

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(10) Номер международной публикации
WO 2019/221641 A1

(43) Дата международной публикации
21 ноября 2019 (21.11.2019)

WIPO | PCT

(51) Международная патентная классификация :
C07C 405/00 (2006.01) A 61K 31/5575 (2006.01)
C07D 207/08 (2006.01) A 61P 27/00 (2006.01)

(21) Номер международной заявки : PCT/RU20 19/050062

(22) Дата международной подачи :
15 мая 2019 (15.05.2019)

(25) Язык подачи : Русский

(26) Язык публикации : Русский

(30) Данные о приоритете :
20181 18157 17 мая 2018 (17.05.2018) RU

(71) Заявитель : ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ГУРУС БИОФАРМ"
(GURUS BIOPHARM LIMITED LIABILITY
COMPANY) [RU/RU]; Территория Инновационного
центра «Сколково», Большой бульвар 42, строение 1,
помещение 935 Москва, 143026, Moscow (RU).

(72) Изобретатели : БЕЗУГЛОВ, Владимир Виленович
(BEZUGLOV, Vladimir Vilenovich); ул. Академика
Арцимовича, д. 9, кв. 100 Москва, 117437, Moscow
(RU). СЕРКОВ, Игорь Викторович (SERKOV, Igor
Viktorovich); Институтский пр-т, д. 3, кв. 119 Чер-
ноголовка, Московская обл., Ногинский р-н, 142432,
Chemogolovka (RU). ЛЮБИМОВ, Игорь Иванович
(LYUBIMOV, Igor Ivanovich); ул. Осенний буль-
вар, Д.4-А, кв. 65 и. Оболенск, Московская обл.,
Серпуховский р-н, 142279, р. Obolensk (RU). ГРЕЦ-
КАЯ, Наталья Михайловна (GRETSKAYA, Nataliya
Mikhailovna); ул. Малая Грузинская, д. 28, кв. 62
Москва, 123557, Moscow (RU).

(74) Агент : КОТЛОВ, Дмитрий Владимирович и др.
(KOTLOV, Dmitry Vladimirovich et al.); ООО "ЦИС
"Сколково", Территория инновационного центра
"Сколково", дом 4, оф.402.1 Москва, 143026, Moscow
(RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида национальной охраны) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,

HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP,
KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида региональной охраны) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована :

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- до истечения срока для изменения формулы
изобретения и с повторной публикацией в случае
получения изменений (правило 48.2(h))
- в черно-белом варианте ; международная заявка в
поданном виде содержит цвет или оттенки серого и
доступна для загрузки из PATENTSCOPE.

(54) Title: PROSTAGLANDIN F2 ALPHA DERIVATIVES FOR DECREASING INTRAOCULAR PRESSURE

(54) Название изобретения : ПРОИЗВОДНЫЕ ПРОСТАГЛАНДИНА F2АЛЬФА ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ВНУТРИГЛАЗНОГО ДАВЛЕНИЯ

(57) Abstract: The invention relates to medical chemistry, specifically to new biologically active compounds - amide derivatives of prostaglandin F2 alpha. Said compounds have low cytotoxicity and are able to stimulate the formation of endogenous nitric oxide in mammalian cells. The synthesis of said compounds helps expand the range of biologically active prostaglandin F2 alpha derivatives that are able to decrease intraocular pressure.

(57) Реферат : Изобретение относится к медицинской химии, конкретно к новым биологически активным соединениям - амидным производным простагландина F2 альфа. Данные соединения обладают низкой цитотоксичностью и способны стимулировать образование эндогенного оксида азота в клетках млекопитающих. Синтез данных соединений способствует расширению номенклатуры биологически активных производных простагландина F2 альфа, обладающих способностью понижать внутриглазное давление.



WO 2019/221641 A1

Производные простагландина F₂альфа для снижения
внутриглазного давления

Изобретение относится к медицинской химии, конкретно к новым биологически активным соединениям - амидным производным простагландина F₂α.

Простагландины представляют собой семейство полифункциональных биологически активных веществ синтезируемых в организме из арахидоновой кислоты с помощью циклооксигеназы (COX). Эти окисленные жирные кислоты являются аутокринными и паракринными липидными медиаторами, и для них характерно проявление широкого спектра физиологической активности, например, сочетание дилататорной (на гладких мышцах бронхов), констрикторной (на гладких мышцах желудочно-кишечного тракта), антиагрегационной (на тромбоцитах), гипо- или гипертензивной активностей [Nicolau A. In: Bioactive Lipids (Eds. Nicolau A., Kokotos J.) // Bridgewater: Oily Press, 2004. - 197 p]. Простагландин F₂α образуется в организме в результате окислительного метаболизма арахидоновой кислоты под действием циклооксигеназы на первой стадии и редуктазы - на второй стадии биосинтеза [Smith W.L., Marnett L.J., DeWitt D.L. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis // Pharmacology & Therapeutics. 1991, V. 49(3), P. 153-179]. Он является эндогенным лигандом G-белок сопряженного рецептора FP, активация которого приводит к мобилизации внутриклеточного кальция [Toh H, Ichikawa A, Nammiya S. Molecular evolution of receptors for eicosanoids. // FEBS Lett. 1995, V. 361, P. 17-21].

Простагландины используются при лечении гипертензии, тромбозов, астмы, желудочных и кишечных язв, профилактики атеросклероза, а также в акушерстве. Агонисты FP-рецептора используются в клинике как агенты, снижающие внутриглазное давление [Woodward D.F., Lawrence R.A., Fairbairn C.E., Shan T., Williams L.S. Intraocular pressure effects of selective prostanoid receptor agonists involve different receptor subtypes according to radioligand binding studies. // J Lipid Mediat. 1993, V. 6(1-3), P. 545-553.]

