

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 244979 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440633**

(22) Data zgłoszenia: **2022.03.11**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.09.18 BUP 38/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.04.08 WUP 15/2024**

(51) MKP:

A61K 31/69 (2006.01)

A61K 31/662 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ,
Lublin, PL**

**UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU, Toruń, PL**

**INSTYTUT KATALIZY I FIZYKOCHEMII
POWIERZCHNI IM. JERZEGO HABERA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Kraków, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**MAGDALENA MIZERSKA-KOWALSKA,
Lublin, PL**

SYLWIA SOWA, Lublin, PL

BARBARA ZDZISIŃSKA, Lublin, PL

BEATA DONARSKA, Bydgoszcz, PL

KRZYSZTOF Z. ŁĄCZKOWSKI, Bydgoszcz, PL

WOJCIECH PŁAZIŃSKI, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Maria Brodzicka, Lublin, PL

(54) Tytuł:

**Ester diizopropylowy kwasu [1-(N-p-bromofenyloamino)]-1-(p-nitrofenylo)metyloboranato-
fosfonawego do zastosowania w leczeniu schorzeń, w których efekt terapeutyczny
osiągany jest poprzez zahamowanie aktywności neutralnej endopeptydazy**

PL 244979 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest ester diizopropylowy kwasu [1-(*N-p*-bromofenyloamino)]-1-(*p*-nitrofenylo)metyloboranatofosfonawego o wzorze 1 do zastosowania w leczeniu schorzeń, w których efekt terapeutyczny osiągany jest poprzez zahamowanie aktywności neutralnej endopeptydazy.

Problem techniczny jaki rozwiązuje wynalazek, to nowe medyczne zastosowanie związku chemicznego o wzorze 1, jako składnika leku stosowanego w leczeniu schorzeń, w których efekt terapeutyczny osiągany jest poprzez zahamowanie aktywności neutralnej endopeptydazy.

Neutralna endopeptydaza (NEP; EC 3.4.21.11) to zależny od cynku enzym proteolityczny, który degradowe bioaktywne peptydy, m. in. przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP) i peptyd natriuretyczny typu B oraz enkefalinę, hamując tym samym ich fizjologiczne działanie. Peptydy natriuretyczne biorą udział m. in. w utrzymaniu prawidłowego ciśnienia krwi. Natomiast enkefalinę regulują m. in. wydzielanie wody i elektrolitów do światła jelita. W związku z powyższym hamowanie aktywności enzymatycznej neutralnej endopeptydazy znalazło zastosowanie w leczeniu m. in. niewydolności serca i biegunek. Ujawniony m. in. w EP0555175, CN105837464, WO2007056546, WO2009061713, WO2017012600, EP3658122 sakubityryl, którego aktywnym metabolitem jest związek o nazwie LBQ657 będący inhibitorem neutralnej endopeptydazy, wchodzi w skład leku sakubityryl/walsartan stosowanego w leczeniu chorób nadciśnieniowych serca. Natomiast ujawniony m. in. w US4513009, EP1718337, WO01/97803 racekadotryl, którego aktywnym metabolitem jest tiurfan – inhibitor neutralnej endopeptydazy, stosowany jest w leczeniu biegunek.

Ze stanu techniki wiadomo, że różne pochodne aminokwasów i peptydy przez nie utworzone ze względu na podobieństwo strukturalne do niemodyfikowanych odpowiedników, mogą być stosowane w celach terapeutycznych jako inhibitory enzymów proteolitycznych. Przykładem jest aktywna forma racekadotrylu, tiurfan, który jest tiolową pochodną alfa aminokwasu glicyny o aktywności inhibitora neutralnej endopeptydazy. W publikacjach, jak np. Jullien N. i in., *J. Med. Chem.* 2010, 14, 208–220; Mucha A. i in., *J. Med. Chem.*, 2011, 54, 5955–5980 oraz Demkowicz S. i in., *RSC Advances*, 2016, 6, 7101–7112 ujawniono, że alfa aminofosfoniany, czyli alfa aminokwasy, w których grupa karboksylowa została zastąpiona przez ugrupowanie fosfonowe również wykazują aktywność inhibitorową wobec różnych grup enzymów proteolitycznych, w tym wobec neutralnej endopeptydazy.

Wśród tych związków znajdujących medyczne zastosowanie, brak jest informacji na temat zastosowania estru diizopropylowego kwasu [1-(*N-p*-bromofenyloamino)]-1-(*p*-nitrofenylo)metyloboranatofosfonawego (wzór 1) jako inhibitora neutralnej endopeptydazy. Ze stanu techniki wiadomo jedynie, że ester diizopropylowy kwasu [1-(*N-p*-bromofenyloamino)]-1-(*p*-nitrofenylo)metyloboranatofosfonawego wykazuje działanie przeciwnowotworowe wobec komórek kostniakomięsaka, co zostało przedstawione w opisie wynalazku P.438017.

