



(51) МПК
C07D 513/04 (2006.01)
A61K 31/5415 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07D 513/04 (2021.01); A61K 31/5415 (2021.01); A61P 31/04 (2021.01)

(21)(22) Заявка: 2019111873, 21.09.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 21.09.2017

Дата регистрации:
 29.07.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 22.09.2016 EP 16190199.6

(43) Дата публикации заявки: 22.10.2020 Бюл. № 30

(45) Опубликовано: 29.07.2021 Бюл. № 22

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 22.04.2019

(86) Заявка РСТ:
 EP 2017/073935 (21.09.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2018/055048 (29.03.2018)

Адрес для переписки:
 129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
 "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

КЛОСС, Флориан (DE),
 ШИФЕРДЕККЕР, Себастьян (DE),
 БРАКХАГЕ, Аксель (DE),
 ДРАЙСБАХ, Юлия (DE),
 МИЛЛЕР, Марвин Дж. (US),
 МЁЛЛЬМАНН, Уте (DE),
 ВОЙТАС, Камиль Филип (DE)

(73) Патентообладатель(и):

ЛЯЙБНИЦ-ИНСТИТУТ ФЮР
 НАТУРШТОФФ-ФОРШУНГ УНД
 ИНФЕКЦИОНСБИОЛОГИ Е.Ф.
 ХАНС-КНЁЛЛЬ ИНСТИТУТ (ХКИ) (DE),
 КЛИНИКУМ ДЕР УНИВЕРЗИТЕТ
 МЮНХЕН (DE),
 ЮНИВЕРСИТИ ОФ НОТР ДАМ ДЮ
 ЛАК (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: WO 2007134625 A1, 29.11.2007. DE
 102014012546 A1, 31.03.2016. V. MAKAROV ET
 AL, "Towards a new combination therapy for
 tuberculosis with next generation
 benzothiazinones", EMBO MOLECULAR
 MEDICINE, Vol. 6, No. 3, 2014, page 372-383.
 TOMISLAV KAROLI ET AL, "Identification of
 Antitubercular Benzothiazinone Compounds by
 Ligand-Based Design", JOURNAL (см. прод.)

(54) НОВЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
 ИНФЕКЦИЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И НОВЫЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к соединению,
 выбранному из (S)-7-Метил-2-(2-метил-1,4-диокса-
 8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-
 (трифторметил)-4Н-1,3-бензотиазин-4-она, (S)-5-
 Метил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]
 декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4Н-1,3-
 бензотиазин-4-она и 2-(4-(Циклогексилметил)
 пиперазин-1-ил)-5-метил-8-нитро-6-

(трифторметил)-4Н-1,3-бензотиазин-4-она,
 обладающим активностью против штаммов
 Mycobacterium tuberculosis H37Rv и (PDR) 12700,
 M. Marinum, M. Vaccae 10670, фармацевтической
 композиции на их основе и их применению для
 терапевтического или профилактического лечения
 микобактериальной инфекции у млекопитающих.
 3 н. и 1 з.п. ф-лы, 4 ил, 1 табл., 17 пр.

(56) (продолжение):

OF MEDICINAL CHEMISTRY, Vol. 55, No. 17, 2012, page 7940-7944. GAO CHAO ET AL, "Synthesis and structure-activity relationships evaluation of benzothiazinone derivatives as potential anti-tubercular ag", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, Vol. 23, No. 17, page 4919-4922. WO 2012066518 A1, 24.05.2012. EP 2719691 A1, 16.04.2014. RU 2395508 C1, 27.07.2010.

R U 2 7 5 2 5 6 8 C 2

R U 2 7 5 2 5 6 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07D 513/04 (2006.01)
A61K 31/5415 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07D 513/04 (2021.01); A61K 31/5415 (2021.01); A61P 31/04 (2021.01)(21)(22) Application: **2019111873, 21.09.2017**(24) Effective date for property rights:
21.09.2017Registration date:
29.07.2021

Priority:

(30) Convention priority:
22.09.2016 EP 16190199.6(43) Application published: **22.10.2020 Bull. № 30**(45) Date of publication: **29.07.2021 Bull. № 22**(85) Commencement of national phase: **22.04.2019**(86) PCT application:
EP 2017/073935 (21.09.2017)(87) PCT publication:
WO 2018/055048 (29.03.2018)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**KLOSS, Florian (DE),
SCHIEFERDECKER, Sebastian (DE),
BRAKHAGE, Axel (DE),
DREISBACH, Julia (DE),
MILLER, Marvin J. (US),
MOELLMANN, Ute (DE),
WOJTAS, Kamil Philip (DE)**

(73) Proprietor(s):

**LEIBNIZ-INSTITUT FUER
NATURSTOFF-FORSCHUNG UND
INFEKTIONS BIOLOGIE E.V.
HANS-KNOELL INSTITUT (HKI) (DE),
KLINIKUM DER UNIVERSITAET
MUENCHEN (DE),
UNIVERSITY OF NOTRE DAME DU LAC
(US)****(54) NEW ANTIMICROBIAL COMPOUNDS, THEIR USE FOR TREATMENT OF MAMMALIAN INFECTIONS AND NEW METABOLIC MECHANISM**

(57) Abstract:

FIELD: veterinary medicine.

SUBSTANCE: invention relates to a compound selected from (S)-7-Methyl-2-(2-methyl-1,4-dioxo-8-azaspiro[4.5]decane-8-yl)-8-nitro-6-(trifluoromethyl)-4H-1,3-benzothiazine-4-one, (S)-5-Methyl-2-(2-methyl-1,4-dioxo-8-azaspiro[4.5]decane-8-yl)-8-nitro-6-(trifluoromethyl)-4H-1,3-benzothiazine-4-one and 2-(4-(Cyclohexylmethyl)piperazine-1-yl)-5-methyl-8-nitro-6-(trifluoromethyl)-4H-1,3-benzothiazine-4-one,

which has activity against Mycobacterium tuberculosis H37Rv and (PDR) 12700, M. Marinum, M. Vaccae 10670 strains, pharmaceutical compositions based on them and their use for the therapeutic or preventive treatment of mycobacterial infection in mammals.

EFFECT: obtaining compounds for treatment of mammalian infections.

4 cl, 4 dwg, 1 tbl, 17 ex

R U 2 7 5 2 5 6 8 C 2

R U 2 7 5 2 5 6 8 C 2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к общей области лечения инфекционных заболеваний млекопитающих (людей и животных), вызванных бактериями, в частности, для профилактического или терапевтического лечения таких заболеваний, как туберкулез (ТВ), язва Бурули и проказа, вызываемых микобактериями.

В частности, в настоящем изобретении сообщается о недавних исследованиях метаболизма известных противотуберкулезных соединений *in vivo*, достигнутых при этом результатах и о новой серии бензотиазиноновых соединений, которые обладают потенциалом для улучшения биологической активности и метаболической стабильности *in vivo* по сравнению с известными соединениями.

Предпосылки создания изобретения

Инфекционные заболевания, такие как туберкулез, проказа и язва Бурули, возникающие в результате инфекций микобактериями, относятся к наиболее серьезным угрозам здоровью человека с точки зрения уровня заболеваемости и смертности. Как следствие, существует острая необходимость в новых лекарственных средствах с улучшенной биологической активностью или улучшенной метаболической стабильностью, особенно для преодоления лекарственной резистентности и преодоления известных значительных побочных эффектов существующих лекарственных средств.

Бензотиазины и их применение в качестве антимикробных средств, особенно против микобактерий, общеизвестны. (S)-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифтор-метил)-4*H*-бензо[e][1,3]тиазин-4-он (BTZ043) и родственный 2-[4-(циклогексилметил)пиперазин-1-ил]-8-нитро-6-(трифторметил)-4*H*-1,3-бензотиазин-4-он (PBTZ169) описаны в WO 2007/134625 и WO2012/066518. Оба соединения являются чрезвычайно сильными противотуберкулезными средствами, которые проходят всесторонние исследования для возможного усовершенствования.

Сущность изобретения

С учетом вышеизложенных предпосылок создания изобретения, крайне желательно разработать новые соединения, которые не только обеспечивают высокую антибактериальную активность в отношении микобактерий, но также проявляют альтернативные или даже улучшенные свойства, такие как безопасность, метаболическая стабильность и хороший профиль ADME, по сравнению с ранее описанными соединениями.

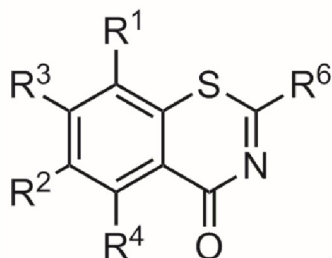
Настоящее изобретение направлено на создание новой серии бензотиазиноновых соединений, обладающих потенциалом для преодоления вышеуказанных проблем.

Недавние исследования *in vivo* с бензотиазином, которые, как сообщается, являются частью настоящего изобретения, выявили новый и полностью беспрецедентный путь восстановления с участием комплексов Мейзенгеймера BTZ043 и PBTZ169. Этот путь восстановления был подтвержден химическими исследованиями, которые позволили детально охарактеризовать комплекс Мейзенгеймера и его последующую химию.

Сочетание этих исследований *in vivo* и химических исследований с определением физико-химических характеристик методом ЖХ-МС и разработкой анализа также послужило основой для рационального направления оптимизации в этом перспективном классе противотуберкулезных препаратов. В частности, было обнаружено, что метаболизм нитрозамещенных бензотиазиноновых соединений *in vivo* включает деароматизацию нитробензотиазинонового фрагмента. Замена одного или обоих атомов водорода в положениях R³ и R⁴ в следующей формуле (I) более крупным заместителем позволяет изменить критический метаболизм этих бензотиазинов и, таким образом, обеспечить рациональный доступ к дополнительным улучшенным

антимикобактериальным соединениям.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению формулы (I)



(I)

где

R¹ представляет собой NO₂,

R² представляет собой CF₃,

по меньшей мере один из заместителей R³ и R⁴ представляет собой OH, SR¹⁴, NHR¹⁵, CN, N₃, насыщенный или ненасыщенный, необязательно галогенированный, линейный или разветвленный алифатический радикал, содержащий 1-4 атома углерода, линейный или разветвленный C₁-C₄ алкокси, C₁-C₄ ацил, а другой из R³ и R⁴, кроме того, может быть водородом,

R⁶ представляет собой 2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ильную или 4-(цикло-гексилметил)пиперазин-1-ильную группу, и

R¹⁴ и R¹⁵ независимо друг от друга представляют собой водород или C₁-C₄ алкильную группу,

и/или его фармацевтически приемлемой соли

В одном варианте осуществления в вышеуказанной формуле (I) в соответствии с вариантом осуществления [1] оба R³ и R⁴ являются такими, как определено выше, и отличаются от водорода. В другом варианте осуществления настоящего изобретения R³ представляет собой водород, и R⁴ имеет значение, определенное выше. В другом варианте осуществления настоящего изобретения R⁴ представляет собой водород, и R³ имеет значение, определенное выше.

Новые бензотиазиноновые соединения по настоящему изобретению и/или их фармацевтически приемлемые соли являются полезными для терапевтического лечения заболевания. Предпочтительно, заболевание выбрано из группы, включающей туберкулез, проказу или язву Бурули.

Описание чертежей

Фиг. 1a)-d):

a) Раскрывает молекулярный механизм действия нитробензотиазинонов в целом

b) Секция, представляющая репрезентативную ВЭЖХ хроматограмму (254 нм УФ) образцов плазмы крови карликовых свиней, обработанных VTZ043 непосредственно (вверху) и через несколько часов (внизу) после приготовления образца;

c) Характеристические области химических сдвигов смеси продуктов, полученной путем NaBH₄-опосредованного восстановления VTZ043;

d) Секция, представляющая ВЭЖХ хроматограмму (254 нм УФ) образца плазмы

крови VTZ043-обработанной карликовой свиньи, (вверху) по сравнению со смесью продуктов, полученной путем NaBH_4 -опосредованного восстановления VTZ043 (внизу).

Фиг. 2а)-b):

а) Схематическое представление стадии восстановления и метилирования

б) структуры 6a/b и 5b и характеристические COSY(корреляционная спектроскопия), NOESY(спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера) и HMBC(гетероядерная многополосная корреляция) взаимодействия 6a/b.

Фиг. 3а)-d):

а) Секция, представляющая ВЭЖХ профиль (254 нм) образцов плазмы, полученных после инкубации *in vitro* свежей цельной крови с VTZ043 и ДМСО (контроль с кровью человека); идентичность 5b однозначно подтверждена УФ-характеристиками и временем удерживания;

б) Экстракционные ионные хроматограммы (ВЭЖХ-МСВР(масс-спектрометрия высокого разрешения), положительный режим) при $m/z=459,1649-459,1695$ (соотв. 7b [PVTZ169+2H+H]⁺) I: образцы плазмы, полученные после инкубации *in vitro* свежей цельной крови с PVTZ169; II: образцы плазмы, полученного после инкубации *in vitro* свежей цельной крови с VTZ043 (отрицательный контроль); III: эталонная смесь, полученная восстановлением PVTZ169 при помощи NaBH_4 в смеси ацетонитрил/вода; региохимия 7a/7b предположена по аналогии с 5a/b;

с) Схематическое представление реакции Ме-Гриньяра с VTZ043

д) Нормализованные экстракционные ионные хроматограммы (ВЭЖХ-МСВР, положительный режим) образца плазмы, полученного после инкубации *in vitro* свежей цельной крови с I: VTZ043 (положительный контроль) при $m/z=434,0970-434,1014$ (соотв. 5b [VTZ043+2H+H]⁺); контроли: эталонная смесь, полученная восстановлением II: 9a и III: 9b с NaBH_4 в смеси ацетонитрил/вода; региохимия не определена.