Простамиды (амиды простагландинов и этаноламида) образуются в организме путём окисления этаноламида арахидоновой кислоты (анандамида) циклооксигеназой -2 [Kozak K.R., Crews B.C., Ray J.L., Tai H.H., Morrow J.D., Marnett L.J. Metabolism of prostaglandin glycerol esters and prostaglandin ethanolamides in vitro and in vivo. // J. Biol. Chem. 2001, V.276(40), P. 36993-36998]. Оказалось, что эти производные также обладают способностью снижать внутриглазное давление. Наиболее известным препаратом этого класса является синтетический аналог простамида F₂ - биматопрост, в котором остаток этаноламина заменен на остаток этиламина, а алкильная боковая цепь простамида модифицирована введением фенильного радикала [Woodward D.F., Krauss A.H., Chen J., Lai R.K., Spada C.S., Burk R.M., Andrews S.W., Shi L., Liang Y., Kedzie K.M., Chen R., Gil D.W., Kharlamb A., Archeampong A., Ling J., Madhu C., Ni J., Rix P., Usansky J., Usansky H., Weber A., Welty D., Yang W., Tang-Liu D.D., Garst M.E., Brar B., Wheeler L.A., Kaplan L.J. The pharmacology of bimatoprost (Lumigan) // Surv. Ophthalmol. 2001, V.45, Suppl 4, P. S337-S345].

Известны многочисленные аналоги простаமிдов, в которых модифицированы как простаноидная часть молекулы, так и этаноламидная. Наиболее близкими к заявляемым соединениям являются простамиды, обладающие нейрозащитным действием [Безуглов В.В., Бобров М.Ю., Грецкая Н.М., Серков И.В., Зинченко Г.Н., Акимов М.Г. Простамиды и их аналоги, обладающие нейрозащитным действием. / Патент РФ № 2474426, приоритет от 26.12.2011, публикация 10.02.2013, Бюл. №4]. В данном патенте описаны аналоги простамида E, содержащие остатки нитроксиэтиламина, глицина, гамма-аминомасляной кислоты, гидроксиэтиламина, тирамина и дофамина. Однако в данном патенте нет описания аналогов простамида F, содержащего такие же модифицированные остатки этаноламина.

Известны также аналоги простагландина F_{2a}, например, патент [US Pat. No 7,910,767], в котором описаны эфиры, тиоэфиры и амиды простагландина F_{2a} с измененной алкильной боковой цепью, обладающие измененной

биологической активностью по сравнению с известными аналогами простагландина F₂«, применяемыми в медицине (биматопростом, травопростом и др.).

Известны также аналоги простагландина F₂«, содержащие нитро оксигруппы.

US. Pat. No. 5,625,083 описывает динитроглицериновые эфиры простагландинов, в том числе и простагландина F₂«, которые могут быть использованы как вазодилататоры, антигипертензивные агенты или бронходилататоры.

US. Pat. No. 8,101,658 описывает простакиды, генерирующие оксид азота, которые могут быть использованы для лечения глаукомы и повышенного внутриглазного давления.

Однако данные изобретения не содержат структур, раскрываемых в настоящем изобретении.

Задача данного изобретения - расширение номенклатуры биологически активных производных простагландина F₂«, обладающих способностью понижать внутриглазное давление. Поставленная задача решается путём синтеза амидных производных простагландина F₂«, в которых амидная часть представлена аминокислотами, их нитропроизводными, циклическими аминами и замещёнными этанол аминами.

Таким образом, объектом данного изобретения являются амидные производные простагландина F₂« общей формулы (1):

«Незамещенный» означает, что специфическая группа или остаток не содержат заместителей, отличных от атома водорода.

«Алкил» означает незамещенную алкильную группу с прямой или разветвленной цепью, содержащую от 1 до 6 атомов углерода.

5 «Циклоалкил» означает циклическую насыщенную углеводородную группу с 3-6 кольцевыми атомами углерода (например, циклопропил, циклобутил и аналогичные).

«Смесь» - совместное включение двух и более веществ без образования химических связей, а физические свойства каждого из компонентов
10 сохраняются без изменений.

«Фармацевтически приемлемая соль» означает, что компонент, образующий соль с карбоксильной группой заявляемых веществ не будет наносить вред организму человека.

«Фармацевтически приемлемый катион» означает, что данный катион при
15 образовании соли не будет наносить вред организму человека.

В общем виде вещества настоящего изобретения могут быть синтезированы методами, известными из области химии. Некоторые процессы производства конкретных веществ настоящего изобретения иллюстрируют
схемы, приведённые в примерах.

20 Биологические активности веществ настоящего изобретения включают: отсутствие цитотоксичности вплоть до концентрации 100 мкМ; способность снижать внутриглазное давление; способность повышать концентрацию внутриклеточного кальция, способность увеличивать продукцию оксида азота.

Заявляемые вещества, являясь аналогами природного простагландина F_{2a} ,
25 способны взаимодействовать со специфическим простаноидным рецептором FP, что выражается в стимулировании мобилизации внутриклеточного кальция.

