

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034548**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.19

(51) Int. Cl. **C07D 417/02** (2006.01)
A61K 31/427 (2006.01)

(21) Номер заявки
201900083

(22) Дата подачи заявки
2017.07.24

(54) **2-АЦЕТИЛ-6-(2-(2-(4-БРОМБЕНЗИЛИДЕН)ГИДРАЗНИЛ)ТИАЗОЛ-4-ИЛ)-3,7,9-ТРИГИДРОКСИ-8,9b-ДИМЕТИЛДИБЕНЗО[b,d]ФУРАН-1(9bH)-ОН, ПРОЯВЛЯЮЩИЙ ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ В ОТНОШЕНИИ ФЕРМЕНТА ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1 ЧЕЛОВЕКА**

(31) **2016132716**

(32) **2016.08.08**

(33) **RU**

(43) **2019.07.31**

(86) **PCT/RU2017/000543**

(87) **WO 2018/030916 2018.02.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ИННОВАЦИОННЫЕ
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ
РАЗРАБОТКИ" (ООО "ИФАР") (RU)**

(56) ШТРО А.А. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Санкт-Петербург, 2014, с. 73-74, табл. 10, соединения 878-879 RU-C1-2483722

(72) Изобретатель:
**Лузина Ольга Анатольевна,
Захаренко Александра Леонидовна,
Соколов Дмитрий Николаевич,
Салахутдинов Нариман Фаридович,
Лаврик Ольга Ивановна, Хазанов
Вениамин Абрамович (RU)**

(57) Изобретение относится к молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии, конкретно - к соединению, представляющему собой 2-ацетил-6-(2-(2-(4-бромбензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметилдобензо[b,d]фуран-1(9bH)-он, гидразинотиазоловое производное усниновой кислоты формулы I, проявляющему способность ингибировать действие фермента тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека. Техническим результатом является повышение ингибирующего действия на фермент тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 человека (Tdp1) и расширение арсенала ингибиторов данного фермента.

B1

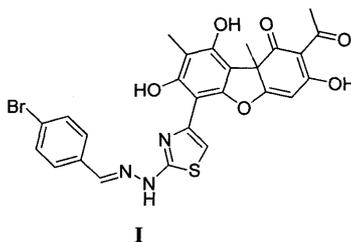
034548

034548

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии, конкретно - к соединению, представляющему собой производное усниновой кислоты формулы I, включая его пространственные изомеры:



у которого выявлена биологическая активность, заключающаяся в способности ингибировать действие фермента тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека (Tdp1).

Предшествующий уровень техники

В последние годы ведутся активные поиски ингибиторов фермента Tdp1, который рассматривается как перспективная фермент-мишень для создания лекарственных препаратов для лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний [1].

Tdp1 относится к классу фосфодиэстераз - ферментов, расщепляющих фосфодиэфирные связи [2]. Tdp1 играет важную роль в удалении повреждений ДНК, создаваемых топоизомеразой 1 (Top1), ее ингибитором камптотецином и антираковыми препаратами. Нормальный ферментативный цикл топоизомеразы 1 включает обратимую реакцию трансэтерификации. Остаток тирозина-723 активного центра фермента образует переходный ковалентный комплекс с 3'-фосфатом основания ДНК. При этом образуется одноцепочечный разрыв, который позволяет "разрезанной" цепи вращаться вокруг интактной, снимая локальное напряжение в спирали. Затем целостность ДНК восстанавливается за счет обратной реакции (лигирования). В нормальных условиях скорость реакции лигирования значительно выше, чем скорость расщепления, но в ряде случаев переходные комплексы оказываются стабильными. В частности, ингибиторы Top1, такие как камптотецин и его производные, применяющиеся в клинике, существенно замедляют скорость обратной реакции [3].

Невозможность восстановить структуру ДНК приводит к образованию одноцепочечных разрывов, которые могут превратиться в более токсичные двухцепочечные. Помимо ингибиторов, ряд поврежденных ДНК вблизи от места присоединения Top1 также могут блокировать реакцию лигирования.