Фиг. 4:

Секции, представляющие ВЭЖХ профили (254 нм) синтезированного эталонного соединения 5b (внизу) и супернатанта из суспензии дрожжевых клеток, инкубированных с VTZ043, анаэробно в течение 15 минут (вверху); идентичность 5b однозначно подтверждена УФ-характеристиками и временем удерживания.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение раскрывает результаты недавних исследований *in vivo*, касающихся использования известных бензотиазиноновых соединений VTZ043 и PVTZ169, которые выявили новый и полностью беспрецедентный путь восстановления с участием комплексов Мейзенгеймера двух соединений. Восстановление было подтверждено химическими исследованиями, которые позволили полностью охарактеризовать комплекс Мейзенгеймера и его последующую химию при использовании комбинации исследований *in vivo* и химических исследований с физико-химическими характеристиками, определенными методом ЖХ-МС, и разработкой метода анализа.

VTZ043, имеющий химическую структуру (S)-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифтор-метил)-4H-1,3-бензотиазин-4-она (1), и родственное соединение PVTZ169, имеющее химическую структуру 2-[4-[циклогексилметил]пиперазин-1-ил]-8-нитро-6-(трифтор-метил)-4H-1,3-бензо-тиазин-4-она (2), являются чрезвычайно сильными противотуберкулезными средствами, которые в настоящее время всесторонне исследуют для возможного усовершенствования (Makarov et al. Benzothiazinones Kill Mycobacterium tuberculosis by Blocking Arabinan Synthesis. Science 324, 801-804 (2009)).

Как показано на Фиг. 1, BTZ043, родственные бензотиазины и упрощенные аналоги, (Ссылка 1) представляют собой пролекарства, в которых нитро-заместитель восстанавливают до переходной нитрозогруппы, (3), которая затем взаимодействует с эссенциальным цистеиновым остатком декапренилфосфорил- β -D-рибоза 2'-оксидазы (DprE1) *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) с получением полумеркапталя (4). Фермент DprE1 необходим для биосинтеза арабинана, важного процесса формирования клеточной стенки микобактерий (ссылка 2) и образования ковалентного аддукта, (4), приводит к ингибированию и потере жизнеспособности *Mycobacterium tuberculosis*. Детали химии ключевого восстановления, таким образом, представляют значительный интерес. Ранее были сообщения о том, что нуклеофилы, включая тиолаты, имитирующие цистеин, подвергаются классическим реакциям кинес-присоединения (Ссылка 3) (реакции Фона-Рихтера, Ссылка 4) к нитроароматическому ядру BTZ043 и аналогов с сопутствующим восстановлением нитрогруппы до нестабильного и реакционноспособного промежуточного нитрозо-соединения. (Ссылка 5). Региоселективная электрофильность нитроароматического ядра согласуется с расчетами заряда Малликена, что указывает на значительный положительный характер *орто* и *пара* относительно нитрогруппы (см. структуру 1).

Авторы обнаружили, что BTZ043 также метаболически восстанавливается *in vivo* гидридом с образованием переходных, но выделяемых комплексов Мейзенгеймера, которые затем легко снова окисляются до исходного соединения. Восстановление также можно осуществлять химически, чтобы обеспечить достаточное количество комплексов Мейзенгеймера для полной физико-химической характеристики и подтверждения последующих химических преобразований. Выяснение этого процесса объяснило наблюдения переменных концентраций лекарственного средства во время экспериментов *in vivo*, в то же время обеспечивая представление о новой генерации пролекарств *in vivo* и, в конечном итоге, о новых противомикобактериальных лекарственных средствах. Результаты имеют важное значение, которое необходимо будет учитывать при продолжении разработки этого важного класса противотуберкулезных средств.

Низкая наномолярная противотуберкулезная активность BTZ043 *in vitro* вызвала очень ранние исследования *in vivo*. Когда некоторые образцы плазмы анализировали повторно на экспозицию лекарственного средства после хранения при комнатной температуре, концентрация аналита и биологическая активность соответствующих образцов плазмы, по-видимому, значительно увеличивались.

Через несколько лет после этого случая значения экспозиции лекарственного средства в РК исследованиях снова характеризовались исключительно высокими отклонениями и загадочным увеличением определенных концентраций BTZ043 с течением времени (см. Фиг. 1b).

Интересно то, что это не наблюдалось, когда в чистую плазму необработанных животных добавили BTZ043. В пробах с добавками площади пиков оставались полностью неизменными с течением времени. Поэтому логично, что возможное объяснение этого явления могло включать еще неизвестный метаболит, который был термо- или окислительно нестабильным на воздухе. Однако ранее стандартизированные анализы метаболизма *in vitro* (микросомы и гепатоциты) не выявили метаболитов, которые могли бы помочь сформулировать окончательную химическую гипотезу.

Для выявления потенциально упущенных из виду метаболитов осуществляли дополнительные метаболические исследования BTZ043, которые включали тщательный анализ ВЭЖХ хроматограмм с высоким разрешением образцов плазмы после различных периодов инкубации при комнатной температуре. Для обеспечения максимальной

стабильности хроматографических условий все растворители тщательно дегазировали путем вакуумной обработки и/или барботирования азотом. Действительно, в этих более жестких условиях было обнаружено, что, хотя интегрированная площадь из-за исходного лекарственного средства увеличивалась с течением времени, изначально был отмечен
 5 более ранний элюирующий пик с очень необычным УФ-спектром, но со временем он исчез (Фиг. 1b). Сопутствующее резкое увеличение площади пика VTZ043 (в некоторых образцах >100%) подчеркнуло важность этого неустойчивого метаболита. МСВР анализ предполагает, что это недавно обнаруженное соединение ($m/z^+ = 434,0988$,
 10 $C_{17}H_{19}F_3O_5N_3S^+$) содержит только на два атома водорода больше, чем сам VTZ043 ($m/z^+ = 432,0835$, $C_{17}H_{17}F_3N_3O_5S^+$). Предполагалось, что этот метаболит может быть образован путем ферментативного восстановления VTZ043 и что он нестабилен при воздействии кислорода из воздуха.

Из-за его химической нестабильности и ограниченной доступности вещества из
 15 плазмы были найдены альтернативные методы для получения достаточных количеств для детальных исследований. На основании его молекулярной массы было сделано предположение, что новое соединение может быть доступно путем химического восстановления VTZ043. Кроме того, на основании химии кинес-присоединения, о которой сообщалось ранее, предполагалось, что простые химические гидридные источники
 20 также могут инициировать процесс восстановления. Действительно, обработка VTZ043 при помощи $NaBH_4$ в различных растворителях приводила к немедленному образованию стойкого ярко-оранжевого/красного раствора. ЖХ/МС анализ аликвоты реакционной смеси, взятой через 30 секунд после добавления гидрида, показал образование смеси
 25 соединения, содержащей пик с временем удерживания, отчетливым УФ-спектр и массой, идентичным ранее обнаруженному метаболиту. Добавление избытка $NaBH_4$ привело реакцию к завершению.

Интересно, что тот же восстановленный метаболит не был получен, когда VTZ043 обрабатывали при различных других восстановительных условиях, включая Pd/C (H_2),
 30 Pt/C (H_2)), электрохимическое восстановление (Pt/Pt), Zn/ $NH_4Cl_{водн.}$, NH_3 -аддукты, триэтилсилан, диоксид серы, дитионит натрия, сложный эфир Ганча (ссылка 8) и NADH. Реакции с более мягкими гидридами на основе бора $NaBH(OAc)_3$ и $NaBH_3CN$ оказались неэффективными и привели к полному восстановлению исходного VTZ043.

Последующий анализ с помощью 1H ЯМР-спектроскопии показал, что образовавшийся восстановленный продукт фактически представлял собой смесь двух основных
 35 компонентов (Фиг. 1c), которые совместно элюировали в первоначально используемых нейтральных хроматографических условиях. Когда ВЭЖХ осуществляли при кислотном pH (0,1% трифторуксусной кислоты (TFA)), оба соединения можно было разделить.
 40 Эти два соединения имели существенно разные УФ-спектры, но одинаковый массовый пик ($m/z^+ = 434,0988$), что говорит о том, что они были изомерами. Восстановленные соединения можно было выделить любым из двух способов. Удаление реакционного растворителя с последующей препаративной ВЭЖХ и лиофилизацией давало блестящее
 45 твердое вещество красного цвета, которое при повторном ЖХ/МС анализе и подробных ЯМР исследованиях было подтверждено как представляющее собой смесь тех же продуктов восстановления. Альтернативно, после подкисления реакционной смеси с помощью TFA осаждался темно-красный пигмент, который можно промыть, собрать центрифугированием и высушить в вакууме (Фиг. 2a). Хотя твердое вещество оказалось

достаточно стабильным при комнатной температуре и даже атмосферном кислороде в течение коротких периодов, когда подкисленную реакционную смесь оставляли выстаиваться или когда выделенное твердое вещество растворяли и хранили в недегазированном растворе, восстановленное вещество снова легко окислялось до

5 VTZ043.

Подробно раскрытые ЖХ/МС эксперименты с использованием этой химически полученной смеси продуктов реакции в качестве эталонного материала показали, что минорный изомер (**5b**) фактически идентичен неизвестному метаболиту, наблюдаемому в образцах плазмы от карликовых свиней, которые получали пероральные дозы VTZ043, в то время как основной компонент (**5a**) полностью отсутствовал в образцах плазмы (см. Фиг. 1d).

10

Предварительные ЯМР исследования смеси продуктов восстановления показали потерю характерных сигналов ароматических протонов для VTZ043 (**1**) и появление дополнительных сигналов в области сильного поля. Это, наряду с быстрым

15

образованием красного/оранжевого цвета во время восстановления и предыдущими наблюдениями химии кинес-присоединения нуклеофилов к VTZ043, позволило предположить, что гидрид мог быть добавлен для образования неустойчивого, но обнаруживаемого комплекса Мейзенгеймера.

20

Поскольку кислотные ВЭЖХ условия, необходимые для разделения изомерных продуктов восстановления, также способствуют быстрому повторному окислению во время обработки, была предпринята попытка получить более стабильные выделяемые производные для более подробного структурного подтверждения.

25

Предполагалось, что деароматизированные восстановленные продукты должны быть подвержены реакциям с электрофилами, которые могут обеспечивать производные, подходящие для детальной характеристики. Действительно, реакция смеси продуктов

30

восстановления с диметилсульфатом дала два новых менее полярных продукта (**6a**, **b**) с отдельными УФ-спектрами, которые были почти идентичны метаболиту (**5b**) и его изомеру (**5a**) (Фиг. 2a). Впервые идентифицированные структуры **5a** и **5b**, а также **6a** и **6b**, таким образом, составляют часть настоящего изобретения.

Оба соединения оказались достаточно растворимыми и стабильными при комнатной температуре для их выделения в мультимиллиграммовом масштабе препаративной ВЭЖХ и их полной характеристики при помощи 1D и 2D ЯМР. В соответствии с образованием комплекса Мейзенгеймера, каждый изомер (**6a/b**) имел только один протон в области слабого поля (7,0 и 7,3 м.д., соответственно) и новый сигнал в области сильного поля (3,7 и 3,5 м.д., соответственно), который был определен как метиленовая группа на основании DEPT135 измерений. Эти данные однозначно показывают, что восстановление VTZ043 происходит в ароматическом ядре и что два продукта (**6a/b**) соответствующие **5a/b**) являются региоизомерами гидридного комплекса Мейзенгеймера (Фиг. 2a). Комплексы Мейзенгеймера известны, но часто они являются очень нестабильными промежуточными продуктами в реакциях нуклеофильного замещения электрон-обедненных ароматических систем, и редкие примеры были идентифицированы в биологических системах, например, в биоразложении взрывчатых веществ, таких как TNT, видом *Yarrowia lipolytica*.

35

40

45

Однако, насколько известно авторам изобретения, преобразования с получением комплексов Мейзенгеймера *in vivo*, не были описаны для какого-либо лекарственного средства или лекарственного средства-кандидата. Введение метильной группы в **6a/b** также позволило определить региохимию обоих изомеров через комбинацию NOESY

и НМВС исследований взаимодействия (Фиг. 2b). Хотя химическое гидридное восстановление давало два изомерных продукта, тот факт, что только **5b** наблюдали *in vivo*, говорит о том, что ферментативный процесс мог быть вовлечен в образование метаболита, который также мог затем служить в качестве непосредственного предшественника для активного нитрозо аналога (Фиг. 2a). Таким образом, были скринированы биологические материалы на их способность преобразовывать VTZ043 в **5b**.

В соответствии с экспериментами для определения метаболизма *in vitro*, **5b** нельзя было определить в анализах микросомальной деградации, даже в анаэробных условиях и в присутствии большого избытка добавленного NADH. Также при контактировании с клеточными линиями (K562, клеточная линия лейкоза) не было никаких следов **5b** (данные не показаны) при инкубации с VTZ043 при 5 мкг·мл⁻¹. Однако ВЭЖХ анализ свежей цельной крови человека, контактировавшей с VTZ043, показал преобразование VTZ043 в **5b** через несколько часов (см. Фиг. 3a). В отличие от этого, никакой продукции **5b** не было обнаружено в свежеполученной плазме (данные не показаны).

Этот эксперимент не только продемонстрировал, что клетки крови способны преобразовывать нитробензотиазиноны в соответствующие комплексы Мейзенгеймера, но что образование **5b** наиболее вероятно также у людей.

Эти данные будут иметь огромное значение для разработки способа и обработки образцов, когда нитробензотиазиноны перейдут на стадию клинических испытаний. Для повышения воспроизводимости анализа также исследовали кровь мышей от C57BL/6J мышей на ее метаболические способности, и снова была обнаружена продукция **5b** (Фиг. 3a). Дальнейшие исследования с образцами плазмы карликовых свиней и крыс, которые получали пероральные дозы VTZ043, дали аналогичные результаты, и это говорит о том, что предполагаемый восстановительный фермент часто встречается у млекопитающих. Поскольку PVTZ169 имеет такое же электронно-реактивное ядро, как у VTZ043, его подвергали таким же исследованиям химического и индуцированного кровью восстановления. Как и ожидалось, ВЭЖХ-МСВР анализы реакции показали, что PVTZ169 также действительно претерпевает сопоставимое восстановление до соответствующего комплекса Мейзенгеймера (**7b**) с такой же региоселективностью, которую наблюдали с VTZ043 (Фиг. 3b). Это снова подчеркивает влияние этой химии среди этих важных нитробензотиазиноновых противотуберкулезных средств. Демонстрация кровью-индуцированного восстановления обеспечит возможность метаболических исследований библиотек нитробензотиазинонов на образование соответствующих комплексов Мейзенгеймера.

