

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **233780**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **418628**

(22) Data zgłoszenia: **09.09.2016**

(51) Int.Cl.

A61K 31/538 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Zastosowanie pochodnych fenoksazonowych jako inhibitorów aminopeptydaz**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

25.09.2017 BUP 20/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

29.11.2019 WUP 11/19

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

MIROSŁAW GIURG, Suszkowice, PL

EWELINA TOMCZAK-WĘGLARZ, Wrocław, PL

EWA SUSKA, Siedliska, PL

ARTUR MUCHA, Zielęcice, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 233780 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie pochodnych fenoksazonowych w postaci: Aktynomycyny D, Kwetiomycyny A oraz pokrewnych związków fenoksazonowych jako inhibitorów aminopeptydaz w szczególności alanylowej i metioninowej, znajdujących zastosowanie w medycynie jako składniki aktywne leków przeciwnowotworowych oraz w diagnostyce medycznej.

2-Amino-3H-fenoksaz-3-ony stanowią fragment aktywny szeregu biologicznie aktywnych związków naturalnych. Przykładem są Aktynomycyny, antybiotyki polipeptydowe znane z pracy przeglądowej Hollstein *Chemical Reviews*, **1964**, 625–652. Aktynomycyna D jest stosowana w leczeniu chorób nowotworowych. Jej płaski szkielet fenoksazonowy selektywnie interkaluje w helisę DNA, w wyniku spowalniając wytwarzanie białek niezbędnych do rozwoju szybko dzielących się komórek nowotworowych podobnie jak analogi Aktynomycyny, znane z publikacji Veselkov et al. *European Journal of Biochemistry*, **2003**, 270, 4200–4207, Teller et al. *Journal of National Cancer Institute*, **1962**, 28(2), 353–364, DoPaolo et al. *Antibiotics and Chemotherapy* (Washington, D.C.) (**1957**), 7, 465–470, Ishida et al. *Anti-Cancer Drugs*, **1996**, 7, 591–595.

Z artykułu przeglądowego Jose & Burgess *Tetrahedron*, **2006**, 62, 11021–11037 znane są również właściwości fluorescencyjne fenoksazononów. Patent WO 2010/062536 A2 ujawnia ich przydatność w identyfikacji martwych komórek, a patent US 2010/0000032 A1 ujawnia ich przydatność jako barwniki syntetyczne. 2-Amino-3H-fenoksaz-3-onowe związki naturalne z wolną grupą karboksylową, kwasy plektosphaeroilowe znane z publikacji Carr et al. *Organic Letters*, **2009**, 11(14), 2996–2999, oraz kwas cynnabarynowy znany z publikacji Pasceri et al. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**, 56, 3310–3317, hamują aktywność 2,3-dioksygenazy indoloaminowej.

Z publikacji Maskey et al. *The Journal of Antibiotics*, **2003**, 56, 622–629 i Imai et al. *The Journal of Antibiotics*, **1990**, 43(12), 1606–1607 znane są Chandrananimycyny i Eksfoliazon, związki acylowane na grupie aminowej 2-aminofenoksazonów, wykazujące aktywność przeciwnowotworową. Z publikacji Zaytsev et al. *Organic Biomolecular Chemistry*, **2008**, 6, 682–692 i Bebernjak et al. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, 59, 4476–4487, znanej jest wykorzystanie β -alanylowych acylowanych pochodnych 7 i 8 amino-3H-fenoksaz-3-onów w wykrywaniu bakteryjnej aminopeptydazy β -alanylowej i identyfikacji uciążliwej klinicznie bakterii gram ujemnej, *Pseudomonas aeruginosa*.

Aminopeptydazy znane z opracowania literaturowego Rawlings et al. *Nucleic Acids Research*, **2006**, 34, D270–D272 należą do grupy metalozależnych egzopeptydaz, które katalizują uwolnienie aminokwasów z N-końca łańcucha polipeptydowego. Podwyższona ekspresja aminopeptydaz uwalniających naturalne aminokwasy, aminopeptydazy alanylowej (E.C. 3.4.11.2, aminopeptydaza N, APN, CD13) znanej z artykułu przeglądowego Luan & Xu, *Current Medicinal Chemistry*, **2007**, 14, 639–647 i aminopeptydazy metioninowej typ 2 (E.C. 3.4.11.18, MetAP2) znanej z opracowania Lowther & Matthews, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2000**, 1477(1–2), 157–167, jest kojarzona w artykułach przeglądowych Mina-Osorio, *Trends in Molecular Medicine*, 2008, 14, 361–371 i Wickström et al. *Cancer Science*, **2011**, 102, 501–508 z niektórymi stanami chorobowymi takimi jak białaczka i nowotwory. Z publikacji Lowther & Matthews, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2000**, 1477 (1–2), 157–167, i Selvakumaret al. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2006**, 1765(2), 148–154 znanym jest, że MetAP2 bierze udział w powstawaniu nowych naczyń krwionośnych (angiogenezie) i w zaprogramowanej śmierci komórki (apoptozie). W publikacji Catalano et al. *The American Journal of Pathology*, **2001**, 159(2), 721–731 znanym jest, że MetAP2 jest głównym regulatorem proliferacji i apoptozy podczas rozwoju międzybłoniaka płucnej.