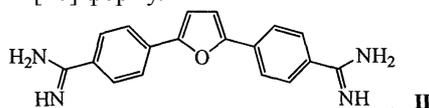
Tdp1 расщепляет 3'-диэфирную связь между остатком тирозина и 3'-концом ДНК, а также удаляет другие повреждения с 3'-конца ДНК [4, 5]. При этом на 3'-конце ДНК остается фосфат, на 5'-конце - гидроксильный остаток. Такая структура является субстратом для фермента полинуклеотидкиназа-3'-фосфатаза (PNKP), которая восстанавливает традиционную для эксцизионной репарации оснований (ЭРО) конфигурацию 3'-ОН, 5'-фосфат [6]. В результате Tdp1 противостоит ингибиторам Top1, которые являются достаточно эффективными антираковыми препаратами (см. обзоры [7, 8]). Предполагается, что именно Tdp1 ответственна за лекарственную устойчивость некоторых видов рака [3, 9]. Эта гипотеза подтверждается рядом исследований: мыши, нокаутные по Tdp1, и человеческие клеточные линии, имеющие мутацию SCAN1, гиперчувствительны к камптотецину [10-13]. И, наоборот, в клетках с повышенным уровнем экспрессии Tdp1 камптотецин и этопозид вызывают меньше повреждений ДНК [14, 15]. Таким образом, сочетание препаратов, воздействующих на Top1 и Tdp1, может существенно повысить эффективность химиотерапии.

Известно также, что подавление активности Tdp1 делает опухолевые клетки гиперчувствительными к противораковому препарату темозоломиду (метилирование пуринов) [16], метилметансульфонату (образование апуриновых/апиримидиновых сайтов), блеомицину (одноцепочечные/двухцепочечные разрывы с 3'-фосфогликолятами), перекиси водорода и ионизирующему излучению (разрывы и др. виды повреждений) [17]. Это предполагает участие Tdp1 в различных путях репарации ДНК.

Таким образом, терапевтическим эффектом ингибиторов Tdp1 может быть селективное увеличение активности противоопухолевых препаратов.

В литературе описано относительно немного ингибиторов Tdp1 [18-28]. Недостатком известных соединений являются не очень высокие ингибиторные характеристики в отношении Tdp1 (IC_{50} в диапазоне концентраций от 0,2 до 100 мкМ).

Наиболее близким к заявляемым соединениям - прототипом является фурамин, представляющий собой гетероциклический диаминидин [20] формулы II

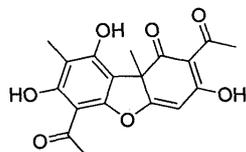


Недостатком известного соединения являются низкие ингибиторные характеристики в отношении Tdp1 (IC_{50} для одноцепочечной ДНК составляет порядка 100 мкМ).

Сущность изобретения

Задачей изобретения является создание более эффективного ингибитора Tdp1 на основе усниновой кислоты.

Усниновая кислота (III) является уникальным и доступным отечественным метаболитом лишайников:



III усниновая кислота

Широко изучены антибактериальные, фунгицидные и антиоксидантные свойства усниновой кислоты, но известны также данные об активности усниновой кислоты и её производных в отношении фермента репарации ПАРП1 [28].

Поставленная задача решается предлагаемым соединением, представляющим собой гидразинотиазоловое производное усниновой кислоты формулы I с высокими ингибирующими характеристиками в отношении Tdp1 (IC_{50} $0,26 \pm 0,011$ мкМ).

Техническим результатом является повышение ингибирующего действия на фермент Tdp1 и расширение арсенала ингибиторов данного фермента.

Предлагаемое соединение может быть синтезировано в соответствии со схемами, приведенными на фиг. 1.

В качестве исходного соединения берут усниновую кислоту со структурной формулой III, полученную экстракцией из смеси лишайников по методике [29]. Для получения целевого соединения предварительно синтезируют бромзамещённое производное усниновой кислоты (соединение IV) и тиосемикарбазон V. Бромирование усниновой кислоты III бромом проводят в присутствии бромоводородной кислоты по методике, описанной в работе [30], и получают соединение IV. Тиосемикарбазон V получают при взаимодействии тиосемикарбазида (соединение VI) с парабромбензальдегидом VII по методике, описанной в работе [31], спектральные данные совпадают с литературными. Финальным этапом получают соединение I с целевой активностью реакцией соединения IV с тиосемикарбазоном V с последующей его очисткой колоночной хроматографией.

Более конкретно способ получения заявляемого соединения I заключается в следующем.