Тот факт, что биовосстановление каждого из VTZ043 и PVTZ169 давало отдельные региоизомерные продукты восстановления (т.е. **5b**), обеспечивает возможность направленной оптимизации и потенциальной супрессии метаболизма через введение заместителей в 5-положение бензотиазинонового ядра. Модели связывания бензотиазинонов и DrgE1 также показали некоторую гибкость в этом положении.

Хотя получение 5-замещенных бензотиазинонов можно осуществить путем модификации пути синтеза VTZ043, вдохновленные результатами исследований влияния гидриде, авторы изобретения рассмотрели реакции с другими нуклеофилами для получения замещенных бензотиазинонов в одну стадию. Как было показано, авторы ранее сообщали, что нуклеофилы, включая тиолаты и цианид, подвергаются классическим реакциям кинес-присоединения (реакции Фон-Рихтера) к нитроароматическому ядру VTZ043 и аналогов.

Также могло быть показано, что VTZ043 легко взаимодействует с MeMgBr или $(Me)_2Zn$ с образованием Me-VTZ комплексов Мейзенгеймера (**8a/b**), которые медленно окислялись с образованием региоизомерной смеси **9a/b**. Изомеры разделяли препаративной ВЭЖХ и полностью охарактеризовывали.

5 Таким образом, также новые структуры **8a/b** и **9a/b** образуют часть настоящего изобретения.

Отдельные соединения внимательно исследовали на их метаболическое поведение в анализе крови. В соответствии с гипотезой, о которой говорилось выше, восстановленную форму изомер **9b** можно было определить только в следовых
10 количествах в метаболическом анализе, как показал ВЭЖХ-МСВР анализ, но интересно то, что также **9a** образовывал только более или менее определяемые количества комплекса Мейзенгеймера *in vitro*.

Мотивированные этими результатами, авторы синтезировали дополнительные производные соединений **1** и **2**, содержащие метил, этильные, циклопропильные,
15 этинильные и нитрильные остатки, используя аналогичный нуклеофильный подход, при этом соответствующие промежуточные комплексы Мейзенгеймера были окислены при добавлении 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинона (DDQ). Новые производные показали низкую цитотоксичность (HeLa), существенно сниженные тенденции к образованию комплексов Мейзенгеймера (по сравнению с образованием гидридного
20 комплекса Мейзенгеймера (MHC)) в анализе крови и хорошие или отличные антимикобактериальные активности (Таблица 1). Самые высокие активности против *Mtb* штамма H37Rv и штамма с множественной лекарственной резистентностью наблюдали для 5-метильных производных соединений **1** и **2**.

Эти результаты показывают, что метаболическую тенденцию к образованию
25 комплексов Мейзенгеймера бензотиазинонов можно обратить путем введения заместителей в 5- и 7-положение бензотиазинонового ядра и установления стадии для дальнейших целевых метаболически направленных подробных исследований структуры-активности.

Выводы

30 Таким образом, можно продемонстрировать, что нестабильная экспозиция лекарственного средства в фармакокинетических исследованиях бензотиазинонов (VTZ043, PVTZ169) является результатом пока еще упущенного из виду метаболического превращения, приводящего к образованию комплексов Мейзенгеймера. Эти метаболиты чувствительны к кислороду и легко превращаются в исходное лекарственное средство.
35 Несмотря на их нестабильность при воздействии кислорода, значительные количества комплекса Мейзенгеймера **5b** были обнаружены в качестве отдельного региоизомера в образцах плазмы карликовых свиней и крыс, которые получали VTZ043 перорально.

Для получения аутентичного стандартного образца, был найден одностадийный синтетический подход, при котором борогидрид натрия можно использовать для
40 получения региоизомерных смесей комплексов Мейзенгеймера, которые можно разделить при помощи ВЭЖХ.

В конечном счете, был найден метод стабилизации этих соединений путем метилирования, что было важным требованием для полного выяснения их структур и определения их региохимии с помощью ЯМР. Чтобы обеспечить возможность скрининга
45 других соединений, которые также могут быть склонны к этой метаболической трансформации, разработали очень простой анализ цельной крови на основе ВЭЖХ-МСВР, и обнаружили, что другие бензотиазины (например, PVTZ169) также можно преобразовывать аналогичным образом.

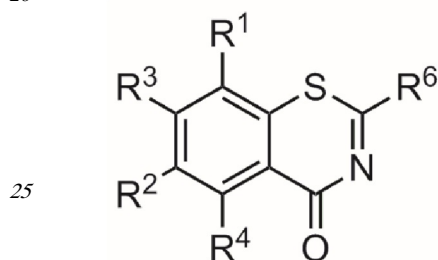
Наконец, высокая региоселективность воздействия гидридов *in vivo* подсказала варианты направленной оптимизации, в то время как был найден очень гибкий подход для введения заместителей в бензотиазиноновое ядро одностадийным способом через нуклеофильную атаку.

5 Можно показать, что тенденцию к образованию комплексов Мейзенгеймера *in vitro* можно контролировать посредством введения этих заместителей.

Поскольку нитро соединения довольно широко распространены среди противотуберкулезных препаратов, существует явная необходимость рассмотреть этот тип метаболитических преобразований на очень раннем этапе развития, поскольку он
10 может иметь существенные значения для всех последующих процедур, включая биоаналитическое количественное определение, оценку токсичности или просто правильное обращение с биологическим материалом.

В частности, при лечении туберкулеза легких высвобождение BTZ043 путем окисления пролекарства **5b** в легком сигнализирует об абсолютно новой концепции целевого
15 местного антибиоза. Более того, весьма вероятно, что аналогичные преобразования можно встретить в других программах развития туберкулеза будут происходить, поскольку эффективный бензотиазиноновый каркас (см. также PBTZ169, (2)), как правило, склонен к химическому восстановлению этого типа.

[1] Поэтому настоящее изобретение также включает новые соединения формулы
20



(I)

где

30 R¹ представляет собой NO₂,

R² представляет собой CF₃,

по меньшей мере один из заместителей R³ и R⁴ представляет собой OH, SR¹⁴, NHR¹⁵,
35 CN, N₃, насыщенный или ненасыщенный, необязательно галогенированный, линейный или разветвленный алифатический радикал, содержащий 1-4 атома углерода, линейный или разветвленный C₁-C₄ алкокси, C₁-C₄ ацил, а другой из R³ и R⁴, кроме того, может быть водородом.

R⁶ представляет собой 2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ильную или 4-
40 (цикло-гексилметил)пиперазин-1-ильную группу, и R¹⁴ и R¹⁵ независимо друг от друга представляют собой водород или C₁-C₄ алкильную группу

R¹⁴, R¹⁵ представляют собой независимо друг от друга водород или C₁-C₄ алкильную
45 группу и/или их фармацевтически приемлемые соли.

Различные заместители соединения формулы (I) определяются следующим образом:

Атом галогена представляет собой атом фтора, атом хлора, атом брома или атом йода.

Алифатический радикал представляет собой линейный или разветвленный C₁-C₆ алкильный, C₂-C₆ алкенильный, C₂-C₆ алкинильный или C₃-C₆ циклоалкильный радикал.

C₁-C₆ алкил представляет собой линейный или разветвленный алкил и включает метил, этил, изопропил, бутил, изобутил, вторичный бутил, третичный бутил, пентил, 3-метилбутил, неопентил, гексил, 2-этилбутил.

C₁-C₄ алкил представляет собой линейный или разветвленный алкил и включает метил, этил, изопропил, бутил, изобутил, вторичный или третичный бутил.

C₂-C₆ алкенил представляет собой линейный или разветвленный алкенил и включает винил, аллил, 1-пропенил, изопрпенил, 2-бутенил, 3-бутенил, 2-пентенил, 4-пентенил, 3-метил-2-бутенил, 5-гексенил, 4-метил-3-пентенил.

C₂-C₆ алкинил представляет собой линейный или разветвленный алкинил и включает этинил, пропилил, бутилил, пентинил, гексинил.

C₃-C₆ циклоалкил представляет собой циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил.

Алифатический радикал может быть замещен фтором, хлором, бромом или йодом.

C₁-C₄ алкокси представляет собой линейный или разветвленный алкокси и метокси, этокси, пропокси или изопропокси, буюкси или изобуюкси.

C₁-C₄ ацил включает формильную, ацетильную, пропионильную и бутирильную группу.

Новые соединения формулы (I) можно синтезировать в соответствии со способами, известными в данной области техники.

Предпочтительно в вышеуказанной формуле (I) оба R³ и R⁴ являются такими, как определено выше, и оба отличаются от водорода. В другом варианте осуществления настоящего изобретения R³ представляет собой водород, а R⁴ имеет значение, определенное выше. В следующем варианте осуществления настоящего изобретения R⁴ представляет собой водород, а R³ имеет значение, определенное выше.

[2] Предпочтительный вариант осуществления представляет собой соединение формулы (I) в соответствии с пунктом [1], выбранное из группы, включающей

(S)-7-Метил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4H-1,3-бензотиазин-4-он (9a)

(S)-5-Метил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4H-1,3-бензотиазин-4-он (9b)

(S)-5-Этил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4H-1,3-бензотиазин-4-он (10)

(S)-7-Этил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4H-1,3-бензотиазин-4-он (11)

(S)-5-Циклопропил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4H-1,3-бензотиазин-4-он (12)

(S)-5-Этинил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4H-1,3-бензотиазин-4-он (13)

(S)-2-(2-Метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-4-оксо-6-(трифторметил)-4H-1,3-бензотиазин-7-карбонитрил (14)

(S)-5,7-Диметил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4H-1,3-бензотиазин-4-он (15)

2-(4-(Циклогексилметил)пиперазин-1-ил)-5-метил-8-нитро-6-(трифторметил)-4H-1,3-

бензотиазин-4-он (16)

2-(4-(Циклогексилметил)пиперазин-1-ил)-7-метил-8-нитро-6-(трифторметил)-4*H*-1,3-бензотиазин-4-он (17).

[3] Следующий предпочтительный вариант осуществления представляет собой соединение формулы (I) в соответствии с вариантом осуществления [2], выбранное из группы, включающей

(*S*)-5-Метил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4*H*-1,3-бензотиазин-4-он (9b)

2-(4-(Циклогексилметил)пиперазин-1-ил)-5-метил-8-нитро-6-(трифторметил)-4*H*-1,3-бензотиазин-4-он (16)

Соединения настоящего изобретения являются полезными для лечения инфекционных заболеваний, вызванных бактериями. В частности, соединения настоящего изобретения являются полезными для профилактического и терапевтического лечения туберкулезных инфекций и других микобактериальных инфекций у людей и у животных. Соответственно, следующий аспект настоящего изобретения направлен на фармацевтические композиции, содержащие соединение формулы (I).

[4] Таким образом, следующий аспект настоящего изобретения также относится к фармацевтической композиции, включающей соединение по пункту [1] - [3] и/или его фармацевтически приемлемую соль.

Также раскрыта фармацевтическая композиция, включающая соединение формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с вариантом осуществления [6], которая также включает один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов.

Фармацевтически приемлемая соль ионизируемого варианта соединения по настоящему изобретению представляет собой кислотную или основную соль, которая обычно считается в данной области техники подходящей для использования в контакте с тканями людей или животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений. Такие соли включают соли минеральных и органических кислот основных остатков, таких как амины, а также щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты.

Конкретные фармацевтически приемлемые соли включают соли кислот, таких как хлористоводородная, фосфорная, бромистоводородная, яблочная, гликолевая, фумаровая, серная, сульфаминовая, сульфаниловая, муравьиная, толуолсульфоновая, метансульфоновая, бензолсульфоновая, этандисульфоновая, 2-гидроксиэтилсульфоновая, азотная, бензойная, 2-ацетоксибензойная, лимонная, винная, молочная, стеариновая; салициловая, глутаминовая, аскорбиновая, памовая, янтарная, фумаровая, малеиновая, пропионовая, гидроксималеиновая, иодистоводородная, фенилуксусная, алкановая, такая как уксусная.

Аналогично, фармацевтически приемлемые катионы включают, но не ограничиваются ими, натрий, калий, кальций, алюминий, литий и аммоний.

Специалистам в данной области техники смогут определить другие фармацевтически приемлемые соли для соединений настоящего изобретения, включая перечисленные в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa., p,1418 (1985).

[5] Настоящее изобретение помимо этого относится к соединению для применения в способе лечения заболевания, вызванного микробной инфекцией, включающем терапевтически эффективное количество соединения формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции по любому одному из пунктов [1] - [4] для введения нуждающемуся в этом пациенту.

[6] В частности, соединение формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с настоящим изобретением можно использовать в способе для лечения микобактериальной инфекции у млекопитающих.

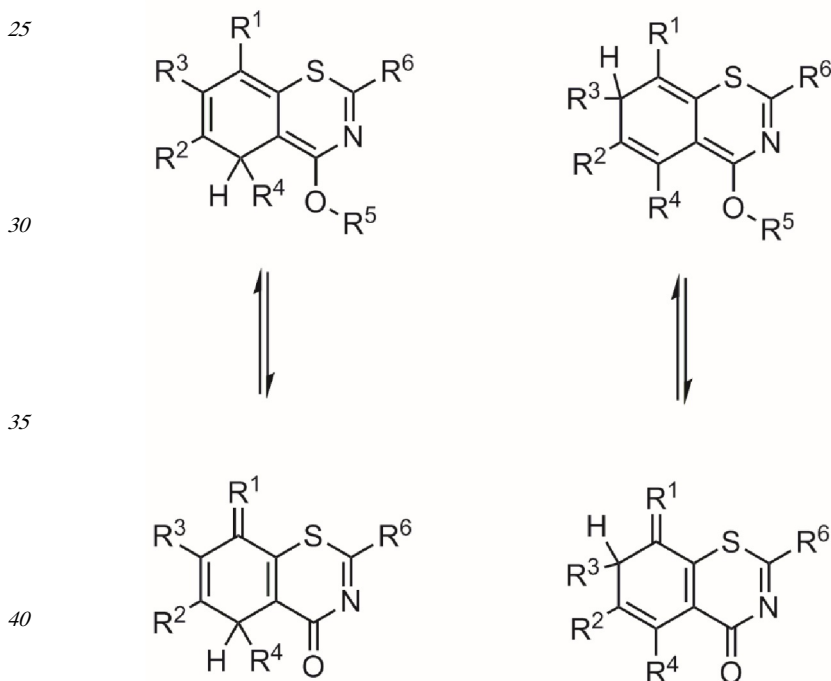
[7] Особенно предпочтительным является соединение формулы (I) и/или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с настоящим изобретением для применения в терапевтическом или профилактическом лечении туберкулеза или лепрозной инфекции у млекопитающих.