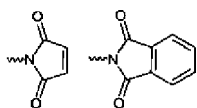
Podwyższony poziom APN został zaobserwowany w komórkach takich nowotworów jak czerniak [Fujii et al. *Clinical & Experimental Metastasis*, **1995**, 13(5), 337–344], rak nerki [Kitamura et al. *Hinyōdoka Kyo. Acta Urologica Japonica*, 1990, 36(5), 535–539], rak trzustki (carcinoma pancreatic) [Ikeda et al. *Clinical Cancer Research*, **2003**, 9(4), 1503–1508], rak okrężnicy [Hashida et al. *Gastroenterology*, **2002**, 122(2), 376–386], rak prostaty [Ishii et al. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **2001**, 24(3), 226–230], rak żołądka [Cari-McGrath et al. *International Journal of Oncology*, **2004**, 25(5), 1223–1232] czy rak tarczycy [Kehlen, et al. *Cancer Research*, **2003**, 63(23), 8500–8506]. Z publikacji Griffith et al. *Chemistry & Biology*, **1997**, 4(6), 461–471 i z pracy przeglądowej Mucha et al. *Biochimie*, **2010**, 92(11), 1509–1529 znanym jest, że fumagilina i jej syntetyczny analog ovalicin wiążą kowalencyjnie z MetAP2 i hamują jej aktywność.

Sterowanie aktywnością aminopeptydaz tak zwierzęcych jak i ludzkich umożliwi opracowanie nowej generacji leków do zastosowania zarówno w leczeniu ludzi jak i w hodowli. Literatura dotycząca odwracalnych inhibitorów MetAP2 jest ograniczona do kilku publikacji. Odwracalne inhibitory MetAP2 to związki oparte o strukturę fumagiliny i bestatyny [Zhou et al. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2003**, 46(16), 3452–3454, Sheppard et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2004**, 14(4), 865–868],

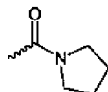
1,2,4-triazolu [Kallander et al. Journal of Medicinal Chemistry, **2005**, 48(18), 5644–5647] i pirazoloindoli [McBride et al. Bioorganic&MedicinalChemistryLetters, **2016**, 26(12), 2779–2783].

Do najważniejszych inhibitorów APN należą Bestatyna znana z publikacji Wilkes & Prescott, Journal of Biological Chemistry, **1985**, 260(24), 13154–13162], kurkumina znana z publikacji Shim et al. Chemistry&Biology, **2003**, 10(8), 695–704, kwas betulinowy znany z publikacji Drąg et al. Molecules, **2009**, 14(4), 1639–1651, fosfonowe analogi aminokwasów przykładowo znane z publikacji Węglarz-Tomczak et al. European Journal of Medicinal Chemistry, **2016**, 117, 187–196 i analogi kwasu hydroksamowego znane z publikacji Drąg et al. Bioorganic&MedicinalChemistryLetters, **2007**, 17(6), 1516–1519 czy fosfinowe analogi dipeptydów znane z publikacji Grembecka et al. Journal of Medicinal Chemistry, **2003**, 46(13), 2641–2655 i Vassiliou et al. Journal of Medicinal Chemistry, **2014**, 57(19), 8140–8151 oraz α -aminowe pochodne tetralonu znane z publikacji Revelant et al. Bioorganic&Medicinal Chemistry, **2015**, 23(13), 3192–3207. Wszystkie te związki oddziałują odwracanie z APN. Chociaż w literaturze opisanych jest szereg związków hamujących aktywności tych enzymów, lecz nie ma doniesień o inhibitorach działających zarówno na APN jak i na MetAP2 równocześnie.