Nieoczekiwanie, w badaniach *in silico* modelowania molekularnego wykazano, że ester według wynalazku o wzorze 1, niezależnie od jego formy stereoizomerycznej jest ligandem dla neutralnej endopeptydazy poprzez oddziaływanie z centrum aktywnym, co może stanowić o jego właściwościach inhibitorowych. Uzyskane wyniki modelowania molekularnego skłoniły do przeprowadzania dalszych badań mających na celu ocenę potencjalnej aktywności biologicznej estru według wzoru 1 jako inhibitora aktywności proteolitycznej neutralnej endopeptydazy oraz ocenę właściwości fizykochemicznych estru według wynalazku o wzorze 1, które są istotne dla substancji o zastosowaniu terapeutycznym.

Istotą wynalazku jest ester diizopropylowy kwasu [1-(*N-p*-bromofenyloamino)]-1-(*p*-nitrofenylo)metyloboranatofosfonawego o wzorze 1 do zastosowania w leczeniu schorzeń, w których efekt terapeutyczny osiągany jest poprzez zahamowanie aktywności neutralnej endopeptydazy.

Wynalazek przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

Przykład 1

Modelowanie molekularne oddziaływań pomiędzy estrem według wynalazku i centrum aktywnym neutralnej endopeptydazy.

Modelowanie molekularne *in silico* jest nowoczesną metodą stosowaną w początkowych etapach projektowania i badania nowych, potencjalnych substancji leczniczych. Pozwala m.in. na ocenę przestrzennych oddziaływań pomiędzy centrum aktywnym enzymu a ligandem, który może być inhibitorem tego enzymu. Struktura cząsteczki estru według wzoru 1 została przygotowana przy użyciu oprogramowania Avogadro 1.2.0 [Hanwell M. D. i in., *Cheminformatics*, 2012. 4, 17], a następnie zoptymalizowana w ramach pola siłowego UFF [Rappe A. K. i in., *Am. Chem. Soc.* 1992. 114, 10024–10035]. Ester według wzoru 1 zawiera w swojej strukturze chiralny atom węgla, dlatego odpo-

wiadające mu stereoizomery rozpatrywano oddzielnie. Zoptymalizowany ligand został zadokowany do kieszeni wiążących neutralnej endopeptydazy, w strukturach znajdujących się w następujących siedmiu pozycjach bazy danych PDB: 1rlj (rozdzielczość rentgenowska: 0,235 nm), 2qpj (rozdzielczość rentgenowska: 0,205 nm), 5jmy (rozdzielczość rentgenowska: 0,200 nm), 6gid (rozdzielczość rentgenowska: 0,190 nm), 6suk (rozdzielczość rentgenowska: 0,175 nm) i 6thp (rozdzielczość rentgenowska: 0,254 nm). Do symulacji dokowania zastosowano oprogramowanie AutoDock Vina [Trott O. i in., *J. Comput. Chem.*, 2010. 31, 455–461]. Procedura dokowania została przeprowadzona w obszarze prostopadłościanu, który obejmował cały skrzystalizowany ligand obecny w strukturze PDB: 6thp oraz najbliższe reszty aminokwasowe, które wykazywały kontakt z tym ligandem. Łańcuchy boczne aminokwasów w kieszeni wiążącej (tj.: Phe106, Arg110, Phe544, Glu584, Val580, Trp693, Arg717) zostały uelastycznione, z wyjątkiem histydyn koordynujących jon Zn^{2+} . W procedurze dokowania zastosowano wszystkie domyślne procedury i algorytmy zaimplementowane w programie AutoDock Vina. Przewidywane energie wiązania zostały uśrednione dla wszystkich struktur białka oraz możliwych stereoizomerów estru według wynalazku o wzorze 1.

Korzystniejszy sposób wiązania liganda związany jest z niższą wartością energii wiązania, dlatego podczas dalszej analizy były brane pod uwagę tylko najniższe wartości energii i odpowiadające im informacje strukturalne uzyskane dla estru według wynalazku.

Metodologia dokowania została zwalidowana poprzez symulację dokowania liganda obecnego w jednej z badanych struktur białkowych (tj. 6thp). Zastosowana procedura okazała się poprawna względem przewidywanej pozycji liganda w kieszeni wiążącej (RMSD = ~0,084 nm). Ilustracja graficzna wyniku walidacji przedstawiona jest na rysunku jako fig. 1.