Соединения настоящего изобретения можно формулировать с использованием известных в данной области способов в форме разбавленного раствора или суспензии в фармацевтически приемлемой среде для местного или парентерального введения путем внутривенного, подкожного или внутримышечного введения или для назального применения. В предпочтительном способе новые соединения получают в форме таблетки, капсулы или водной суспензии вместе с фармацевтически приемлемыми эксципиентами для перорального введения.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты хорошо известны в области фармацевтики и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1985). Фармацевтический эксципиент может быть выбран с учетом предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики.

Кроме того, как показано выше, новый идентифицированный путь восстановления применим к бензотиазиноновым соединениям. Комплексы Мейзенгеймера с такими соединениями в равной степени являются частью настоящего изобретения.

[8] Другим аспектом настоящего изобретения являются выделяемые по-новому идентифицированные комплексы Мейзенгеймера формул (II)



(II)

где

R¹ и R² независимо друг от друга представляют собой NO₂, NR⁷R⁸, NHOR⁹, COOR⁹, CN, CONR¹⁰R¹¹, CHO, F, Cl, Br, -SO₂NR¹²R¹³, линейный или разветвленный C₁-C₄ алкокси, OCF₃, моно-, ди- или трифторалкил, содержащий 1-3 атома углерода; при условии, что

по меньшей мере один из R^1 и R^2 представляют собой нитро группу;

R^3 , R^4 независимо друг от друга представляют собой водород, гидроксил, $-SR^{14}$, CN, $-N_3$ или насыщенный или ненасыщенный, необязательно галогенированный, линейный
5 или разветвленный алифатический радикал, содержащий 1-4 атома углерода, F, Cl, Br, линейный или разветвленный C_1 - C_4 алкокси;

R^5 представляет собой водород или ненасыщенный или насыщенный, необязательно галогенированный, линейный или разветвленный алифатический радикал, содержащий
10 1-6 атомов углерода; ацил, содержащий 1-4 атома углерода, $-CONHR^{10}$ или $-SiR^{12}R^{13}R^{14}$;

R^6 представляет собой замещенный или незамещенный гетероциклоалкильный, гетероалкильный или гетероарильный заместитель;

R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} независимо друг от друга выбраны из водорода, ненасыщенного или насыщенного, необязательно галогенированного, линейного или
15 разветвленного алифатического радикала, содержащего 1-6 атомов углерода; фенила; бензила или ацила, содержащего 1-4 атома углерода.

Различные заместители соединения формулы (II) определены следующим образом:

Атом галогена представляет собой атом фтора, атом хлора, атом брома или атом
20 йода.

Алифатический радикал представляет собой линейный или разветвленный C_1 - C_6 алкильный, C_2 - C_6 алкенильный, C_2 - C_6 алкинильный или C_3 - C_6 циклоалкильный радикал.

C_1 - C_6 алкил представляет собой линейный или разветвленный алкил и включает метил, этил, изопропил, бутил, изобутил, вторичный бутил, третичный бутил, пентил,
25 3-метилбутил, неопентил, гексил, 2-этилбутил.

C_1 - C_4 алкил представляет собой линейный или разветвленный алкил и включает метил, этил, изопропил, бутил, изобутил, вторичный или третичный бутил.

C_2 - C_6 алкенил представляет собой линейный или разветвленный алкенил и включает
30 винил, аллил, 1-пропенил, изопропенил, 2-бутенил, 3-бутенил, 2-пентенил, 4-пентенил, 3-метил-2-бутенил, 5-гексенил, 4-метил-3-пентенил.

C_2 - C_6 алкинил представляет собой линейный или разветвленный алкинил и включает этинил, пропинил, бутинил, пентинил, гексинил.

C_3 - C_6 циклоалкил представляет собой циклопропил, циклобутил, циклопентил,
35 циклогексил.

Алифатический радикал может быть замещен фтором, хлором, бромом или йодом.

C_1 - C_4 алкокси представляет собой линейный или разветвленный алкокси и метокси, этокси, пропокси или изопропокси, бутокси или изобутокси.

C_1 - C_4 ацил включает формильную, ацетильную, пропионильную и бутирильную
40 группу.

Гетероарил представляет собой моноциклическое или полициклическое ароматическое кольцо, содержащее атомы углерода, атомы водорода и один или несколько гетероатомов, предпочтительно 1-3 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы. Иллюстративные примеры гетероарильных групп включают
45 пиридинил, пиридазинил, пиримидил, пиразил, триазинил, пирролил, пиразолил, имидазолил, (1,2,3,-) и (1,2,4)-триазолил, пиразинил, пиримидинил, тетразолил, фурил, тиенил, изоксазолил, тиазолил, фенил, изоксазолил и оксазолил.

Гетероарильная группа может быть незамещенной или замещенной 1-3 заместителями,

выбранными из C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила или C₂-C₆ алкинила, F, Cl, Br, C₁-C₄ алкокси и C₁-C₄ ацила.

Предпочтительно, гетероарильная группа представляет собой моноциклическое кольцо, где кольцо включает 1-3 гетероатома, выбранных из атома азота, атома кислорода и атома серы, и 2-5 атомов углерода. Особенно предпочтительна гетероарильная группа, содержащая 1 или 2 атома азота и 0-1 атом, выбранный из атома кислорода и атома серы, и имеющая 5 или 6 атомов, образующих кольцо, и включает пирролил, пиразолил, имидазолил и пиридинил.

Гетероциклоалкил представляет собой неароматическое моноциклическое или полициклическое кольцо, содержащее атомы углерода и водорода и по меньшей мере один гетероатом, предпочтительно, 1-4 гетероатома, выбранных из атома азота, атома кислорода и атома серы. Гетероциклоалкил может иметь одну или несколько двойных связей углерод-углерод или двойных связей углерод-гетероатом в кольце при условии, что кольцо не станет ароматическим из-за их присутствия. Примеры гетероциклоалкильных групп включают азиридилил, пирролидинил, пирролидино, пиперидинил, пиперидино, пиперазинил, пиперазино, морфолинил, морфолино, тиоморфолинил, тиоморфолино, тетрагидрофуранил, тетрагидротиофуранил, тетрагидропиранил и пиранил.

Гетероциклоалкильная группа может быть незамещенной или замещенной 1-3 заместителями, выбранными из C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила или C₂-C₆ алкинила, F, Cl, Br, C₁-C₄ алкокси и C₁-C₄ ацила.

Предпочтительно, гетероциклоалкильная группа представляет собой моноциклическое или бициклическое кольцо, содержащее 1-3 гетероатома. Особенно предпочтительны 2-метил-1,4-диокса-8-аза-спиро[4.5]декан-8-ильная и 4-(циклогексилметил)пиперазин-1-ильная группа.

Гетероалкил представляет собой линейный или разветвленный алкил, содержащий атомы углерода и водорода и по меньшей мере один гетероатом, предпочтительно 1-4 гетероатома, выбранных из атома азота и атома серы. Гетероалкил может иметь одну или несколько двойных связей углерод-углерод или двойных связей углерод-гетероатом.

Гетероалкильная группа может быть незамещенной или замещенной 1-3 заместителями, выбранными из C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила или C₂-C₆ алкинила, F, Cl, Br, C₁-C₄ алкокси и C₁-C₄ ацила.

В предпочтительном варианте осуществления комплекс Мейзенгеймера формул (II) содержит гетероциклоалкильные, гетероалкильные или гетероарильные группы R⁶, которые являются незамещенными.

[9] В соответствии с другим вариантом осуществления гетероциклоалкильная, гетероалкильная или гетероарильная группа R⁶ комплекса Мейзенгеймера формулы (II) в соответствии с вариантом осуществления [8] замещена 1-3 заместителями, выбранными из C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила или C₂-C₆ алкинила, F, Cl, Br, C₁-C₄ алкокси, C₁-C₄ ацила.

[10] Следующий вариант осуществления представляет собой выделяемый комплекс Мейзенгеймера в соответствии с формулами (II), где R¹ представляет собой NO₂, R² представляет собой CF₃, R³ и R⁴ каждый представляют собой один или два атома водорода или метил и водород, R⁵ представляет собой водород или метил, R⁶

представляет собой 2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил.

[11] Еще один вариант осуществления охватывает комплекс Мейзенгеймера в соответствии с формулами (II) варианта осуществления [8], где R^1 представляет собой NO_2 , R^2 представляет собой CF_3 , R^3 и R^4 каждый представляют собой один или два атома водорода, R^5 представляет собой водород или метил, R^6 представляет собой 4-(циклогексилметил)пиперазин-1-ильную группу.

[12] Применение комплекса Мейзенгеймера по любому одному из вышеуказанных вариантов осуществления [8]-[11] в качестве инструмента исследования для выяснения метаболизма нитро-замещенных бензотиазиноновых соединений. Таким образом, по-новому идентифицированные комплексы Мейзенгеймера соединений VTZ043 и PVTZ169 также являются частью настоящего изобретения.

Экспериментальная часть

Аппаратура

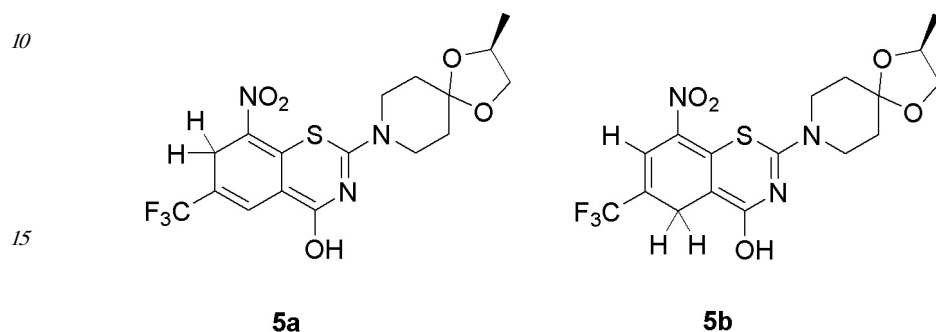
Аналитическую ВЭЖХ (ЖХ-УФ/видимые области спектра) осуществляли на системе ВЭЖХ серии 1100 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), включающей автодозатор MicroALS, CapPump, ALSTherm, термостат колонки и DAD. Условия ВЭЖХ: колонка Phenomenex Kinetex 5 мкм, XB-C18, 100 Å, 250 × 4,6 мм и градиентное элюирование (MeCN (0,1% (об/об) TFA): 0,1% (об/об) TFA (H₂O); 10: 90-100: 0 в течение 20 мин и 100: 0 в течение еще 10 мин, скорость потока 0,5 мл мин⁻¹), объем вводимой пробы 3-5 мкл. ЖХ-МС анализы с буферным раствором осуществляли на аппарате Waters (Waters, Milford, MA, www.waters.com) ZQ, состоящем из хроматографического модуля Alliance HT, фотодиодного матричного детектора 2996 и масс-спектрометра Micromass ZQ. Условия ВЭЖХ: колонка Waters Pro C18 YMC 3 × 50 мм и градиентное элюирование (MeCN: 10 мм ацетат аммония (H₂O); 5: 95-80: 20 в течение 10 мин, скорость потока 0,7 мл мин⁻¹). Источник электрораспыления МС работал при напряжении на капилляре 3,5 кВ и температуре десольватации 300°C. Измерения методом ЖХ-МСВР осуществляли с использованием высокопроизводительного настольного устройства для ЖХ-МСВР Exactive Q Orbitrap с электрораспылительным источником ионов и системой ВЭЖХ Accela (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), включающей автодозатор, термостат колонки, насос 1250 и детектор с фотодиодной матрицей. Условия ВЭЖХ: колонка Thermo Scientific Accucore C18, 2,6 мкм, 100 × 2,1 мм и градиентное элюирование (MeCN (0,1% (об/об) муравьиной кислоты): 0,1% (об/об) муравьиной кислоты (H₂O); 5: 95-98: 2 в течение 10 мин и 98: 2 в течение еще 12 мин, скорость потока 0,2 мл мин⁻¹), объем вводимой пробы 3-5 мкл.

Препаративную ВЭЖХ осуществляли на устройстве Gilson Abimed, снабженном бинарным насосом 321 и детектором ультрафиолетового и видимого диапазонов 156. Условия ВЭЖХ: колонка Phenomenex Luna C18, 10 мкм, 250 × 21,2 мм и градиентное элюирование (MeCN (0,1% (об/об) TFA): 0,1% (об/об) TFA (H₂O); скорость потока 21 мл мин⁻¹) для кислотных условий, и градиентное элюирование (MeCN: H₂O; скорость потока 21 мл мин⁻¹) для нейтральных условий. Спектры ЯМР регистрировали на приборе Bruker AVANCE III 500 МГц или 600 МГц. Спектры нормализовали относительно сигналов остаточного растворителя. Следующие сокращения использовали для мультиплетностей: с=синглет, д=дублет, т=триплет, кв=квартет, квинт.=квинтет.

Химические препараты

Все химические вещества были приобретены у коммерческих поставщиков и использовались без дальнейшей очистки. VTZ043 (1) и PBTZ169 (2) синтезировали по аналогии с известными способами получения, как подробно описано в WO 2007/134625 A1, WO 2009/010163 A1 и WO 2012/066518 A1.