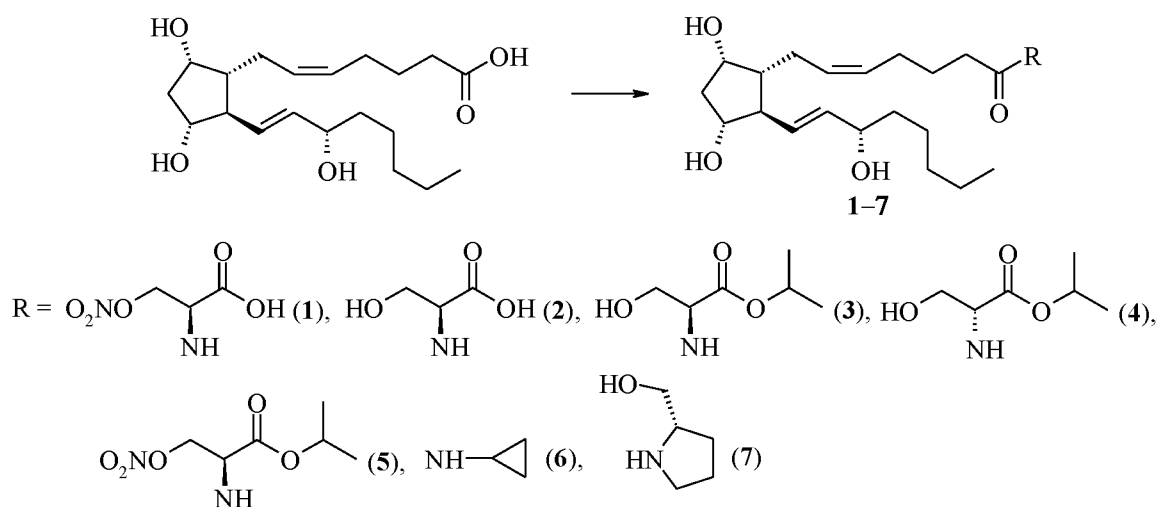
Неожиданным результатом данного изобретения является способность заявляемых веществ индуцировать эндогенный синтез оксида азота в клетках
30 млекопитающих. Такие свойства не отмечены ранее ни для одного

производного простагландина F_{2a} . Более того, этим свойством обладали соединения, не содержащие NO-донорных групп, например амид простагландина F_{2a} и изопропилового эфира серина (соединение 3).

Таким образом, задача данного изобретения решается путём синтеза новых амидных производных простагландина F_{2a} общей формулы (1), обладающих способностью индуцировать эндогенный синтез оксида азота, что значительно расширяет возможности медицинского применения заявляемых веществ за счет вовлечения в механизм фармакологического эффекта эндогенного регулятора - оксида азота.

Нижеследующие примеры приведены в целях иллюстрирования настоящего изобретению и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения.

Пример 1. Амиды простагландина F_{2a} с серином и его производными, циклопропиламином и L-пролинолом.



15

Амид простагландина F_{2a} с L-нитросерином (1).

К раствору 150 мг (0.42 ммоль) простагландина F_{2a} в 2 мл ацетонитрила в атмосфере аргона прибавляют 76 мкл (0.55 ммоль) Et_3N , перемешивают 5 мин и прибавляют раствор 71 мкл (0.55 ммоль) изобутилхлорформиата в 500 мкл ацетонитрила. Реакционную смесь перемешивают 30 мин при $4^\circ C$, упаривают до половины объема, разбавляют 50 мл этилацетата и промывают водой (2x20 мл) и насыщенным водным раствором $NaCl$ (20 мл) и сушат над безводным Na_2SO_4 . Сушитель отфильтровывают, фильтрат упаривают на роторном

испарителе в вакууме водоструйного насоса . Остаток высушивают в вакууме масляного насоса . Получают 171 мг смешанного ангидрида , желтое масло .

К раствору 104 мг (0.49 ммоль) азотнокислой соли L-нитросерина в 0.500 мл ДМФА при 4°C в атмосфере аргона прибавляют раствор полученного смешанного ангидрида в 1 мл ДМФА и 52 мкл N-метилморфолина и перемешивают полученную смесь 90 мин . Растворитель упаривают , остаток разбавляют 50 мл этилацетата и промывают 2М водным раствором NaHSO_4 (20 мл) и насыщенным водным раствором NaCl (20 мл) и сушат над безводным Na_2SO_4 . Сушитель отфильтровывают , фильтрат упаривают на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса . Получают 162 мг амида простагландина F_{2a} и L-нитросерина , желтоватое масло , выход 70%.

ПМР : 0.90 (3H), 1.29 (6H), 1.53 (3H), 1.75 (2H), 2.18 (7H), 2.41 (2H), 2.71 (1H), 3.95 (1H), 4.14 (2H), 4.33 (1H), 4.88 (2H), 5.52 (4H). Масс -спектр : 509.2832[M+Na]⁺, 441.3282 [M-N02+Na+H]⁺, $[\alpha]_D^{25} = 36,0^\circ$, c = 1, EtOH.

15 Амид простагландина F_{2a} с L-серином (2).

Получен аналогично из простагландина F_{2a} и L-серина .Выход 51%. ПМР : 0.84 (3H), 1.3 (6H), 1.52 (3H), 1.95 (3H), 2.16 (6H), 2.33 (2H), 2.68 (1H), 3.89 (2H), 3.92 (1H), 4.19 (1H), 4.32 (2H), 5.34 (4H), 7.8 (1H). $[\alpha]_D^{25} = 33,5^\circ$, c = 1, ЕЮН :H 20, 1:2.

20 Амид простагландина F_{2a} с изопропиловым эфиром L-серина (3).

Получен аналогично из простагландина F_{2a} и гидрохлорида изопропилового эфира L-серина . Выход 57%. ПМР : 0.89 (3H), 1.22 (6H), 1.3 (9H), 1.76 (3H), 2.04 (6H), 2.39 (2H), 3.9 (2H), 4.03 (2H), 4.13 (1H), 4.63 (1H), 5.08 (1H), 5.45 (4H), 6.83 (1H). $[\alpha]_D^{25} = 28,4^\circ$, c = 1, ЕЮН .

