGIT™ procedure manual for BACTEC™ MGIT 960™ TB System.* Geneva, Switzerland, Foundation for innovative new diagnostics, 2006. Available at: https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2023/02/20061101_rep_mgit_manual_FV_EN.pdf (accessed 12 February 2021).
8. SEA Search Service. Available at: <https://sea.bkslab.org>. (accessed 5 October 2022).
9. Chollet A. Crystal structure of the enoyl-ACP reductase of *Mycobacterium tuberculosis* (InhA) in the apo-form and in complex with the active metabolite of isoniazid pre-formed by a biomimetic approach. *Journal of structural biology.* 2015;190(3):328–337.
10. Dias M.V.B. Crystallographic studies on the binding of isonicotinyl-NAD adduct to wild-type and isoniazid resistant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of structural biology.* 2007;159(3):369–380.
11. Daina A., Michielin O., Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports.* 2017;7(1):42717. doi: 10.1038/srep42717
12. Lipinski C. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews.* 2012;64:4–17. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.019
13. Veber D.F. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of med chem.* 2002;45(12):2615–2623. doi: 10.1021/jm020017n

14. Egan W.J., Merz K.M., Jr, Baldwin J.J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *Journal of med chem.* 2000;43(21):3867–3877. doi: 10.1021/jm000292e
15. Muegge I., Heald S. L., Brittelli D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *Journal of med chem.* 2001;44(12):1841–1846. doi: <https://doi.org/10.1021/jm015507e>
16. Ghose A.K., Viswanadhan V.N., Wendoloski J.J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of combinat chem.* 1999;1(1):55–68. doi: <https://doi.org/10.1021/cc9800071>
17. Szakács G. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug discov today.* 2008;13(9–10):379–393.
18. Krämer S.D., Testa B. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 6. Inter-individual factors affecting drug metabolism. *Chemistry & biodiversity.* 2008;5(12):2465–2578. doi: 10.1002/cbdv.200890214
19. Daina A., Zoete V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *Chem Med Chem.* 2016;11(11):1117–1121. doi: <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>
20. Lei B., Wei C.J., Tu S.C. Action mechanism of antitubercular isoniazid: activation by Mycobacterium tuberculosis KatG, isolation, and characterization of InhA inhibitor. *Journal of Biolog Chem.* 2000;275(4):2520–2526. doi: 10.1074/jbc.275.4.2520
21. Marrakchi H., Lanéelle G., Quémar A. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology.* 2000;146(2):289–296. doi: <https://doi.org/10.1099/00221287-146-2-289>
22. Rotta M. Piperazine derivatives: Synthesis, inhibition of the Mycobacterium tuberculosis enoyl-acyl carrier protein reductase and SAR studies. *Europ Journ of Med Chem.* 2015;90:436–447. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.034>
23. Takayama K., Cindy W., Gurdylal S.B. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. *Clin microbial rev.* 2005;18(1):81–101. doi: 10.1128/CMR.18.1.81-101.2005