5 Реакции осуществляли в атмосфере инертного газа (аргон) с использованием методики Шленка. Ацетонитрил, тетрагидрофуран и диэтиловый эфир использовали из системы очистки растворителя PureSolv MD-7 EN от Innovate Technology. Этилацетат, ацетонитрил и воду дегазировали при помощи трех циклов охлаждения-откачка-нагревание.

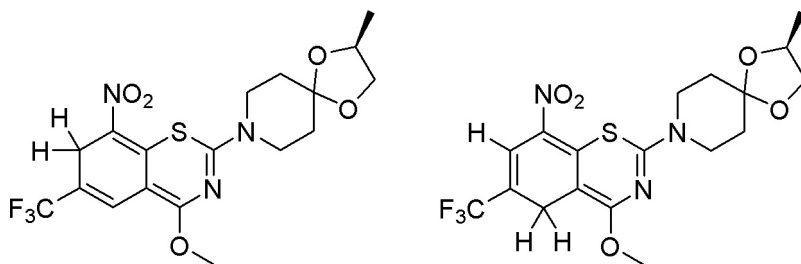


Смесь соединений **5a/b**: VTZ043 (200 мг, 464 мкмоль) растворяли в смеси ацетонитрила и воды (5 мл, 4:1) и медленно добавляли боргидрид натрия до тех пор, пока исходный продукт не исчезал в анализе ТСХ. Осадки, образовавшиеся в ходе реакции, последовательно растворяли путем добавления дополнительного количества воды. TFA медленно добавляли до тех пор, пока не прекращалось осаждение темно-красного твердого вещества. Смесь центрифугировали и супернатант отбрасывали. Остаток промывали водой (2 × 5 мл) и ацетонитрилом (2 × 5 мл) и сушили в высоком вакууме с получением неочищенной смеси, которая в основном содержала **5a/b** (175 мг, **5a**: **5b** ≈ 7: 3, примерно 404 мкмоль, примерно 87%). Это вещество использовали без дальнейшей очистки для последующей химической дериватизации.

¹H ЯМР (500 МГц; ТГФ-D8): δ=1,25 (д, 3H, ³J_{HFF}=6,1 Гц, (CH₃)-CH), 1,77-1,88 (м, 4H, CH₂-C(O)₂-CH₂), 3,46 (т, 1H, ³J_{HFF}=7,8 Гц, O-CH₂), 3,56 (м, 0,6 H, CH₂-C-CF₃), 3,73 (м, 1,4 H, CH₂-C-NO₂), 3,88-4,04 (м, 4H, (CH₂)₂-N), 4,09 (дд, 1H, ²J_{HFF}=5,7 Гц, ³J_{HFF}=7,9 Гц, O-CH₂), 4,26 (м, 1H, CH₃-CH), 7,08 (ст, 0,7 H, ³J_{HFF}=1,5 Гц, CH-C-NO₂), 7,32 (м, 0,3 H, CH-C-CF₃)

35 млн.д. МС (ЖХ-ESI⁺) **5a**: m/z(%)=434 [M+H]⁺ (100), 867 [2M+H]⁺ (5); **5b**: m/z(%)=432 [M+H]⁺ (100), 867 [2M+H]⁺ (5). МСВР (ESI⁺) рассчитано для C₁₇H₁₉F₃O₅N₃S⁺: 434,0992; найдено: **5a**: 434,0988, **5b**: 434,0988.

Соединение **5b**: В параллельном эксперименте аналитические образцы соединения **5b** (стандартный образец) получали при помощи препаративной ВЭЖХ неочищенного реакционного продукта **5a/b** (перед осаждением TFA) в кислых условиях (15-70% ацетонитрила в течение 40 мин). Вещество было относительно стабильным, когда все растворители немедленно удаляли и сухой продукт хранили в атмосфере инертного газа. В растворе происходило быстрое окисление, особенно в присутствии атмосферного кислорода. Было обнаружено, что полное извлечение желаемого соединения является критическим даже в надлежащих инертных условиях обработки.



6a

6b

Соединения **6a/b**: Смесь соединений **5a/b** (175 мг, примерно 404 мкмоль) растворяли в ацетонитриле (8 мл), медленно добавляли диметилсульфат (140 мкл, 186 мг, 1,48 ммоль) и триэтиламин (200 мкл, 146 мг, 1,44 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 70 мин и еще 60 минут после добавления метанола (200 мкл, 158 мг, 4,93 ммоль). Красный раствор разбавляли этилацетатом (30 мл) и промывали хлористоводородной кислотой (2 × 50 мл, 2 М). Органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали досуха. Остаток растворяли в ацетонитриле, центрифугировали и супернатант подвергали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия, 40-70% ацетонитрила в течение 60 мин) с получением чистого соединения **6a** (время удерживания=28 мин, 17 мг, 8%) и соединения **6b** (время удерживания=47 мин, 4 мг, 2%).

Соединение **6a**: ^1H ЯМР (500 МГц; CD_3CN): $\delta=1,25$ (д, 3H, $^3J_{\text{HHF}}=6,1$ Гц, $(\text{CH}_3)\text{-CH}$), 1,77-1,92 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})_2\text{-CH}_2$), 3,48 (т, 1H, $^3J_{\text{HHF}}=7,8$ Гц, O-CH_2), 3,66 (квинт., 2H, $^3J_{\text{HHF}}=1,6$ Гц, $\text{CH}_2\text{-C-NO}_2$), 3,77-4,16 (м, 4H, $(\text{CH}_2)_2\text{-N}$), 3,92 (с, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 4,10 (дд, 1H, $^2J_{\text{HHF}}=5,8$ Гц, $^3J_{\text{HHF}}=8,1$ Гц, $\text{O-CH}'_2$), 4,28 (м, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 6,99 (ст, 1H, $^3J_{\text{HHF}}=1,6$ Гц, CH-C-CF_3) млн.д. ^{13}C ЯМР (125,8 МГц; CD_3CN): $\delta=18,8$ (1C, $\text{CH}_3\text{-C}$), 28,3 (1C, $\text{CH}_2\text{-C-NO}_2$), 35,5 (1C, $\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})_2$), 36,7 (1C, $\text{C}'\text{H}_2\text{-C}(\text{O})_2$), 45,8 (1C, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$), 55,8 (1C, $\text{CH}_3\text{-O}$), 71,5 (1C, $\text{CH}_2\text{-O}$), 73,4 (1C, CH-CH_3), 92,6 (1C, C=C-O), 107,3 (1C, $\text{C}(\text{O})_2$), 119,7 (1C, $^2J_{\text{CF}}=31,5$ Гц, C-CF_3), 122,7 (1C, $^3J_{\text{CF}}=6,3$ Гц, CH-C-CF_3), 122,8 (1C, C-C-NO_2), 125,2 (1C, $^1J_{\text{CF}}=269,8$ Гц, CF_3), 146,3 (1C, C-NO_2), 165,2 (1C, S-C=N), 166,1 (1C, C=C-O) млн.д. МС (ЖХ-ESI $^+$): $m/z(\%)=448$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (100), 895 [$2\text{M}+\text{H}$] $^+$ (5). МСВР (ESI $^+$) рассчитано для $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{O}_5\text{N}_3\text{S}^+$: 448,1149; найдено: 448,1149.

Соединение **6b**: ^1H ЯМР (500 МГц; CD_3CN): $\delta=1,25$ (д, 3H, $^3J_{\text{HHF}}=6,1$ Гц, $(\text{CH}_3)\text{-CH}$), 1,77-1,92 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})_2\text{-CH}_2$), 3,48 (т, 1H, $^3J_{\text{HHF}}=7,9$ Гц, O-CH_2), 3,52 (квинт., 2H, $^3J_{\text{HHF}}=1,7$ Гц, $\text{CH}_2\text{-C-CF}_3$), 3,77-4,20 (м, 4H, $(\text{CH}_2)_2\text{-N}$), 3,99 (с, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 4,10 (дд, 1H, $^2J_{\text{HHF}}=5,8$ Гц, $^3J_{\text{HHF}}=8,0$ Гц, $\text{O-CH}'_2$), 4,28 (м, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 7,29 (ст, 1H, $^3J_{\text{HHF}}=1,6$ Гц, CH-C-NO_2) млн.д. ^{13}C ЯМР (125,8 МГц; CD_3CN): $\delta=18,8$ (1C, $\text{CH}_3\text{-C}$), 25,4 (1C, $\text{CH}_2\text{-C-CF}_3$), 35,4 (1C, $\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})_2$), 36,6 (1C, $\text{C}'\text{H}_2\text{-C}(\text{O})_2$), 45,8 (1C, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$), 56,5 (1C, $\text{CH}_3\text{-O}$), 71,6 (1C, $\text{CH}_2\text{-O}$), 73,4 (1C, CH-CH_3), 98,4 (1C, C=C-O), 107,2 (1C, $\text{C}(\text{O})_2$), 114,9 (1C, $^2J_{\text{CF}}=31,5$ Гц, C-CF_3), 121,1 (1C, C-C-NO_2), 124,2 (1C, $^3J_{\text{CF}}=6,4$ Гц, CH-C-CF_3), 125,3 (1C, $^1J_{\text{CF}}=269,8$ Гц, CF_3), 149,0

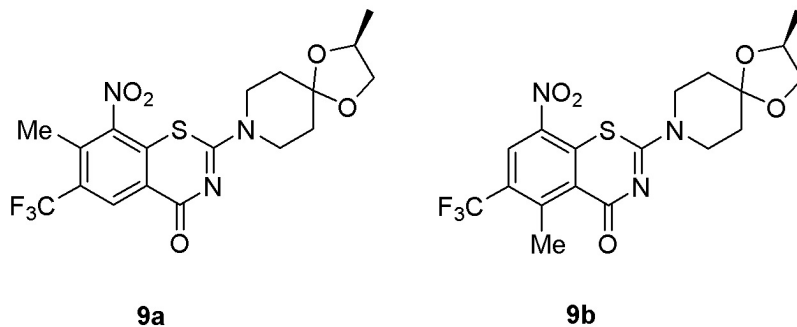
(1C, C-NO₂), 167,1 (1C, S-C=N), 169,5 (1C, C=C-O) млн.д. МС (ЖХ-ESI⁺): $m/z(\%)=448$ [M+H]⁺ (100), 895 [2M+H]⁺ (5). МСВР (ESI⁺) рассчитано для C₁₈H₂₁F₃O₅N₃S⁺: 448,1149; найдено: 448,1142.

5 Соединения 9a/b нового примера формулы (I) синтезировали в соответствии со способами, которые в основном аналогичны описанному выше способу.

Общая процедура:

Незамещенный бензотиазинон (0,46 ммоль; VTZ043 или PBTZ169) растворяли в безводн. ТГФ (5-10 мл), охлаждали до -78°C и добавляли по каплям раствор соответствующего металлоорганического реагента (1,6-2,2 экв.). При использовании литийорганического соединения раствор бензотиазинона в ТГФ добавляли к предварительно образованному металлоорганическому соединению. После завершения добавления смесь перемешивали в течение 1-18 часов. Добавляли DDQ (1,7-2,3 экв.) и смесь перемешивали в течение 3 часов при 0°C. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (100 мл), промывали насыщ. NaHCO₃ (4 × 75 мл), водой (75 мл) и насыщенным соевым раствором (75 мл). Органический раствор сушили при помощи Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Очистку остатка осуществляли колоночной хроматографией (SiO₂, петролейный эфир - EtOAc или петролейный эфир - DCM - ацетон).

20 Пример 9a и Пример 9b:



Соединения 9a/b. К раствору соединения 1 (146 мг, 0,34 ммоль) в диэтиловом эфире (3 мл) и тетрагидрофуране (3 мл) медленно добавляли MeMgBr (340 мкл, 0,34 ммоль, 1 М, в дибутиловом эфире). Раствор перемешивали в течение двух часов при комнатной температуре, добавляли воду (5 мл) и смесь экстрагировали этилацетатом (2 × 35 мл), сушили сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в метаноле и очищали препаративной ВЭЖХ (10%-100% ацетонитрила в течение 10 мин) с получением соединения 9a (20 мг, 13%) и 9b (5 мг, 3%).

Альтернативно, следуя общей процедуре, используя MeMgBr (0,3 М в ТГФ), получали 40 мг (19%, 0,09 ммоль) соединения 9b и 27 мг (13%, 0,06 ммоль) соединения 9a в виде светло-желтого твердого вещества.

Соединение Примера 9a ((S)-7-Метил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4H-1,3-бензотиазин-4-он):

¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ=1,27 (д, J=6,2 Гц, 3H, (CH₃)-CH), 1,78-1,83 (м, 4H, CH₂-C(O)₂-CH₂), 2,48 (д, J=1,0 Гц, 3 H, CH₃-C), 3,46 (т, J=7,8 Гц, 1H, O-CH₂), 3,79 (шир.с, 2H, (CH₂)₂-N), 4,07 (дд, J=8,0, 5,9 Гц, 1H, O-CH'₂), 4,11-4,30 (м, 3H, (CH₂)₂-N, CH₃-CH), 8,81 (с, 1H, CH-C-CF₃).

^{13}C -ЯМР (75 МГц, CDCl_3): $\delta=14,7$ (кв., $J=2,6$ Гц), 18,2, 35,1, 36,2, 44,6 (шир.), 70,8, 72,4, 106,2, 122,2, 122,6 (кв., $J=274,8$ Гц), 129,51 (кв., $J=32,1$ Гц), 129,53 (кв., $J=6,1$ Гц), 134,0, 148,5, 159,3, 166,6.

5 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: 446,0992; найдено: 446,0995.