25 Амид простагландина F_{2a} с изопропиловым эфиром D-серина (4).

Получен аналогично из простагландина F_{2a} и гидрохлорида изопропилового эфира D-серина . Выход 35%. ПМР : 0.89 (3H), 1.21 (6H), 1.3 (9H), 1.74 (3H), 2.01 (6H), 2.4 (2H), 3.9 (2H), 4.0 (2H), 4.1 (1H), 4.6 (1H), 5.1 (1H), 5.43 (4H), 6.9 (1H). $[\alpha]_D^{25} = 27,2^\circ$, c = 1, ЕЮН .

Амид простагландина F_{2a} с изопропиловым эфиром L-нитросерина (5).

Получен аналогично из простагландина F_{2a} и изопропилового эфира L-нитросерина. Выход 64%. ПМР : 0.84 (3H), 1.16 (6H), 1.23 (8H), 1.51 (4H), 1.96 (4H), 2.12 (4H), 3.88 (3H), 4.52 (1H), 4.9 (2H), 5.34 (5H), 7.9 (1H).

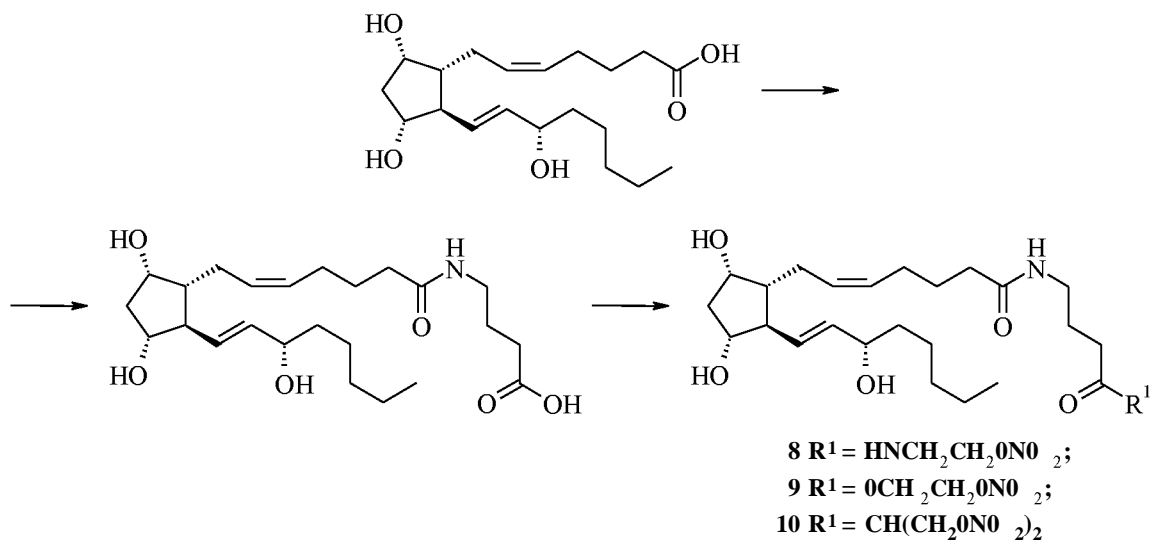
Амид простагландина F_{2a} с циклопропиламином (6).

Получен аналогично из простагландина F_{2a} и циклопропиламина. Выход 73%. ПМР : 0.50 (2H), 0.78 (2H), 0.90 (3H), 1.31 (6H), 1.61 (4H), 1.86 (4H), 2.06 (4H), 2.36 (2H), 2.70 (1H), 4.00 (1H), 4.09 (1H), 4.20 (1H), 5.41 (1H), 5.57 (2H), 5.78 (2H). $[\alpha]_D^{25} = 38,0^\circ$, $c = 1$, ЕЮН .

Амид простагландина F_{2a} с L-пролинолом (7).

Получен аналогично из простагландина F_{2a} и L-пролинола. Выход 61%. ПМР : 0.91 (3H), 1.36 (6H), 1.60 (6H), 1.89 (6H), 2.08 (4H), 2.39 (1H), 2.65 (1H), 3.2 (1H), 3.45 (1H), 3.57 (1H), 3.73 (1H), 3.90 (1H), 4.06 (1H), 4.21 (2H), 5.48 (2H), 5.69 (2H). $[\alpha]_D^{25} = 22,0^\circ$, $c = 1$, ЕЮН .

Пример 2. Амиды простагландина F_{2a} и производных γ -аминомасляной кислоты .



Амид простагландина F_{2a} и γ -аминомасляной кислоты .

К раствору 103 мг (1.00 ммоль) γ -аминомасляной кислоты в 1 мл ацетонитрила прибавляют 600 мкл N,O- бис(триметилсилил) трифторацетамида и перемешивают 18 ч при 23°C

К раствору 284 мг (0.8 ммоль) простагландина F₂ в 3 мл ацетонитрила прибавляют 145 мкл (1.05 ммоль) триэтиламина и 125 мкл (0.96 ммоль) изобутилхлорформата и перемешивают 30 мин при 23°C. Полученный смешанный ангидрид прибавляют к раствору силилированной 5 γ-аминомасляной кислоты и перемешивают 4 ч при 23°C. К реакционной смеси прибавляют метанол (5 мл), перемешивают 20 мин и упаривают на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса. Остаток растворяют в этилацетате (20 мл) и промывают 2М водным раствором NaHSO₄ (20 мл) и насыщенным водным раствором NaCl (20 мл) и сушат над безводным Na₂SO₄. Сушитель 10 отфильтровывают, фильтрат упаривают на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле. Получают 132 мг амида простагландина F₂ и γ-аминомасляной, прозрачное масло, выход 60%. Масс-спектр : 462.2888 [M+Na]⁺.