Istotą rozwiązania według wynalazku jest zastosowanie pochodnych fenoksazonowych o wzorach ogólnych 1 lub 2, w których R^1 oznacza H, Me, Cl, R^2



oznacza H, NH_2 , $NHCOX_nY$, R^3 oznacza H, NH_2 , R^4 oznacza H, COOH, F, Cl, R^5 oznacza H, t-Bu, COOH, F, Cl, Br, R^6 oznacza H, Me, R^7 oznacza Cl, Br, w których X oznacza CH_2 lub (Z)-1,2-eten i n stanowi liczbę 1, 2 lub 3,



Y oznacza H, COOH, do leczenia chorób nowotworowych, korzystnie w stosunku do aminopeptydaz: SsAPN, HsAPN lub HsMetAP2.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładzie realizacji w procedurze wyznaczania K_i oraz w tabeli 1.

Wyznaczenie K_i .

Pomiary spektrofлуorometryczne wykonywano przy użyciu spektrometru Spectra MAX Gemini EM fluorometer (Molecular Devices).

Rekombinowana ludzka aminopeptydaza alanylowa (HsAPN) została zakupiona w formie liofilizowanej. Enzym został rozpuszczony w 50 mM buforze Tris-HCl o pH = 7,0 i był używany bezpośrednio w badaniach kinetycznych.

Aminopeptydaza alanylowa z nerki wieprzowej (SsAPN) została zakupiona w formie liofilizowanej. Enzym został rozpuszczony w 50 mM buforze Tris-HCl o pH = 7,5 i był użyty bezpośrednio w badaniach kinetycznych.

Rekombinowana ludzka aminopeptydaza metioninowa 2 (HsMetAP2) została zakupiona w formie liofilizowanej. Enzym został rozpuszczony w 50 mM buforze 100 mM Tris-maleate o pH = 7,5 zawierającym $CoCl_2$ (0,1 mM), NaCl (100 mM) oraz 0,075% albuminy i był używany bezpośrednio w badaniach kinetycznych.

Substraty fluorogeniczne Ala-AMC (L-alanylo-7-amido-4-metylokumaryna) i Met-AMC (L-metionino-7-amido-4-metylokumaryna) zostały zakupione w PeptaNova.

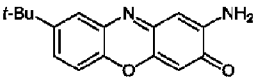
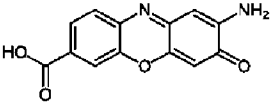
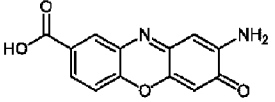
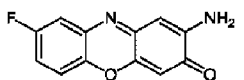
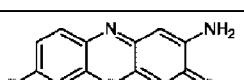
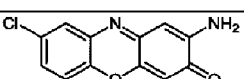
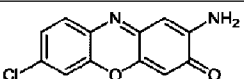
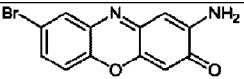
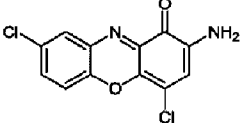
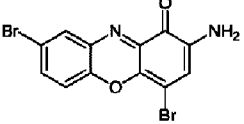
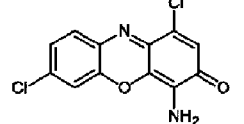
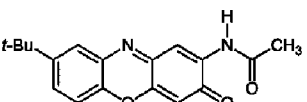
Aktywność inhibitorów wobec SsAPN, HsAPN i MetAP2 była badana na dziewięćdziesięciosześcio dołkowej płytce w dwóch długościach fal: wzbudzenia w 355 nm i emisji w 460 nm w odpowiednim dla każdego enzymu buforze w 310K. Enzymy były inkubowane przez 30–60 minut z inhibitorem w ośmiu różnych stężeniach, przed dodaniem substratu w odpowiednim stężeniu. Uwolnienie fluoroforu było monitorowane przez 15 minut. Szybkość hydrolizy była obliczana na podstawie przyrostu fluorescencji w czasie. Mechanizmy inhibicji były określane na podstawie wykresu Lineweaver-Burka, Dixona oraz z zależności IC_{50} od stężenia enzymu $[E]$ i substratu $[S]$. Związki wykazują mechanizm odwracalny szybkowiązący kompetycyjny wobec SsAPN, HsAPN i MetAP2. Stała K_i była obliczana przy użyciu równania Chenga-Prusoffa dla inhibitorów kompetycyjnych ($K_i = IC_{50}/[1 + (S/K_m)]$) z IC_{50} wyznaczonej z wykresu szybkości hydrolizy V w funkcji logarytmu stężenia inhibitora $[I]$ za pomocą programu GraphPadPrism (K_i – stała inhibicji, IC_{50} – stężenie inhibitora, które wywołuje 50% inhibicji. V – szybkość hydrolizy, $[E]$ – stężenie enzymu, $[I]$ – stężenie inhibitora, K_m – stała Michaelisa-Menten, $[S]$ – stężenie substratu, IC_{50} – stężenie inhibitora, które wywołuje 50% inhibicji).