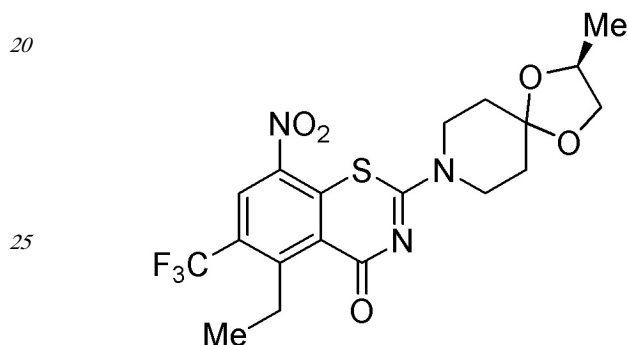
Пример 9b ((*S*)-5-Метил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4*H*-1,3-бензотиазин-4-он):

^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): $\delta=1,28$ (д, $J=6,2$ Гц, 3H, $(\text{CH}_3)\text{-CH}$), 1,77-1,84 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})_2\text{-CH}_2$), 2,83 (с, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}$), 3,47 (т, $J=7,8$ Гц, 1H, O-CH_2), 3,74-4,05 (шир.с, 4H, $(\text{CH}_2)_2\text{-N}$), 4,09 (дд, $J=8, 5,7$ Гц, 1H, $\text{O-CH}'_2$), 4,21-4,31 (м, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 8,64 (с, 1H, CH-C-CF_3).

^{13}C -ЯМР (75 МГц, CDCl_3): $\delta=18,3$ (кв., $J=2,2$ Гц), 35,1 (шир.), 36,2 (шир.), 44,5 (шир.), 70,8, 72,4, 106,3, 117,3, 121,0, 122,8 (кв., $J=274,2$ Гц), 124,6 (кв., $J=6,6$ Гц), 129,4 (кв., $J=31$ Гц), 133,5, 141,7, 147,0, 160,1, 169,7.

15 МСВР (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: 446,0992; найдено: 446,0996.

Пример 10 ((*S*)-5-Этил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4*H*-1,3-бензотиазин-4-он):



30 Следуя общей процедуре, используя **VTZ043** и EtMgBr (0,3 М в ТГФ), получали 31 мг (15%, 0,07 ммоль) указанного в заголовке соединения в виде светло-желтого твердого вещества.

^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): $\delta=1,25$ (д, $^3J_{\text{HHF}}=7,7$ Гц, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 1,29 (д, $J=5,9$ Гц, 3H, $(\text{CH}_3)\text{-CH}$), 1,73-1,90 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})_2\text{-CH}_2$), 3,41-3,51 (м, 3H, $\text{CH}_2\text{-C, O-CH}'_2$), 3,95 (шир.с, 4H, $(\text{CH}_2)_2\text{-N}$), 4,09 (дд, $J=8,0, 5,7$ Гц, 1H, $\text{O-CH}'_2$), 4,22-4,32 (м, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 8,65 (с, 1H, CH-C-CF_3).

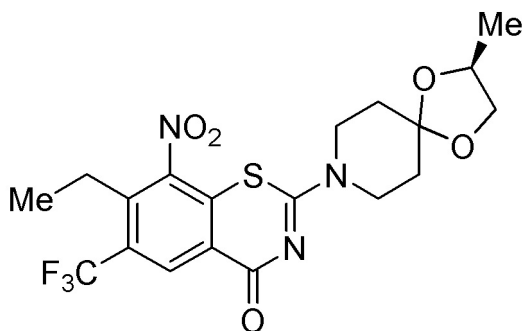
40 ^{13}C -ЯМР (75 МГц, CDCl_3): $\delta=16,2, 18,3, 23,2$ (д, $J=1,7$ Гц), 35,1 (шир.), 36,3 (шир.), 44,7 (шир.), 70,8, 72,4, 106,4, 122,9 (кв., $J=274,8$ Гц), 124,9 (кв., $J=6,1$ Гц), 128,8 (кв., $J=31,5$ Гц), 129,9, 133,8, 142,2, 153,0, 159,9, 170,1.

МСВР (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: 460,1149; найдено: 460,1151.

Пример 11 ((*S*)-7-Этил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4*H*-1,3-бензотиазин-4-он):

45

5



10

Следуя общей процедуре, используя ВТЗ043 и EtMgBr (0,3 М в ТГФ), получали 32 мг (15%, 0,07 ммоль) указанного в заголовке соединения в виде не совсем белого твердого вещества.

15

^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ =1,25 (д, J =7,2 Гц, 3H, CH_3 - CH_2), 1,29 (д, J =6,2 Гц, 3H, (CH_3) -CH), 1,75-1,88 (м, 4H, CH_2 - $\text{C}(\text{O})_2$ - CH_2), 2,88 (кв., J =7,4 Гц, 2H, CH_3 - CH_2), 3,48 (т, J =7,8 Гц, 1H, O- CH_2), 3,70-4,32 (м, 6H, $(\text{CH}_2)_2$ -N, O- CH'_2 , CH_3 -CH), 8,86 (с, 1H, CH-C- CF_3).

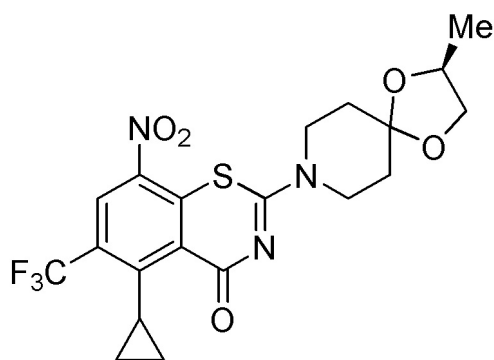
20

^{13}C -ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ =15,2 (д, J =1,1 Гц), 18,3, 22,2 (д, J =2,2 Гц), 35,1 (шир.), 36,3 (шир.), 44,7 (шир.), 70,9, 72,5, 106,3, 117,6, 122,3, 123,8 (кв., J =274,2 Гц), 129,4 (кв., J =32,1 Гц), 130,0 (кв., J =5,7 Гц), 139,4, 148,8, 159,3, 166,7.

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: 460,1149; найдено: 460,1151.

Пример 12 ((*S*)-5-Циклопропил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4*H*-1,3-бензотиазин-4-он):

25



30

35

Следуя общей процедуре, используя ВТЗ043 и циклопропилмагний бромидом (0,5 М в ТГФ), получали 42 мг (19%, 0,09 ммоль) указанного в заголовке соединения в виде светло-желтого твердого вещества.

40

^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ =0,57 (кв., J =5,9 Гц, 2H, CH_2 - CH_2), 1,18-1,25 (м, 2H, CH'_2 - CH_2), 1,29 (д, J =5,9 Гц, 3H, (CH_3) -CH), 1,75-1,88 (м, 4H, CH_2 - $\text{C}(\text{O})_2$ - CH_2), 2,47-2,57 (м, 1H, CH_2 -CH- CH_2), 3,48 (т, J =8,0 Гц, 1H, O- CH_2), 3,96 (шир.с, 4H, $(\text{CH}_2)_2$ -N), 4,09 (дд, J =8,0, 5,7 Гц, 1H, O- CH'_2), 4,22-4,32 (м, 1H, (CH_3) -CH), 8,61 (с, 1H, CH-C- CF_3).

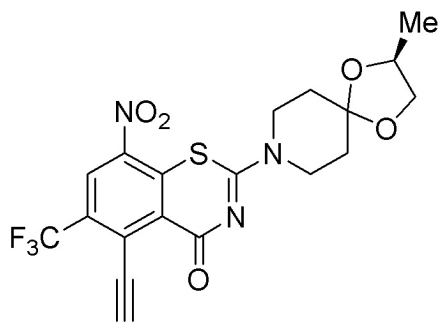
45

^{13}C -ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ =9,4, 14,7, 18,3, 35,1 (шир.), 36,3 (шир.), 44,7 (шир.), 70,8, 72,4, 106,3, 122,3 (кв., J =275,3 Гц), 124,8 (кв., J =6,1 Гц), 131,8 (кв., J =32,6 Гц), 132,5, 132,9, 141,4, 151,4, 159,9, 170,0.

МСВР (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: 472,1149; найдено: 472,1153.

Пример 13 ((*S*)-5-Этинил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-

6-(трифторметил)-4*H*-1,3-бензотиазин-4-он):



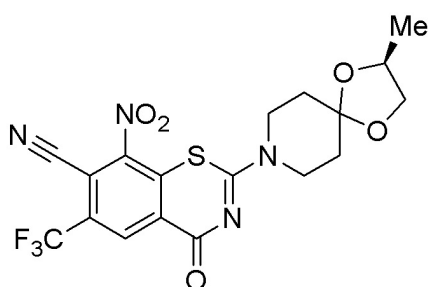
Следуя общей процедуре, используя [2-(триметилсилил)этинил]-литий и **BTZ043** 45 мг (19%, 0,09 ммоль), получали светло-коричневое масло, 25 мг которого (0,05 ммоль) растворяли в ТГФ (1 мл) и MeOH (1 мл), добавляли KF (8,3 мг, 0,14 ммоль) и смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 1,5 часов. Смесь разбавляли этилацетатом (15 мл), промывали полунасыщенным раствором NaHCO₃ (2 × 10 мл), насыщенным соевым раствором (10 мл) и сушили при помощи Na₂SO₄. После концентрирования при пониженном давлении остаток очищали колоночной хроматографией (SiO₂, петролейный эфир - DCM - ацетон, 4:4:1) с получением 20 мг (93%, 0,044 ммоль) светочувствительного серого твердого вещества.

¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ=1,30 (д, *J*=5,9 Гц, 3H, (CH₃)-CH), 1,76-1,89 (м, 4H, CH₂-C(O)₂-CH₂), 3,49 (т, *J*=7,8 Гц, 1H, O-CH₂), 3,80-4,33 (м, 7H, (CH₂)₂-N, O-CH₂, ≡CH, (CH₃)-CH), 8,70 (с, 1H, CH-C-CF₃).

¹³C-ЯМР (75 МГц, CDCl₃): δ=18,3, 35,2 (шир.), 36,3 (шир.), 44,9 (шир.), 70,9, 72,5, 76,2, 96,6, 106,3, 121,9 (кв., *J*=274,8 Гц), 124,8 (кв., *J*=5,5 Гц), 127,4, 132,5, 133,2 (кв., *J*=32,6 Гц), 134,1, 142,2, 159,8, 167,3.

МСВР (ESI): *m/z* [M+H]⁺ рассчитано для C₁₉H₁₇F₃N₃O₅S: 456,0836; найдено: 456,0832.

Пример 14 ((*S*)-2-(2-Метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-4-оксо-6-(трифторметил)-4*H*-1,3-бензотиазин-7-карбонитрил):



Раствор **BTZ043** (200 мг, 0,46 ммоль) в безводном ТГФ (7 мл) охлаждали до -78°C и добавляли по каплям раствор *n*-Bu₄NCN (157 мг, 0,56 ммоль) в безводном ТГФ (3 мл). После завершения добавления смесь перемешивали в течение 1 часа при -78°C и затем добавляли DDQ (175 мг, 0,77 ммоль). Смесь нагревали до 0°C и перемешивали в течение 18 часов. После разбавления этилацетатом (100 мл) смесь промывали насыщ. раствором NaHCO₃ (4 × 50 мл), насыщенным соевым раствором (50 мл) и сушили при помощи Na₂SO₄. После концентрирования при пониженном давлении остаток очищали колоночной хроматографией (SiO₂, петролейный эфир - DCM - ацетон, 5:5:1 и CHCl₃ -

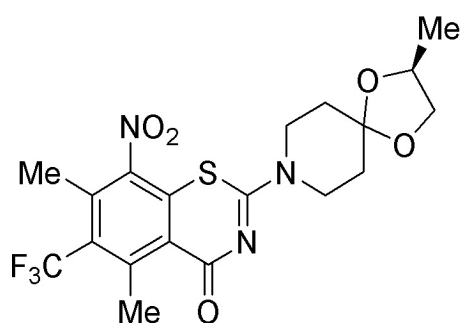
MeOH, 50/1) и перекристаллизовывали из MeCN, с получением 50 мг (24%, 0,11 ммоль) указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*₆): δ=1,22 (д, *J*=6,0 Гц, 3H, (CH₃)-CH), 1,80 (шир.с, 4H, CH₂-C(O)₂-CH₂), 3,45 (т, *J*=7,7 Гц, 1H, O-CH₂), 3,88 (шир.с, 2H, (CH₂)₂-N), 3,98 (шир.с, 2H, (CH₂)₂-N), 4,10 (дд, *J*=8,0, 5,8 Гц, 1H, O-CH₂'), 4,22-4,28 (м, 1H, (CH₃)-CH), 8,81 (с, 1H, CH-C-CF₃).

¹³C-ЯМР (125 МГц, DMSO-*d*₆): δ=18,3, 34,4 (шир.), 35,7 (шир.), 44,3 (шир.), 44,8 (шир.), 70,0, 71,8, 106,0, 109,3, 111,1, 121,5 (кв., *J*=274,3 Гц), 128,3, 130,2 (кв., *J*=33,3 Гц), 130,3 (кв., *J*=4,9 Гц), 134,9, 147,8, 160,5, 164,6.

МСВР (ESI): *m/z* [M+H]⁺ рассчитано для C₁₈H₁₆F₃N₄O₅S: 457,0788; найдено: 457,0788

Пример 15 ((*S*)-5,7-Диметил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4*H*-1,3-бензотиазин-4-он):



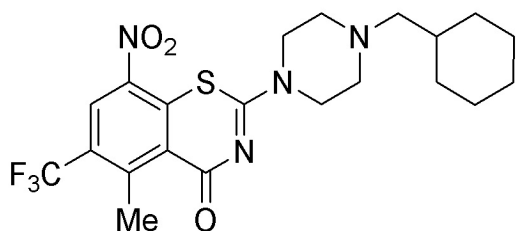
Следуя общей процедуре, используя соединение **9a** (207 мг, 0,46 ммоль) и MeMgBr (3 М в ТГФ), получали 25 мг (11,7%, 0,05 ммоль) указанного в заголовке соединения в виде не совсем белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ=1,29 (д, *J*=5,9 Гц, 3H, (CH₃)-CH), 1,75-1,82 (м, 4H, CH₂-C(O)₂-CH₂), 2,46 (кв., *J*=3,3 Гц, 3H, -CH₃), 2,80 (кв., *J*=3,3 Гц, 3H, -CH₃), 3,47 (т, *J*=7,8 Гц, 1H, O-CH₂'), 3,82 (шир.с, 2H, (CH₂)₂-N), 4,00 (шир.с, 2H, (CH₂)₂-N), 4,09 (дд, *J*=8,0, 5,7 Гц, 1H, (CH₃)-CH), 4,21-4,32 (м, 1H, CH-C-CF₃).