Амид простагландина F₂ с нитроэтаноламидом γ-аминомасляной 15 кислоты (8).

К раствору 80 мг (0.18 ммоль) амида простагландина F₂ с 20 γ-аминомасляной кислотой в 3 мл ацетонитрила в атмосфере аргона прибавляют 30 мкл (0.23 ммоль) Et₃N, перемешивают 5 мин и прибавляют 30 мкл (0.22 ммоль) изобутилхлорформата. Реакционную смесь перемешивают 30 мин при 4°C, прибавляют раствор 38 мг (0.37 ммоль) азотнокислой соли нитроэтанолamina и 50 мкл Et₃N в 2 мл хлористого метилена и перемешивают 12 ч при 23°C. Растворитель упаривают, остаток разбавляют 20 мл этилацетата и промывают 2М водным раствором NaHSO₄ (20 мл) и насыщенным водным раствором NaCl (20 мл) и сушат над безводным Na₂SO₄. Сушитель 25 отфильтровывают, фильтрат упаривают на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле. Получают 35 мг амида простагландина F_{2a} и нитроэтаноламида γ-аминомасляной кислоты (8), выход 36%. ПМР : 0.88 (3H), 1.21 (6H), 1.65 (3H), 1.77 (4H), 2.11 (7H), 2.38 (1H), 2.62 (1H), 3.33 (2H), 3.55 (2H), 3.97 (1H), 4.18 30 (2H), 4.53 (2H), 4.68 (2H), 5.47 (4H). [α]_D²⁵ = 35,2°, c = 1, ЕЮН .

Амид простагландина F_{2a} с нитроэтиленгликолевым эфиром γ -аминомасляной кислоты (9).

К раствору 14 мкл (0.12 ммоль) нитроэтиленгликоля в 1 мл хлористого метилена прибавляют 24 мг (0.12 ммоль) гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбоната, 3 мг (0.02 ммоль) диметиламинопиридина и 45 мг (0.1 ммоль) амида простагландина F_{2a} с γ -аминомасляной кислотой и перемешивают 90 мин при 23°C. Реакционную смесь разбавляют хлороформом (20 мл) и промывают 2M водным раствором $NaHSO_4$ (20 мл), водой (2x20 мл) и насыщенным водным раствором $NaCl$ (20 мл) и сушат над безводным Na_2SO_4 . Сушитель отфильтровывают, фильтрат упаривают на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле. Получают 20 мг амида (9), бесцветное масло, выход 37%.

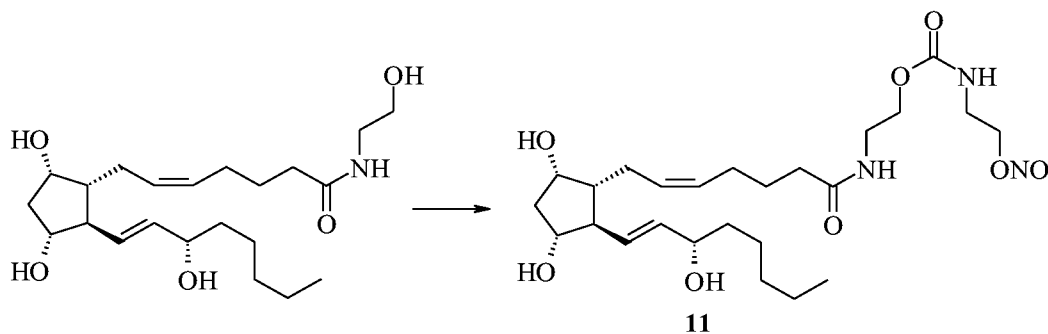
ПМР : 0.89 (3H), 1.38 (11H), 1.88 (9H), 2.27 (2H), 2.87 (2H), 3.22 (2H), 3.81 (1H), 3.99 (1H), 4.07 (1H), 4.37 (2H), 4.67 (2H), 5.36 (4H), 7.57 (1H). $[\alpha]_D^{25} = 24,0^\circ$, $c = 1$, ЕЮН .

Амид простагландина F_{2a} с динитроглицериновым эфиром γ -аминомасляной кислоты (10).

К раствору 84 мг (0.2 ммоль) амида простагландина F_{2a} с γ -аминомасляной кислотой в 1 мл хлористого метилена в атмосфере аргона прибавляют раствор 44 мг (0.43 ммоль) гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида в 0.5 мл хлористого метилена, 5 мг (0.04 ммоль) N-диметиламинопиридина и 42 мг (0.22 ммоль) динитрата глицерина и перемешивают 2 ч при 23°C. Растворитель упаривают, остаток разбавляют этилацетатом (20 мл) и промывают 2M водным раствором $NaHSO_4$ (20 мл), водой (2x20 мл) и насыщенным водным раствором $NaCl$ (20 мл) и сушат над безводным Na_2SO_4 . Сушитель отфильтровывают, фильтрат упаривают на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле. Получают 38 мг амида простагландина F_{2a} с динитроглицериновым эфиром γ -аминомасляной кислоты