Częściowe energie oddziaływania pomiędzy centrum aktywnym neutralnej endopeptydazy i estru według wynalazku uzyskane dla jego poszczególnych stereoizomerów wynoszą -6.76 i -6.64 kcal/mol. Natomiast dodatkowo uśredniona dla siedmiu struktur neutralnej endopeptydazy spośród dostępnych w bazie PDB energia wiązania wynosi -6,70 kcal/mol. Biorąc pod uwagę oddziaływania estru według wynalazku i neutralnej endopeptydazy, główne miejsce wiązania znajduje się w pobliżu jonu Zn^{2+} . Kompleksy ester według wynalazku – neutralna endopeptydaza uzyskane w wyniku modelowania, wskazują, że wiązanie estru zachodzi głównie poprzez dwa typy oddziaływań atraktywnych. Pierwszym z nich są oddziaływania $Zn^{2+}-\pi$, w które zaangażowane są obie reszty fenylove obecne w strukturze estru według wynalazku. Poprzez rotację wokół wiązań pojedynczych, konformacja cząsteczki zmienia się, aby umożliwić jak najbliższy kontakt centralnej części pierścienia aromatycznego z jonem cynku. Taki układ, przestrzenny skutkuje najsilniejszymi oddziaływaniami typu kation- π . Drugim rodzajem oddziaływań jest wiązanie wodorowe z udziałem grupy -NH- łańcucha bocznego Asn542. Ponadto, stosunkowo niewielkie odległości pomiędzy fenyłowymi resztami estru według wynalazku a łańcuchami bocznymi aminokwasów aromatycznych Phe544, Phe106 i Trp693 wskazują na szereg oddziaływań typu $\pi-\pi$. Dodatkowo, w przypadku Arg717, Val580 oraz najbliższej reszty fenylovej mogą występować również oddziaływania H- π . Natomiast grupa -NH- we fragmencie szkieletowym Tyr545 w zależności od topologii molekularnej estru według wynalazku 1 może tworzyć wiązanie wodorowe z podstawnikiem akceptorowym wiązania wodorowego -NO₂, obecnym na cząsteczce fenylovej. Analiza oddziaływań pomiędzy jonami cynku a pierścieniami fenyłowymi estru według wynalazku 1 potwierdzają, że to oddziaływania $Zn^{2+}-\pi$ są przede wszystkim odpowiedzialne za wiązanie estru według wynalazku z neutralną endopeptydazą. Warto również zauważyć, że zmiany konformacji łańcuchów bocznych w kieszeni wiążącej, wywołane związaniem liganda, są bardzo niewielkie. Pomimo dopuszczalnej elastyczności, wszystkie łańcuchy boczne zasadniczo zachowały swoją oryginalną geometrię. Graficzna ilustracja wyników dokowania dwóch form stereoizomerycznych estru według wynalazku przedstawiona jest na rysunku jako fig. 2A i B.

Przykład 2

Oznaczenie aktywności proteolitycznej neutralnej endopeptydazy w obecności estru według wynalazku.

Ocena potencjalnej aktywności biologicznej estru według wynalazku jako inhibitora aktywności proteolitycznej neutralnej endopeptydazy została wykonana przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu zgodnie z instrukcją producenta. Zasada testu opiera się na zdolności aktywnej neutralnej endopeptydazy do rozkładu substratu specyficznego dla tego enzymu, którym jest peptyd połączony z fluoroforem Abz. Degradacja substratu-Abz związana jest z uwolnieniem fluoroforu, którego ilość jest wprost proporcjonalna do aktywności enzymu.

W celu oznaczenia aktywności proteolitycznej neutralnej endopeptydazy w obecności estru według wynalazku, enzym był inkubowany z estrem oraz substratem. Ester według wynalazku był zastosowany w stężeniach 0,01; 0,1; 0,5; 10; 50 μ M. Poziom fluorescencji wynikający z ilości uwolnionego fluoroforu był mierzony w trybie kinetycznym – w temperaturze 37°C po 1 i po 2 godzinach inkubacji przy długości fal Ex/Em = 330/430 nm. Kontrolę stanowiła próba, w której neutralna endopeptydaza była inkubowana tylko z substratem-Abz. Aktywność neutralnej endopeptydazy została wyliczona zgodnie z instrukcją na podstawie krzywej wzorcowej przedstawiającej zależność poziomu fluorescencji standardu fluoroforu od jego stężenia i wyrażona została w jednostkach μ U/ml. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach, a wyniki przedstawiono na rysunku jako fig. 3. Ester według wynalazku istotnie hamował aktywność neutralnej endopeptydazy we wszystkich zastosowanych stężeniach.

Przykład 3

Analiza *in silico* właściwości fizykochemicznych estru według wynalazku.