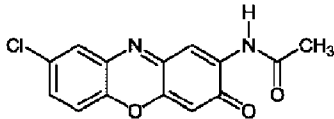
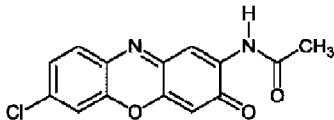
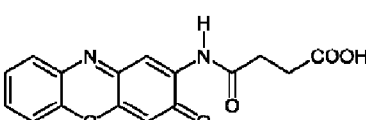
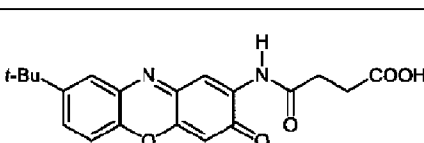
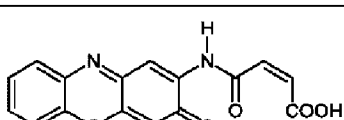
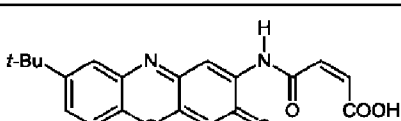
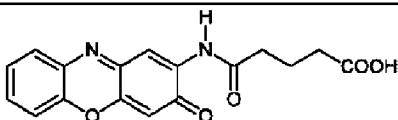
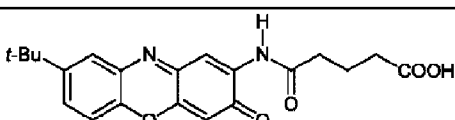
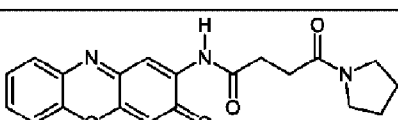
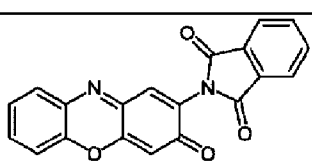
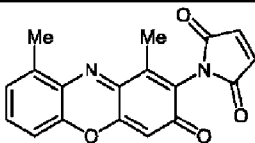
Stężenie DMSO w próbce było mniejsze niż 1% (v/v).

W tabeli 1 przedstawiono wyniki stałej inhibicji K_i wobec SsAPN, HsAPN i MetAP2 dla poszczególnych pochodnych fenoksazonowych.

W tab. 1 użyto następujących oznaczeń: SsAPN – aminopeptydaza alanylowa z nerki wieprzowej, HsAPN – rekombinowana ludzka aminopeptydaza alanylowa, HsMetAP2 – rekombinowana ludzka aminopeptydaza metioninowa 2.

Tabela 1.
Wyniki stałej inhibicji K_i wobec SsAPN, HsAPN i HsMetAP2

Związek	K_i [$\mu\text{M}/\text{dm}^3$]		
	SsAPN	HsAPN	HsMetAP2
	13,39	26,02	2,09
	4,52	12,02	6,88
	4,55	16,08	8,05
	52,96	50,47	92,03
	6,81	16,01	9,94
	171,18	45,07	232,4
	7,29	3,73	38,15
	135,94	204,1	117,28
	4,26	4,73	135,42
	5,65	7,63	223,53
	52,88	25,97	102,75
	102,6	87,32	476,1

	141,3	70,72	120,51
	267,39	>500	>500
	10,32	13,84	7,09
	18,06	11,20	6,23
	6,58	27,42	9,40
	19,15	29,17	2,65
	16,70	24,96	8,63
	16,33	33,42	23,29
	48,75	19,84	—
	133,46	166,42	>500
	254,99	36,33	190,34

Po przeanalizowaniu tabeli 1 i sposobu oznaczenia aktywności, zasadniczą korzyścią wynikającą ze stosowania inhibitorów będących przedmiotem wynalazku jest wysoka zdolność hamowania aktywności aminopeptydaz wykazujących podwyższone stężenie podczas rozwoju choroby nowotworowej. Stała inhibicji fenoksazonów mieści się w przedziale od 500 $\mu\text{mol/dm}^3$ do 2,09 $\mu\text{mol/dm}^3$. Zaletą jest zdolność hamowania przez fenoksazon dwóch aminopeptydaz ludzkich jednocześnie.

7-Fluoro-3H-fenoksaz-3-on i 7-chloro-3H-fenoksaz-3-on wykazują stałą inhibicji w przedziale 3,73–9,94 $\mu\text{mol/dm}^3$ względem obu typów aminopeptydaz. Również karboksylowane w pozycji 7 lub 8 2-amino-3H-fenoksaz-3-ony wykazują zdolność hamowania dwóch typów aminopeptydaz w przedziale 4,52–8,05 $\mu\text{mol/dm}^3$.