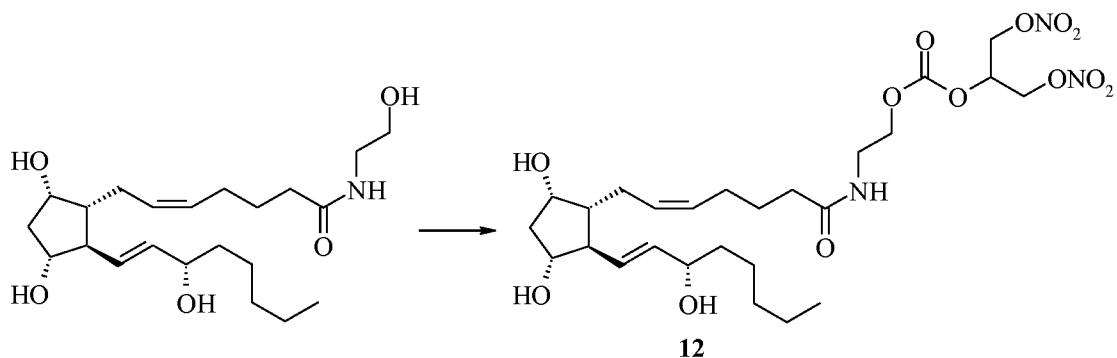
(10), выход 33%. ПМР : 0.84 (3H), 1.43 (14 H), 1.98 (8H), 2.34 (2H), 3.04 (2H), 3.88 (2H), 4.31 (1H), 4.46 (2H), 4.77 (2H), 5.36 (5H), 7.75 (1H). Масс -спектр : 626.2968 $[M+Na]^+$, 586.3943 $[M+H-H_{20}]^+$. $[\alpha]_D^{25} = 30,2^\circ$, $c = 1$, ЕЮН

Пример 3. Амид простагландина F_{2a} с 2-аминоэтил -
5 [2-(нитрокси)этил]карбаматом (11).



К раствору 150 мг (0.37 ммоль) амида простагландина F_{2a} с этаноламином
в 3 мл ацетонитрила прибавляют 93 мг (0.37 ммоль) дисукцинимидилкарбоната
и 52 мкл (0.37 ммоль) Et_3N и перемешивают при $23^\circ C$ 1.5 ч. Затем прибавляют
10 62 мг (0.37 ммоль) азотнокислой соли нитроэтанолamina и 37 мг (0.37 ммоль)
 Et_3N и перемешивают 18 ч при $4^\circ C$. Растворитель упаривают , остаток
разбавляют 20 мл этилацетата и промывают 2M водным раствором $NaHSO_4$ (20
мл) и насыщенным водным раствором $NaCl$ (20 мл) и сушат над безводным
 Na_2SO_4 . Сушитель отфильтровывают , фильтрат упаривают на роторном
15 испарителе в вакууме водоструйного насоса . Остаток очищают колоночной
хроматографией на силикагеле . Получают получают 38 мг амида (11),
бесцветное масло , выход 19%. ПМР : 0.90 (3H), 1.31 (6H), 1.55 (4H), 1.76 (3H),
2.15 (5H), 2.53 (2H), 3.34 (2H), 3.53 (2H), 4.01 (1H), 4.18 (4H), 4.56 (2H), 5.40
(2H), 5.57 (2H), 5.71 (1H), 6.25 (1H). Масс -спектр : 552.2983 $[M+Na]^+$. $[\alpha]_D^{25} =$
20 $34,6^\circ$, $c = 1$, ЕЮН

Амид простагландина F_{2a} с 2-аминоэтил -2-(нитрокси)-1-
[(нитрокси)метил]этил)карбонатом (12).



К раствору 55 мг (0.14 ммоль) амида простагландина F_{2a} с этаноламином в 1.5 мл хлористого метилена прибавляют 32 мг (0.12 ммоль) дисукцинимидилкарбоната и 20 мкл (0.14 ммоль) Et_3N и перемешивают при 23°C 40 мин. Затем прибавляют 25 мг (0.14 ммоль) динитрата глицерина и 16 мг (0.14 ммоль) *N*-диметиламинопиридина и перемешивают 18 ч при 4°C. Растворитель упаривают, остаток разбавляют 20 мл этилацетата и промывают 2М водным раствором $NaHSO_4$ (20 мл) и насыщенным водным раствором $NaCl$ (20 мл) и сушат над безводным Na_2SO_4 . Сушитель отфильтровывают, фильтрат упаривают на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле. Получают 20 мг амида (12), бесцветное масло, выход 19%. ПМР: 0.84 (3H), 1.24-1.53 (12H), 2.01 (8H), 2.39 (1H), 2.51 (1H), 2.64 (2H), 3.64 (2H), 4.00 (2H), 4.18 (1H), 4.46 (2H), 4.81 (2H), 5.31 (5H), 7.95 (1H). Масс-спектр: 628.2770 $[M+Na]^+$, 588.2843 $[M+H-20]^+$.

Пример 4. Цитотоксическая активность производных простагландина F_{2a} .

Клетки 3T3-L1 инкубировали при 95% влажности, в атмосфере 5% CO_2 , при температуре 37°C. Культивирование проводили в среде DMEM, содержащей 7% FCS, 2 мМ глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина В. Клетки пересеивали каждые 48-72 ч. Для суспендирования клетки инкубировали в растворе Версена в течение 1 минуты и в растворе Трипсин-ЭДТА в течение 1 минуты (0.25%).

Оценка действия веществ на клетки

Клетки рассеивали по 30 тыс. в лунки 96-луночного планшета (монослой) в 100 мкл среды для МТТ -теста. Через 24 часа культивирования к клеткам добавляли 100 мкл исследуемых веществ в среде, используемой для культивирования клеток, с заменой культуральной среды на новую. Клетки инкубировали с исследуемыми веществами 24 часа. В качестве положительного контроля использовали клетки, к которым добавляли 100 мкл среды, используемой для культивирования клеток.