На первом этапе получают усниновую кислоту экстракцией воздушно-сухого сырья (смесь лишайников) хлороформом при кипячении с последующим выделением чистой усниновой кислоты в виде желтых кристаллов при перекристаллизации из смеси хлороформ - этиловый спирт (1:10). Полученную усниновую кислоту III бромруют добавлением заранее приготовленного комплекса брома с диоксаном (2 ммоль брома растворяют в 14 мл диоксана) в присутствии нескольких капель бромоводородной кислоты в течение 7 суток при комнатной температуре в темноте. После концентрирования реакционной смеси на ротационном испарителе и колоночной хроматографии выделяют бромзамещённое производное усниновой кислоты IV. Далее синтезируют тиосемикарбазон парабромбензальдегида V путем медленного прикапывания спиртового раствора парабромбензальдегида VII к водному раствору тиосемикарбазида (соединение VI). Выпавший осадок промывают водой, отфильтровывают и сушат на воздухе, в дальнейшей реакции он используется без очистки. Синтез соединения I проводят кипячением эквимолярного количества соединения IV и тиосемикарбазида парабромбензальдегида V в этиловом спирте в течение 1 ч, выделяют соединение I после очистки методом колоночной хроматографии с выходом 66%.

Структура и чистота полученного соединения I подтверждена данными ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Соединение формулы I является гидразинотиазоловым производным усниновой кислоты.

Соединение формулы I после проведения углубленных фармакологических исследований может использоваться для дальнейшей разработки новых низкотоксичных высокоэффективных противораковых средств.

Ниже приводятся конкретные примеры реализации заявляемого технического решения.

Пример 1. Синтез соединения I.

Предварительно синтезируют бромзамещённое производное усниновой кислоты IV по методике [30]. Для этого к 1 ммоль усниновой кислоты III (344 мг) добавили комплекс бромдиоксана (2 ммоль брома (0,10 мл) растворили в 14 мл диоксана), несколько капель HBr и оставили на 7 суток при комнатной температуре. После концентрирования реакционной смеси на ротационном испарителе хроматографировали полученный остаток на силикагеле (60-200 мкм), элюент - CH_2Cl_2 . Выход 283 мг (67%). Далее синтезируют тиосемикарбазон V по методике [32]. Для этого 2 ммоль (370 мг) парабромбензальдегида VII растворили в 5 мл этилового спирта и медленно при перемешивании при комнатной температуре прикапали к раствору 2 ммоль (182 мг) тиосемикарбазида VI в воде. Выпавший белый осадок отфильтровали, промыли дистиллированной водой, сушили на воздухе. Выход 392 мг (76%).

Далее к 1 ммоль (258 мг) тиосемикарбазона парабромбензальдегида V, добавили 1 ммоль (423 мг) бромзамещённого производного усниновой кислоты IV и кипятили в 10 мл этилового спирта в течение 1 ч. Растворитель отогнали и реакционную смесь хроматографировали на SiO₂, элюент - хлористый метилен.

В результате получили гидразинотиазоловое производное усниновой кислоты, представляющее собой 2-ацетил-6-(2-(2-(4-бромбензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметилдобензо[b,d]фуран-1(9bH)-он (I) в виде аморфного порошка жёлто-коричневого цвета с выходом 66% (437 мг).

Спектр ¹H ЯМР (CDCl₃, δ, м.д., J, Гц): 1.63 (3H, с, Н-15), 2.18 (3H, с, Н-10), 2.65 (3H, с, Н-12), 5.82 (1H, с, Н-4), 7.08 (1H, с, Н-14), 7.29 (2H, д, J=8.3, Н-19, Н-23), 7.30 (1H, с, Н-17), 7.37 (1H, д, J=8.3, 2H), 9.02 (1H, ш с, NH), 10.28 (1H, с, OH-9), 12.56 (1H, с, OH-7), 18.80 (1H, с, OH-3).

¹³C ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 8.40 (C-10), 27.80 (C-12), 32.09 (C-15), 59.19 (C-9b), 97.19 (C-4), 97.63 (C-6), 103.57 (C-9a), 104.82 (C-14), 105.26 (C-2), 108.78 (C-8), 123.78 (C-21), 127.85 (2C, C-19, C-23), 131.70 (2C, C-20, C-22), 132.29 (C-18), 140.98 (C-17), 143.47 (C-13), 151.21 (C-9), 151.50 (C-7), 156.20 (C-5a), 166.06 (C-16), 180.18 (C-4a), 191.52 (C-3), 198.01 (C-1), 201.34 (C-11).