8-tert-Butylowa pochodna Kwestiomycyny A wykazuje zdolność hamowania ludzkiej aminopeptydazy metioninowej HsMetAP2 na poziomie 2,09 $\mu\text{mol/dm}^3$.

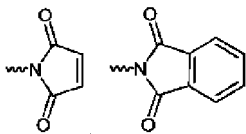
Acylowane pochodne Kwestiomycyny A połączone łącznikiem alkilowym lub grupą (Z)-1,2-etenową z wolną grupą karboksylową wykazują aktywność wobec HsMetAP2 rzędu 7,09–9,40 $\mu\text{mol/dm}^3$. Dodatkową zaletą jest wysoka aktywność względem SsAPN związków z krótszym łącznikiem na poziomie 6,58–10,32 $\mu\text{mol/dm}^3$. Ponadto pochodne z krótszymi łącznikami podstawione grupą 8-tert-butylową wykazują względem HsMetAP2 stałą inhibicji rzędu 2,65–6,23 $\mu\text{mol/dm}^3$.

Zasadniczą korzyścią techniczno-użytkową jest wysoka zdolność hamowania aktywności obu testowanych aminopeptydaz ludzkich, HsAPN oraz HsMetAP2 na poziomie odpowiednio 11,20 $\mu\text{mol/dm}^3$ i 6,23 $\mu\text{mol/dm}^3$ przez fenoksazon w postaci kwasu 4-[(8-tert-butyl-3-okso-3H-fenoksaz-2-yl)amino]-4-okso-butanowego, oraz na poziomie odpowiednio 12,02 $\mu\text{mol/dm}^3$ i 6,88 $\mu\text{mol/dm}^3$ przez związek w postaci 2-amino-8-karboksy-3H-fenoksaz-3-onu.

2-Amino-1H-fenoksaz-1-ony przedstawione wzorem 2 wykazują wysoką aktywność rzędu 4,26–7,63 $\mu\text{mol/dm}^3$ względem testowanych aminopeptydaz alanylowych. Dodatkową zaletą jest aktywność związku z mniejszym podstawnikiem chlorowym w postaci 2-amino-4,8-dichloro-1H-fenoksaz-1-onu rzędu 4,26–4,73 $\mu\text{mol/dm}^3$.

Zastrzeżenia patentowe

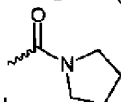
1. Pochodne fenoksazonowe o wzorach ogólnych 1 lub 2 w których R^1 oznacza H, Me,



Cl, R^2 oznacza H,

NH_2 , NHCOX_nY , R^3 oznacza H, NH_2

R^4 H COOH, F Cl R^5 oznacza H, t-Bu, COOH, F, Cl, Br, R^6 oznacza H, Me R^7 oznacza Cl, Br w których X oznacza CH_2 lub (Z)-1,2-eten i n stanowi liczbę 1, 2 lub 3,

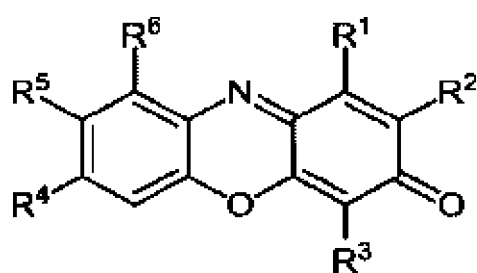


Y oznacza H, COOH

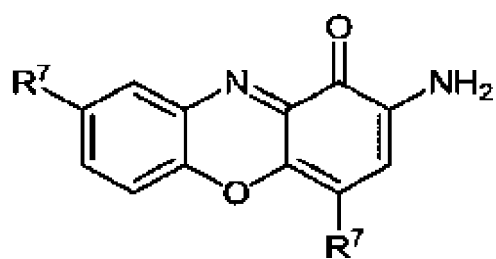
, do zastosowania w leczeniu chorób nowotworowych.

2. Pochodne fenoksazonowe zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że pochodne fenoksazonowe o wzorach ogólnych 1 lub 2 określonych w zastrz. 1 stosuje się do leczenia chorób nowotworowych, w stosunku do aminopeptydaz wybranych z grupy aminopeptydaz alanylowych (E.C. 3.3.12.2, aminopeptydaza N, APN, CD12) SsAPN i HsAPN i aminopeptydazy metioninowej typ 2 (E.C. 3.3.H.18, MetAP2), HsMetAP2.

Rysunek



wzór-1



wzór 2