Оценка выживаемости клеток в культуре с помощью МТТ -теста

После окончания инкубации из каждой лунки убирали среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл реактива МТТ (0.5 мг/мл МТТ, 3.5 мг/мл D-глюкозы в растворе Хэнкса). Планшет помещали в СОг-инкубатор (Eppendorf, Германия) на 1.5 часа. После этого убирали МТТ и в каждую лунку добавляли по 100 мкл DMSO и перемешивали 2 минуты на шейкере со скоростью 550 об/мин. После этого определяли оптическую плотность раствора при длинах волн 576 нм и 620 нм на планшетном иммуноферментном фотометре (ЭФОС 9305, ОАО «М 3 Сапфир»).

Все исследованные вещества не обладали заметной цитотоксичностью вплоть до концентрации 100 мкМ (таблица 1).

Таблица 1. Цитотоксичность производных простагландина F_{2a} по отношению к культивируемым клеткам 3T3-L1 мыши

Номер соединения	Цитотоксичность, EC50 мкМ
1	226,4±2
2	>200
3	143,6±3
5	195,2±2
6	124,4±2
7	104,4±2
8	193,9±4
11	184,5±3
20	137,5±1,5

Пример 5. Снижение внутриглазного давления под действием производных простагландина F_{2α}.

Исследование проведено на кроликах породы Шиншилла массой 2,5-3кг. ВГД измеряли при помощи автоматического ручного тонометра для ветеринарии Tonovet (Icare, Финляндия).

Для исследования каждого образца использовали 2 группы кроликов :

5 животных , получавших однократную инстилляцию образца в оба глаза ;

5 животных , получавших однократную инстилляцию физраствора в оба глаза .

Все исследованные образцы закапывали по 2 капли одноразовой пипеткой .Измерение ВГД проводили до закапывания и далее через каждый час в течение 6 часов .Результаты представлены в таблице 2. Все исследованные вещества обладали способностью снижать внутриглазное давление у нормотензивных кроликов .Наиболее выражен этот эффект для соединений 3 и 6.

Таблица 2. Снижение внутриглазного давления у нормотензивных кроликов после инстилляций растворов производных простагландинов (максимальное значение усредненных данных по 5 животным)

Номер соединения	Снижение ВГД, мм рт.ст.
3	3,20
5	1,20
6	3,30
8	2,00
11	1,50
19	1,90

Пример 6. Увеличение концентрации внутриклеточного кальция под действием производных простагландина F_{2α}.

Клетки 3T3-L1 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% сыворотки новорожденных телят (FCS), 4 мМ L-глутамина , 100 ед/мл пенициллина , 100 мкг /мл стрептомицина , 2.5 мкг /мл амфотерицина В .Клетки культивировали в атмосфере 5% CO₂, 95% влажности при температуре 37°C.

Плотность клеток на момент эксперимента 7000 в лунке 96-луночного планшета, краситель Calcium Green (1.5 мМ, загрузка в 0.4% Pluronic F-62 в среде инкубации без БСА 1 час при 37С, трехкратная промывка 200 мкл среды инкубации после загрузки), среда инкубации: раствор Хэнкса, 5 1 г/л D-глюкоза, 1 мг/мл обезжиренный БСА, внесение веществ в этаноле (<0.5% финальная концентрация), инкубация при 25°С, детектирование при длине волны возб. 485 нм, детектирования 535 нм.

Результаты

При добавлении испытуемых веществ к клеткам 3T3-L1 происходит 10 увеличение концентрации внутриклеточного кальция. Так при добавлении веществ сравнения: 67 мкМ простагландина F_{2a} и простамида F2 (этаноламида простагландина F_{2a}) флуоресценция кальциевого сенсора возрастает на 195 и 185 у.е. относительно контроля соответственно за 10 мин; тогда как в присутствии вещества 3, такое увеличение составило 405 у.е.

15 Пример 7. Генерация оксида азота под действием производных простагландина F_{2a} .

Клетки 3T3-L1 инкубировали при 95% влажности, в атмосфере 5% CO_2 , при температуре 37°С. Культивирование проводили в среде DMEM, содержащей 7% FBS, 2 мМ глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл 20 стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина В. Клетки пересеивали каждые 48-72 ч. Для суспендирования клетки инкубировали в растворе Версена в течение 2-3 мин и в растворе Трипсин-ЭДТА (0.25 %).

Определение уровня генерации NO

Клетки рассеивали по 30 тыс. в лунки (монослой) 96-луночного планшета 25 в 100 мкл среды. Инкубация с веществами продолжалась 20 часов. После этого из каждой лунки отбирали аликвоту среды и определяли концентрацию NO по модифицированному методу Гриса. К 75 мкл анализируемой смеси в лунках 96-луночного планшета для ИФА добавляли 12.5 мкл водного раствора 0.04% сульфаниламида, выдерживали при комнатной температуре 10 мин с защитой 30 от света, после чего добавляли 12.5 мкл 2% раствора нафтилэтилендиамина в

3M HCl, выдерживали ещё 10 минут при комнатной температуре с защитой от света, после чего определяли оптическое поглощение при длине волны 540 нм.

Для большинства исследованных соединений максимальную активность по индукции генерации оксида азота наблюдали при концентрации 5 испытываемого вещества 100 мкМ. Результаты отображены в Таблице 3.

Таблица 3. Генерация оксида азота (NO) клетками 3T3-L1 мыши под действием производных простагландина F_{2a} при концентрации 100 мкМ

Номер соединения	Генерация NO, % к контролю
1	7
2	25
3	15
6	5
7	15
8	22
11	28
20	57

Однако для амида простагландина F_{2a} (3) наиболее эффективной была концентрация 25 мкМ. При этой концентрации уровень оксида азота в клетках 3T3-L1 повышался на 60% по отношению к контролю, указанному на Фигуре 1.