Найдено: m/z 583.0219 [M]⁺ C₂₆H₂₀N₃O₆⁸¹Br₁S₁. Вычислено: M = 581.0251.

Пример 2. Исследование влияния предлагаемого соединения на активность Tdp1.

Рекомбинантная тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 человека (КФ 3.1.4.) была экспрессирована в системе *Escherichia coli* (плазмида pET 16B-Tdp1 предоставлена доктором Кальдекотт К.У., Университет Сассекса, Великобритания) и выделена, как описано [2, 32].

В качестве тест-системы для определения ингибирующих свойств исследуемых соединений использована реакция удаления тушителя флуоресценции Black Hole Quencher 1 (BHQ1) с 3'-конца олигонуклеотида, катализируемая Tdp1. На 5'-конце олигонуклеотида находится (5,6)-FAM - флуорофор, интенсивность флуоресценции которого возрастает при удалении тушителя. Для измерения флуоресценции использовался флуориметр POLARstar OPTIMA производства BMG LABTECH.

Реакционные смеси объемом 200 мкл содержали буфер (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM NaCl; 7 mM меркаптоэтанол), 50 nM олигонуклеотид и различные концентрации ингибитора. Реакция запускалась добавлением Tdp1 до конечной концентрации 1,3 nM. Измерения проводились в линейном диапазоне зависимости скорости реакции от времени (до 8 мин) через каждые 55 с. Влияние предлагаемых соединений оценивали по величине IC₅₀ (концентрация ингибитора, при которой активность фермента снижена наполовину). Обсчет значений IC₅₀ проводили с помощью программы MARS Data Analysis 2.0 (BMG LABTECH).

Типичная кривая зависимости скорости реакции, катализируемой Tdp1, от концентрации ингибитора представлена на фиг. 2. Величина IC₅₀ для предлагаемого соединения составляет 0,026±0,011 мкМ, что почти в 4000 раз ниже, чем у соединения-прототипа.

Пример 3.

Исследования острой токсичности предлагаемого соединения выполнены на аутбредных мышьях-самцах стока CD-1 СПФ статуса. Исследуемое вещество в дозах 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000 и 5000 мг/кг (в каждой группе по 5 мышей) вводили в объеме 0,5 мл внутрижелудочно однократно в виде суспензии, носителем являлся водный 0,5% раствор карбоксиметилцеллюлозы. Во всех указанных группах животных, получавших вещество в дозах от 62,5 до 5000 мг/кг, гибели животных не зафиксировано. Таким образом, по результатам исследования можно говорить о том, что максимальная переносимая доза составляет не менее 5000 мг/кг, а LD₅₀ превышает 5000 мг/кг (per os, мыши, самцы).

Таким образом, предложено низкотоксичное соединение, представляющее собой производное усниновой кислоты формулы I, у которого выявлена биологическая активность, заключающаяся в способности ингибировать действие фермента тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека (Tdp1).

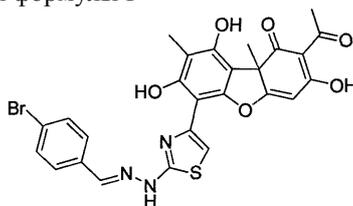
Предлагаемое соединение оказывает специфическое ингибирующее действие на фермент тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 человека (Tdp1) и, являясь эффективным ингибитором, расширяет арсенал ингибиторов данного фермента и может быть использовано для разработки лекарственных препаратов, применимых в клинической медицине.