¹³C-ЯМР (75 МГц, CDCl₃): δ=16,1 (кв., *J*=5,2 Гц), 18,3, 19,3 (кв., *J*=5,0 Гц), 35,1 (шир.), 36,3 (шир.), 70,8, 72,4, 106,4, 124,3 (кв., *J*=277,5 Гц), 126,8, 128,2, 129,9 (кв., *J*=29,3 Гц), 132,2 (д, *J*=1,1 Гц), 143,6, 147,6, 157,7, 169,6.

МСВР (ESI): *m/z* [M+H]⁺ рассчитано для C₁₉H₂₁F₃N₃O₅S: 460,1149; найдено: 460,1143.

Пример 16 (2-(4-(Циклогексилметил)пиперазин-1-ил)-5-метил-8-нитро-6-(трифторметил)-4*H*-1,3-бензотиазин-4-он):



Следуя общей процедуре, используя **PBTZ169** (CAS [1377239-83-2]) и MeMgCl (3 М в ТГФ), получали 53 мг (24%, 0,11 ммоль) указанного в заголовке соединения в виде

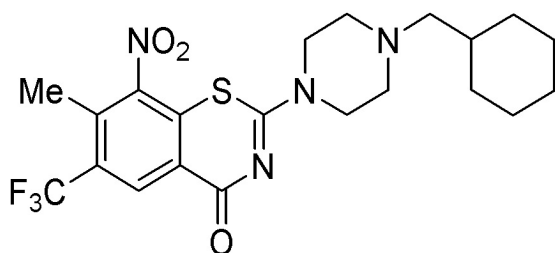
оранжевого твердого вещества.

^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): $\delta=0,80-0,93$ (м, 2Н, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1,09-1,31 (м, 3Н, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1,40-1,55 (м, 1Н, CH'_2), 1,64-1,78 (м, 5Н, $2 \times \text{CH}_2$, CH'_2), 2,16 (д, $J=7,2$ Гц, 2Н, CH_2), 2,49 (т, $J=4,9$ Гц, 4Н, $(\text{CH}_2)_2\text{-N}$), 2,86 (д, $J=1,3$ Гц, 3Н, $\text{CH}_3\text{-C}$), 3,90 (шир.с, 4Н, $(\text{CH}_2)_2\text{-N}$), 8,66 (с, 1Н, CH-C-CF_3).

^{13}C -ЯМР (75 МГц, CDCl_3): $\delta=18,3$, 26,0, 26,7, 31,7, 35,0, 46,9 (шир.), 53,0 (шир.), 65,1, 122,8 (кв., $J=274,8$ Гц), 124,7 (кв., $J=6,1$ Гц), 129,6 (кв., $J=31,5$ Гц), 130,2, 133,5, 141,7, 147,1, 160,4, 169,7.

МСВР (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$: 471,1672; найдено: 471,1678.

Пример 17 (2-(4-(Циклогексилметил)пиперазин-1-ил)-7-метил-8-нитро-6-(трифторметил)-4H-1,3-бензотиазин-4-он):



Следуя общей процедуре, используя **PBTZ169** (CAS [1377239-83-2]) и MeMgCl (3 М в ТГФ), получали 85 мг (39%, 0,18 ммоль) указанного в заголовке соединения в виде оранжевого твердого вещества.

^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): $\delta=0,79-0,92$ (м, 2Н, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1,09-1,31 (м, 3Н, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1,41-1,58 (м, 1Н, CH'_2), 1,63-1,81 (м, 5Н, $2 \times \text{CH}_2$, CH'_2), 2,16 (д, $J=7,2$ Гц, 2Н, CH_2), 2,47-2,53 (м, 7Н, $\text{CH}_3\text{-C}$, $2 \times \text{CH}_2$), 3,72 (шир.с, 2Н, $\text{CH}_2\text{-N}$), 4,10 (шир.с, 2Н, $\text{CH}_2\text{-N}$), 8,85 (с, 1Н, CH-C-CF_3).

^{13}C -ЯМР (75 МГц, CDCl_3): $\delta=14,8$, 26,0, 26,7, 31,6, 34,9, 46,7 (шир.), 52,9 (шир.), 65,0, 122,4, 122,7 (кв., $J=274,2$ Гц), 129,5 (кв., $J=32,1$ Гц), 129,7 (кв., $J=5,5$ Гц), 129,73, 134,0, 148,5, 159,7, 166,6.

МСВР (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$: 471,1672; найдено: 471,1678.

Биоаналитические процедуры

Все эксперименты на животных осуществляли в АТРС (Токсикологический исследовательский центр Ауригон, Дунакеси, Венгрия).

Образцы плазмы карликовых свиней: Карликовые свиньи получали пероральные дозы 360 мг/кг VTZ043. Кровь собирали через 2 часа после введения композиции соединения, немедленно охлаждали на льду и центрифугировали при 4°C и 3000 об/мин с получением аликвот плазмы, которые мгновенно замораживали и хранили при -80°C . Аликвоты плазмы (50 мкл) смешивали с ацетонитрилом (200 мкл) на льду и в инертных условиях (Don Whitley Scientific, анаэробная рабочая станция), встряхивали, обрабатывали в ультразвуковой ванне (3-5 сек) и центрифугировали при 4°C и 9750 об/мин. Супернатанты концентрировали под потоком азота до остаточного объема примерно 40 мкл и анализировали при помощи ВЭЖХ и ЖХ-МСВР.

Образцы плазмы крысы: Самка породы Wistar получала пероральные дозы 170 мг/кг VTZ043. Кровь собирали ($\text{K}_3\text{-EDTA}$) через 2 часа после введения композиции

соединения под анестезией изофлураном, немедленно охлаждали на льду и центрифугировали при 4°C и 3000 об/мин с получением аликвот плазмы, которые мгновенно замораживали и хранили при -80°C. Аликвоты плазмы (50 мкл) смешивали с ацетонитрилом (200 мкл) на льду и в инертных условиях (Don Whitley Scientific, анаэробная рабочая станция), встряхивали, обрабатывали в ультразвуковой ванне (3-5 сек) и центрифугировали при 4°C и 9750 об/мин. Супернатанты концентрировали под потоком азота до остаточного объема примерно 40 мкл и анализировали при помощи ВЭЖХ и ЖХ-МСВР.

Анализ свежей крови

Человек: Получали раствор BTZ043 в DMSO (5 мг/мл) и 1 мкл этого раствора добавляли к 1 мл аликвотам свежей цельной крови. Смеси встряхивали при 37°C в течение 2 часов или 16 часов и центрифугировали при 4°C и 3000 об/мин с получением плазмы. Образцы плазмы (60 мкл) смешивали с ацетонитрилом (240 мкл) на льду, встряхивали, обрабатывали в ультразвуковой ванне (3-5 сек) и центрифугировали при 4°C и 9750 об/мин. Супернатанты концентрировали под потоком азота до остаточного объема примерно 40 мкл и анализировали при помощи ВЭЖХ и ЖХ-МСВР.

Мыши: свежую цельную кровь собирали у мышей C57BL/6J после цервикальной дислокации под анестезией изофлураном. Растворы исследуемого вещества получали в DMSO (5 мг/мл) и 0,4 мкл этого раствора добавляли к 400 мкл свежей цельной крови. Смеси инкубировали при 37°C в течение 4 часов и центрифугировали при 4°C и 3000 об/мин с получением плазмы. Образцы плазмы (50 мкл) смешивали с ацетонитрилом (200 мкл) на льду, встряхивали, обрабатывали в ультразвуковой ванне (3-5 сек) и центрифугировали при 4°C и 9750 об/мин. Супернатанты концентрировали под потоком азота до остаточного объема примерно 40 мкл и анализировали при помощи ВЭЖХ и ЖХ-МСВР.

Анализ дрожжей: свежие коммерческие пекарские дрожжи (влажная масса 200 мг) суспендировали в калий-фосфатном буфере (рН 7,5, 100 мМ) в анаэробных условиях (Don Whitley Scientific, анаэробная рабочая станция) и добавляли раствор BTZ043 в DMSO (5 мкл, 5 мг/мл). Смесь инкубировали при 37°C в течение 5 мин, смешивали с ацетонитрилом (200 мкл) на льду и центрифугировали при 4°C и 9750 об/мин. Супернатанты концентрировали под потоком азота до остаточного объема примерно 40 мкл и анализировали при помощи ВЭЖХ. См. Фиг. 4.

Образование соответствующего гидридного комплекса Мейзенгеймера (НМС)

Свежую цельную кровь собирали у мышей C57BL/6J после эвтанази. Растворы исследуемого вещества получали в DMSO (типично 10 мг/мл, менее растворимые соединения меньше) и 0,5 мкл каждого раствора добавляли к 300 мкл аликвотам свежей цельной крови в инертных условиях (Glovebox, <20 м.д. O₂). Смеси инкубировали при 37°C в течение 4 часов (750 об/мин) и центрифугировали при 4°C и 3000 об/мин с получением плазмы. Аликвоты плазмы (25 мкл) хранили при -45°C и оттаивали не ранее чем за 1,5 ч до измерения методом ЖХ-МСВР. Аликвоты немедленно смешивали с ацетонитрилом (75 мкл, содержащие 2,5 мкг·мл⁻¹ [D₄]-BTZ043 в качестве внутреннего стандарта) на льду, встряхивали и центрифугировали при 4°C и 16,1 krcf (относительное ускорение центрифуги). Супернатанты переносили в воздухонепроницаемые сосуды и анализировали при помощи ЖХ-МСВР. Все образцы получали в двух экземплярах. Образование гидридного комплекса Мейзенгеймера (НМС) рассчитывали как частное площади пика(ов) [M+2H+H]⁺ и суммы площадей пиков [M+H]⁺ и [M+2H+H]⁺ в соответствующих экстракционных ионных хроматограммах каждого исследуемого

вещества (окно 5 млн.д.). Образование соответствующего НМС рассчитывали как частное образования НМС каждого производного и образования НМС BTZ043 в одном и том же анализе.

Анализ микротитровального резазурина (REMA)

5 Анализ осуществляли, как описано ранее (Palomino et al.; Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Anticomb. Agents. Chemother. 46(8), 2720-2 (2002)). В качестве инокулята использовали 100 мкл бактериальной суспензии на лунку. 100 мкл серийных двукратных разведений рабочего раствора вещества вводили в каждое углубление стерильного полистирольного 96-луночного планшета с плоским дном (BD). Контроль роста без лекарств и контроль стерильности среды без МТВ включали в каждый планшет. Двести микролитров стерильной воды добавляли во все лунки по внешнему периметру, чтобы избежать испарения во время инкубации. Затем планшеты покрывали самоклеющимися мембранами и инкубировали при 37°C. Через 7 дней анализ окрашивали добавлением 15 30 мкл свежеприготовленного раствора 0,02% Резазурина (Sigma-Aldrich, Germany). Планшеты повторно инкубировали в течение дополнительных 24 часов при 37°C. Изменение цвета от синего (окисленное состояние) до розового (восстановленное состояние) указывало на рост бактерий, а МИС определяли как самую низкую концентрацию лекарственного средства, которая предотвращала это изменение цвета. 20 Каждую партию REMA планшетов проверяли на качество путем оценки диапазона МИС (4 мкг/мл - 63 пг/мл).

Определение цитотоксичности

Исследуемые вещества растворяли в DMSO (типично 10 мг/мл, менее растворимые соединения меньше). Растворы разбавляли в среде RPMI 1640. Клетки HeLa (DSM ACC 25 57) выращивали в RPMI 1640 и собирали в логарифмической фазе роста после мягкой трипсинизации с использованием 0,25% трипсина в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS), содержащем 0,02% этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA). Для каждого эксперимента примерно 10000 клеток высевали с 0,1 мл культуральной среды на лунку 96-луночного микропланшета. Клетки HeLa 30 предварительно инкубировали в течение 48 часов перед добавлением тестируемых соединений (конечная концентрация DMSO $\leq 0,5\%$), которые осторожно разбавляли на субконфлюэнтных монослоях. Затем осуществляли инкубацию во влажной атмосфере при 37°C и 5% CO₂. Прилипшие клетки HeLa фиксировали глутаральдегидом и окрашивали 0,05% раствором метиленового синего в течение 10 минут. После 35 осторожной промывки пятно элюировали 0,2 мл 0,33 N раствора HCl в лунках. Оптические плотности измеряли при 660 нм в микропланшет-ридере SUNRISE (TECAN).