15

20

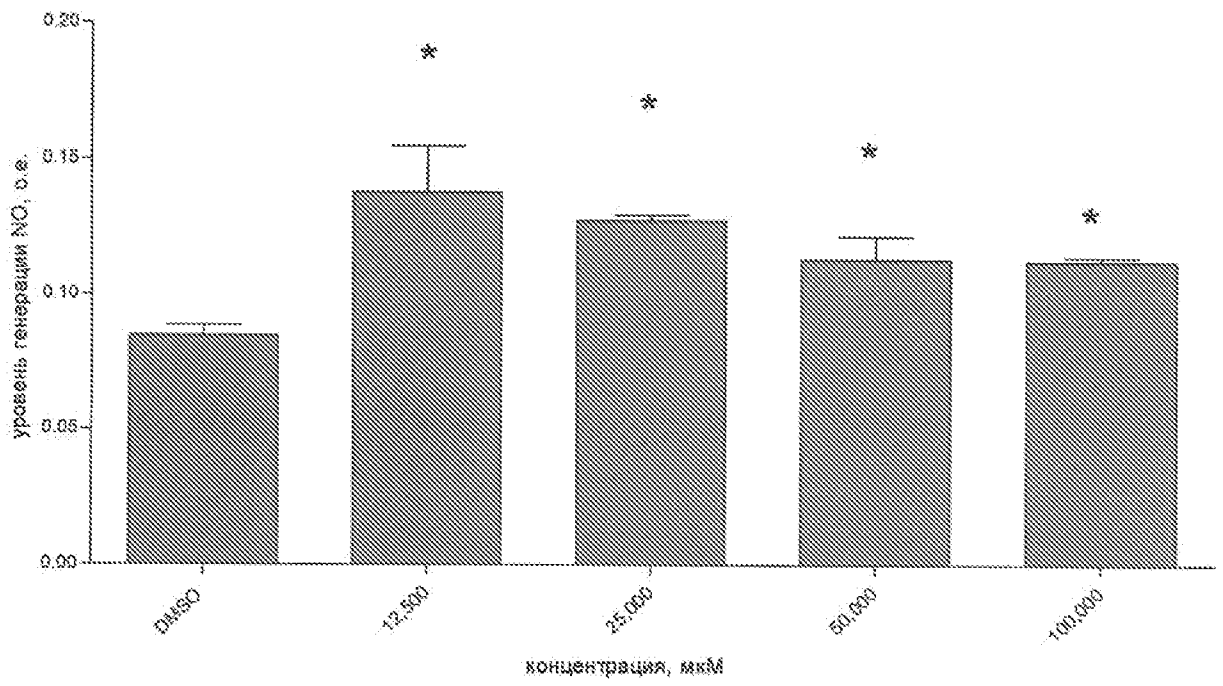


Рис.1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2019/050062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07C 405/00 (2006.01); C07D 207/08 (2006.01); A61K 31/5575 (2006.01); A61P 27/00 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07C 405/00, C07D 207/08, A61K 31/5575, A61P 27/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN, SciFinder, PatSearch, Espasenet, USPTO, DWPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/58866 A2 (ALLERGAN SALES, INC.) 16.08.2001, p. 10, items 2, 10, 11, 12, the abstract	1-3
A	JP 49-69636 (ONO PHARM. CO.) 05.07.1974	1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 20 August 2019 (20.08.2019)		Date of mailing of the international search report 19 September 2019 (19.09.2019)
Name and mailing address of the ISA/ RU		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2019/050062

<p>A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ</p> <p><i>C07C 405/00 (2006.01)</i> <i>C07D 207/08 (2006.01)</i> <i>A61K 31/5575 (2006.01)</i> <i>A61P 27/00 (2006.01)</i></p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>												
<p>B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p>C07C 405/00, C07D 207/08, A61K 31/5575, A61P 27/00</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p>STN, SciFinder, PatSearch, Espasenet, USPTO, DWPI</p>												
<p>C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Категория*</th> <th>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th>Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 01/58866 A2 (ALLERGAN SALES, INC.) 16.08.2001, с. 10, пункты 2, 10, 11, 12, реферат</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 49-69636 (ONO PHARM. CO.) 05.07.1974</td> <td>1-3</td> </tr> </tbody> </table>			Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	X	WO 01/58866 A2 (ALLERGAN SALES, INC.) 16.08.2001, с. 10, пункты 2, 10, 11, 12, реферат	1-3	A	JP 49-69636 (ONO PHARM. CO.) 05.07.1974	1-3	
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №										
X	WO 01/58866 A2 (ALLERGAN SALES, INC.) 16.08.2001, с. 10, пункты 2, 10, 11, 12, реферат	1-3										
A	JP 49-69636 (ONO PHARM. CO.) 05.07.1974	1-3										
<p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы C. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p>												
<p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <table border="0"> <tr> <td>“A” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</td> <td>“T” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</td> </tr> <tr> <td>“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</td> <td>“X” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</td> </tr> <tr> <td>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</td> <td>“Y” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</td> </tr> <tr> <td>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</td> <td>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</td> </tr> <tr> <td>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</td> <td></td> </tr> </table>			“A” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“T” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение	“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“X” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности	“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	“Y” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста	“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.	“&” документ, являющийся патентом-аналогом	“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	
“A” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“T” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение											
“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“X” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности											
“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	“Y” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста											
“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.	“&” документ, являющийся патентом-аналогом											
“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета												
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p>20 августа 2019 (20.08.2019)</p>		<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p>19 сентября 2019 (19.09.2019)</p>										
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37</p>		<p>Уполномоченное лицо: О.В. Заварзина Телефон № 499-240-60-15</p>										