Источники информации

1. Cortes Ledesma F., et al., Nature, 2009, 461, 674-678.
2. Interthal H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001, 98, 12009-12014.
3. Dexheimer TS, et al., Anticancer Agents Med Chem. 2008, 8, 381-389.
4. Ben Hassine S, et al., The EMBO Journal, 2009, 28, 632-640.
5. Povirk LF. ISRN Mol. Biol., 2012, 1-16.
6. Vance JR, Wilson TE. J. Biol. Chem., 2001, 276, 15073-15081.
7. Pommier Y. Nat. Rev. Cancer, 2006, 6, 789-802.
8. Pommier Y., et al. Chem Biol., 2010, 17, 421-433.
9. Beretta GL, et al., Curr. Med. Chem. 2010, 17, 1500-1508.
10. El-Khamisy SF, et al., DNA Repair (Amst)., 2009, 8 760-766.
11. Das BB, et al., The EMBO Journal., 2009, 28, 3667-3680.
12. Katyal S., et al., EMBO J., 2007, 26, 4720-4731.
13. Hirano R., et al., EMBO J., 2007, 26, 4732-4743.
14. Barthelmes HU, et al., J Biol Chem. 2004, 279, 55618-25565.
15. Nivens MC, et al., Cancer Chemother Pharmacol., 2004, 53, 107-115.
16. Alagoz M., et al., Nucleic Acids Res., 2014, 42, 3089-3103.
17. Murai J., et al., J Biol Chem. 2012, 287, 12848-12857.
18. Dexheimer, T.S., et al., Anticancer Agents Med. Chem. 2008, 8, 381-389
19. Cortes Ledesma, F., et al., Nature 2009, 461, 674-678.
20. Antony, S., et al., J. Med. Chem. 2012, 55, 4457-4478.
21. Conda-Sheridan, M. ,et al., J. Med. Chem. 2013, 56, 182-200.
22. Sirivolu, V.R. ,et al., J. Med. Chem. 2012, 55, 8671-8684.
23. Huang, S.N., et al., Expert Opin Ther Pat. 2011, 21, 1285-1292.
24. Davies, D.R., et al., J. Mol. Biol. 2003, 324, 917-932.
25. Marchand, C. ,et al., Mol. Cancer Ther. 2009, 8, 240-248
26. Zakharenko, A.L. ,et al., Rus. J. Bioorg. Chem. 2015, 41, 657-662.
27. Zakharenko, A.L., et al., Bioorg. Med. Chem. 2015, 23, 2044-2052
28. Zakharenko A., et al., Med. Chem., 2012, 8, 883-893.
29. Салахутдинов Н.Ф., и др., Патент РФ № 2317076 С1, оп. 20.02.2008.
30. Лузина О.А. и др., Химия Природных Соединений, 2012, №3, 350-355.
31. Aslam, M.A.S., et al., European Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 46, 5473-5479.
32. Lebedeva N.A., et al., FEBS Lett., 2011, 585, 683-686.

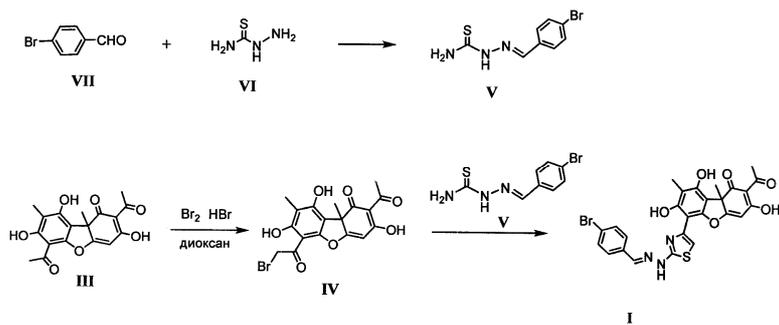
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

2-Ацетил-6-(2-(2-(4-бромбензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-3,7,9-тригидрокси-8,9b-диметилдибензо[b,d]фуран-1(9bH)-он формулы I

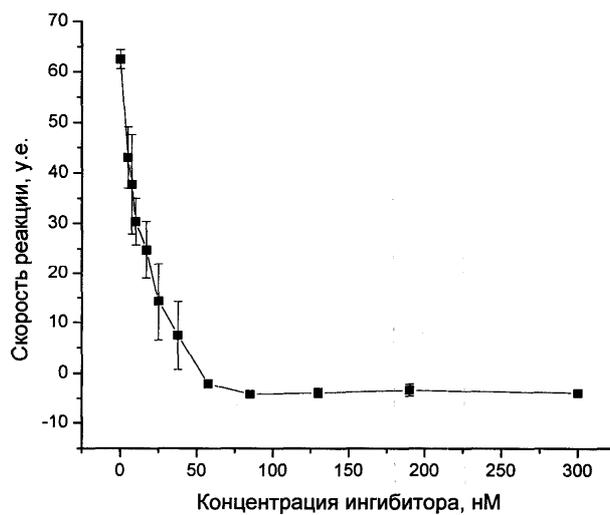


I

проявляющий ингибирующее действие в отношении фермента тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека (Tdp1).



Фиг. 1



Фиг. 2