Результаты описанных выше биоаналитических процедур представлены в Таблице 1:

40 Таблица 1

Соединение/Пример	МИС <i>Mtb</i> H37Rv [мкг/мл]	МИС <i>Mtb</i> (PDR) 12700 [мкг/мл]	МИС <i>M. marinum</i> [мкг/мл]	МИС <i>M. vaccae</i> 10670 [мкг/мл]	HeLa CC ₅₀ [мкг/мл]	Образование соответствующего НМС [%]
9a	0,5	0,25	0,25	0,039	38,9 (±0,9)	<0,07
9b	0,008	0,004	0,008	<0,0012	>50	5,26
16	0,0005	$\leq 0,000063$	0,001	<0,0012	>25	<0,04
PBTZ169	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	80,7
BTZ043	0,001	0,002	0,004	<0,0012	>50	100

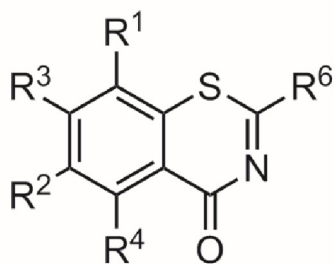
45 PDR=множественная лекарственная резистентность (изониазид и стрептомицин); н.о.=не определено

Ссылочные документы

1. Makarov, V., Manina, G., Mikusova, K., Möllmann, U., Ryabova, O., Saint-Joanis, B., Dhar, N., Pasca, M. R., Buroni, S., Lucarelli, A. P., Milano, A., De Rossi, E., Belanova, M., Bobovska, A., Dianiskova, P., Kordulakova, J., Sala, C., Fullam, E., Schneider, P., McKinney, J. D., Brodin, P., Christophe, T., Waddell, S., Butcher, P., Albrethsen, J., Rosenkrands, I., Brosch, R., Nandi, V., Bharath, S., Gaonkar, S., Shandil, R. K., Balasubramanian, V., Balganesht, T., Tyagi, S., Grosset, J., Riccardi, G. & Cole, S. T. Benzothiazinones Kill Mycobacterium tuberculosis by Blocking Arabinan Synthesis. *Science* 324, 801-804 (2009).
2. Zumla, A., Nahid, P. & Cole, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 388-404 (2013).
3. Makarov, V., Lechartier, B., Zhang, M., Neres, J., van der Sar, A. M., Raadsen, S. A., Hartkoorn, R. C., Ryabova, O. B., Vocat, A., Decosterd, L. A., Widmer, N., Buclin, T., Bitter, W., Andries, K., Pojer, F., Dyson, P. J. & Cole, S. T. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. *EMBO Mol. Med.* 6, 372-383 (2014).
4. Tiwari, R., Möllmann, U., Cho, S., Franzblau, S. G., Miller, P. A. & Miller, M. J. Design and Syntheses of Anti-Tuberculosis Agents Inspired by BTZ043 Using a Scaffold Simplification Strategy. *ACS Med. Chem. Lett.* 5, 587-591 (2014).
5. Batt, S. M., Jabeen, T., Bhowruth, V., Quill, L., Lund, P. A., Eggeling, L., Alderwick, L. J., Fütterer, K. & Besra, G. S. Structural basis of inhibition of Mycobacterium tuberculosis DprE1 by benzothiazinone inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11354-11359 (2012).
6. Trefzer, C., Skovierova, H., Buroni, S., Bobovska, A., Nenci, S., Molteni, E., Pojer, F., Pasca, M. R., Makarov, V., Cole, S. T., Riccardi, G., Mikusova, K. & Johnsson, K. Benzothiazinones are suicide inhibitors of mycobacterial decaprenylphosphoryl-beta-D-ribofuranose 2'-oxidase DprE1. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 912-915 (2012).
7. Neres, J., Pojer, F., Molteni, E., Chiarelli, L. R., Dhar, N., Boy-Röttger, S., Buroni, S., Fullam, E., Degiacomi, G., Lucarelli, A. P., Read, R. J., Zanoni, G., Edmondson, D. E., De Rossi, E., Pasca, M. R., McKinney, J. D., Dyson, P. J., Riccardi, G., Mattevi, A., Cole, S. T. & Binda, C. Structural Basis for Benzothiazinone-Mediated Killing of Mycobacterium tuberculosis. *Sci. Trans. Med.* 4, 150ra121-150ra121 (2012).
8. Anderson, J. C. & Koovits, P. J. An enantioselective tandem reduction/nitro-Mannich reaction of nitroalkenes using a simple thiourea organocatalyst. *Chem. Sci.* 4, 2897 (2013).
9. Khilyas, I. V., Ziganshin, A. M., Pannier, A. J. & Gerlach, R. Effect of ferrihydrite on 2,4,6-trinitrotoluene bitransformation by an aerobic yeast. *Biodegradation* 24, 631-644 (2013).
10. Tiwari, R., Moraski, G. C., Krchnak, V., Miller, P. A., Colon-Martinez, M., Herrero, E., Oliver, A. G. & Miller, M. J. Thiolates chemically induce redox activation of BTZ043 and related potent nitroaromatic anti-tuberculosis agents. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 3539-3549 (2013).
11. Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Anticomb. Agents. Chemother.* 46(8), 2720-2 (2002).

(57) Формула изобретения

1. Соединение формулы (I)



выбранное из группы, включающей

10 (S)-7-Метил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4Н-1,3-бензотиазин-4-он (**9a**),

(S)-5-Метил-2-(2-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан-8-ил)-8-нитро-6-(трифторметил)-4Н-1,3-бензотиазин-4-он (**9b**) и

15 2-(4-(Циклогексилметил)пиперазин-1-ил)-5-метил-8-нитро-6-(трифторметил)-4Н-1,3-бензотиазин-4-он (**16**).

2. Фармацевтическая композиция, обладающая активностью против штаммов *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и (PDR) 12700, *M. Marinum*, *M. Vaccae* 10670, включающая терапевтически эффективное количество соединения по п. 1 и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов.

20 3. Применение соединения по п. 1 для терапевтического или профилактического лечения микобактериальной инфекции у млекопитающих.

4. Применение по п. 3, где микобактериальная инфекция представляет собой туберкулез или лепрозную инфекцию.

25

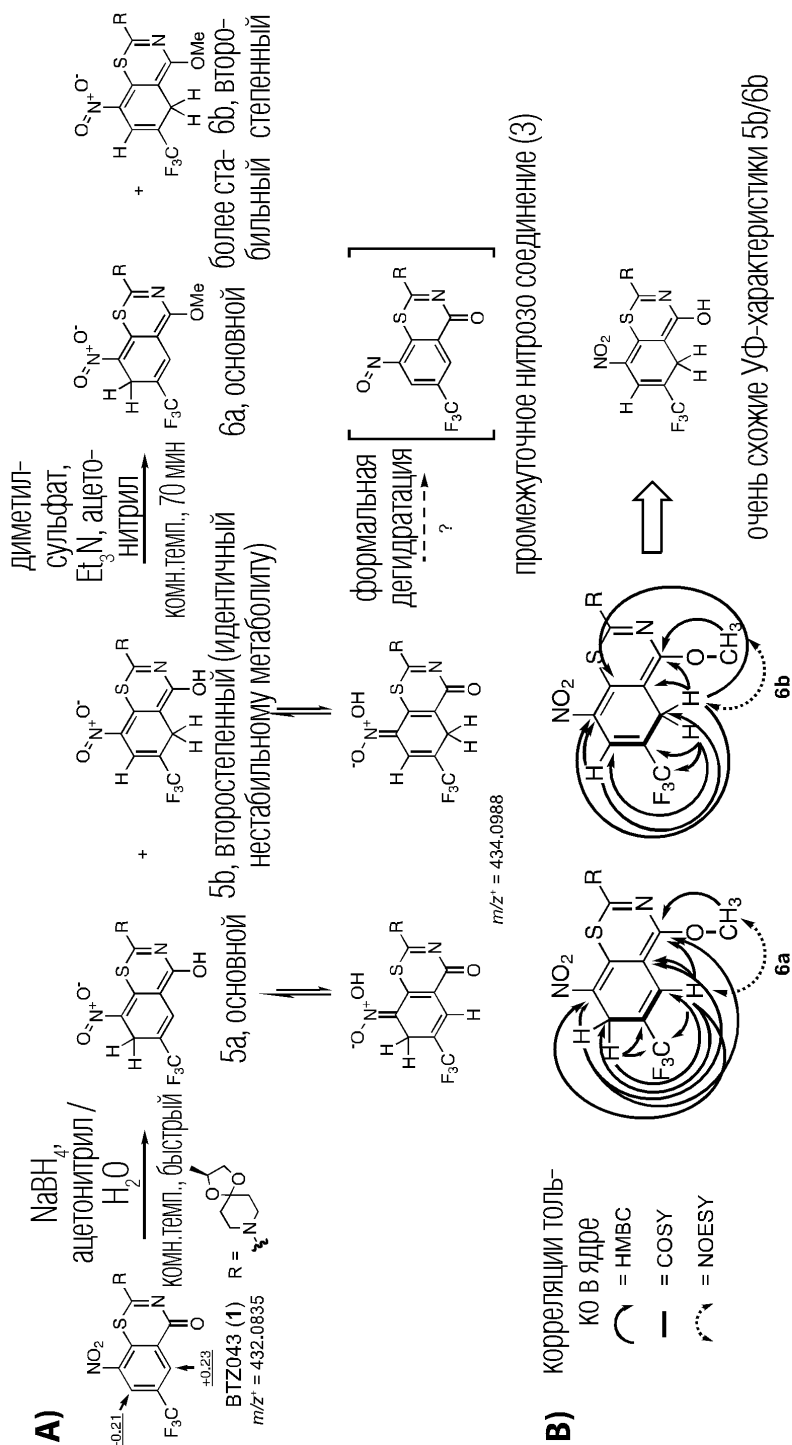
30

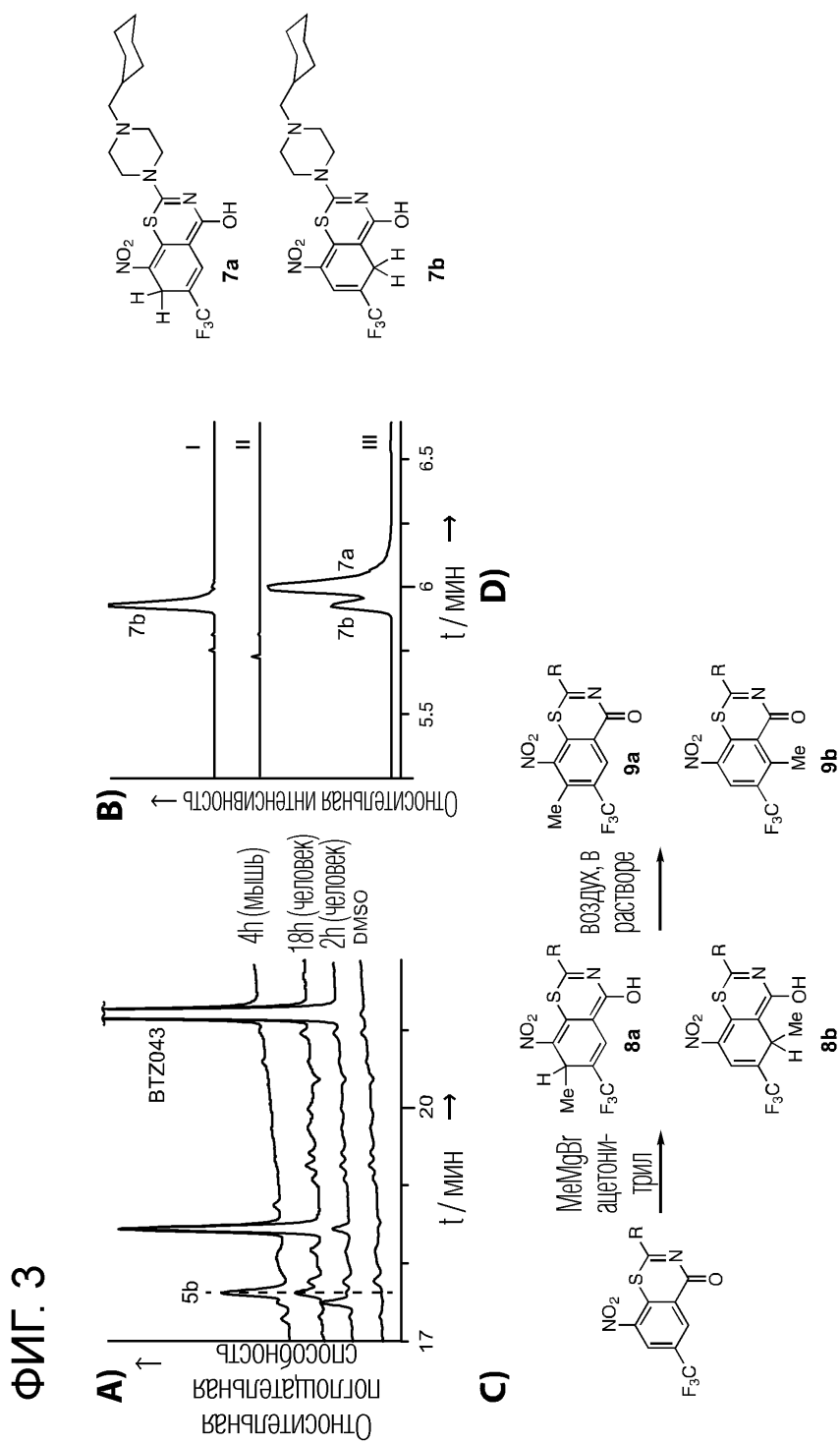
35

40

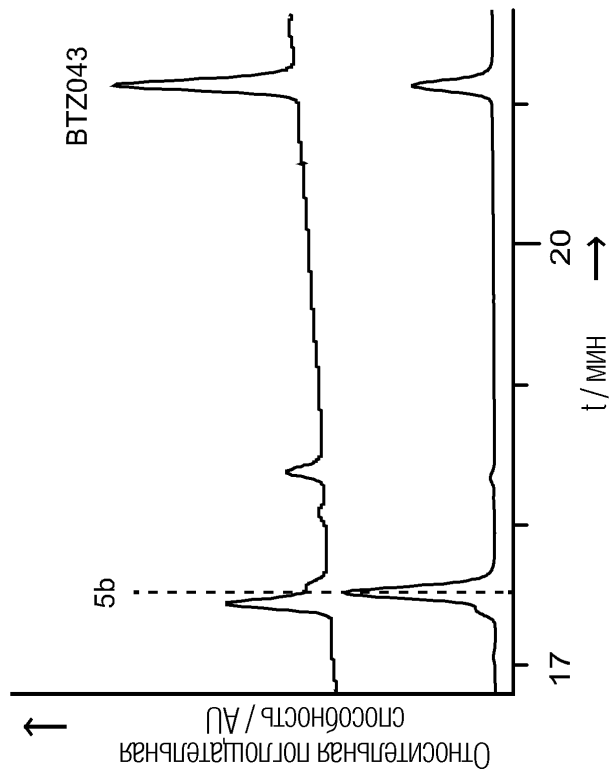
45

ФИГ. 2





4/4



ФИГ. 4