W oparciu o regułę Lipińskiego i regułę Vebera oraz z zastosowaniem programu SwissAdme [<http://www.swissadme.ch/>] obliczono wybrane parametry fizykochemiczne estru według wynalazku. Cechy fizykochemiczne nadają związkowi określone właściwości warunkujące możliwość ich zastosowania jako środki terapeutyczne, co zostało określone jako podobieństwo do znanych już leków (z ang. drug-likeness). Jedną z właściwości leków jest ich biodostępność na drodze zastosowania doustnego. Cechami fizykochemicznymi wpływającymi na tę właściwość są parametry zebrane i opisane jako reguły Lipińskiego [Lipiński C.A. i in., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997, 23, 3–25] i reguły Vebera [Veber D.F., i in., *J. Med. Chem.* 2002, 45, 2615–2623]: lipofilowości ($\log P \leq 5$), liczba akceptorów wiązań wodorowych ($HBA \leq 10$), liczba donorów wiązań wodorowych ($HBD \leq 5$), masa cząsteczkowa ($MW \leq 500$ Da), liczba wiązań rotacyjnych ($NRB \leq 10$) oraz topologiczna powierzchnia polarna ($TPSA \leq 140$ Å²). Cechy fizykochemiczne związków wpływają także na ich właściwości farmakokinetyczne takie jak wchłanianie, dystrybucja w organizmie, metabolizm i wydalanie (ADME, z ang. absorption, distribution, metabolism, and excretion), które uwarunkowane są absorpcją w przewodzie pokarmowym (GI absorption), przenikalnością przez barierę krew-mózg (BBB permeant), oddziaływaniem z glikoproteiną P (P-gp substrat) i koenzymami cytochromu P450 jako inhibitory (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) oraz przenikalnością przez skórę ($\log K_p$).

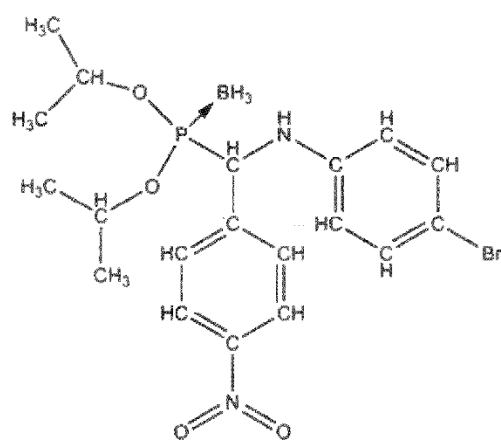
Analiza *in silico* właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych estru według wynalazku wykazała, że spełnia on wszystkie reguły Lipińskiego i Vebera, czyli typowe reguły podobieństwa do leków, a tym samym posiada on cechy fizykochemiczne warunkujące jego bardzo dobrą biodostępność po doustnym podaniu i wysoki poziom absorpcji z przewodu pokarmowego. Analiza wykazała możliwość oddziaływania z P-gp i z CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4. Nie wykazała natomiast cech warunkujących przenikalność przez barierę krew-mózg czy warunkujących oddziaływanie z CYP1A2. Analiza *in silico* właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych estru według wynalazku została przedstawiona na rysunku jako fig. 4.

Udowodnione w przykładach właściwości estru diizopropylowego kwasu [1-(*N*-*p*-bromofenyloamino)]-1-(*p*-nitrofenylo)metyloboranatofosfonowego, uzasadniają jego zastosowanie jako składnik leków o aktywności inhibitora neutralnej endopeptydazy.

Zastrzeżenie patentowe

1. Ester diizopropylowy kwasu [1-(*N*-*p*-bromofenyloamino)]-1-(*p*-nitrofenylo)metyloboranatofosfonowego o wzorze 1 do zastosowania w leczeniu schorzeń, w których efekt terapeutyczny osiągnąć jest poprzez zahamowanie aktywności neutralnej endopeptydazy.

Rysunki



Wzór 1

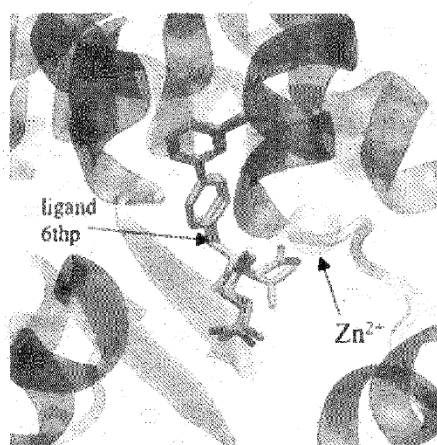


Fig. 1.

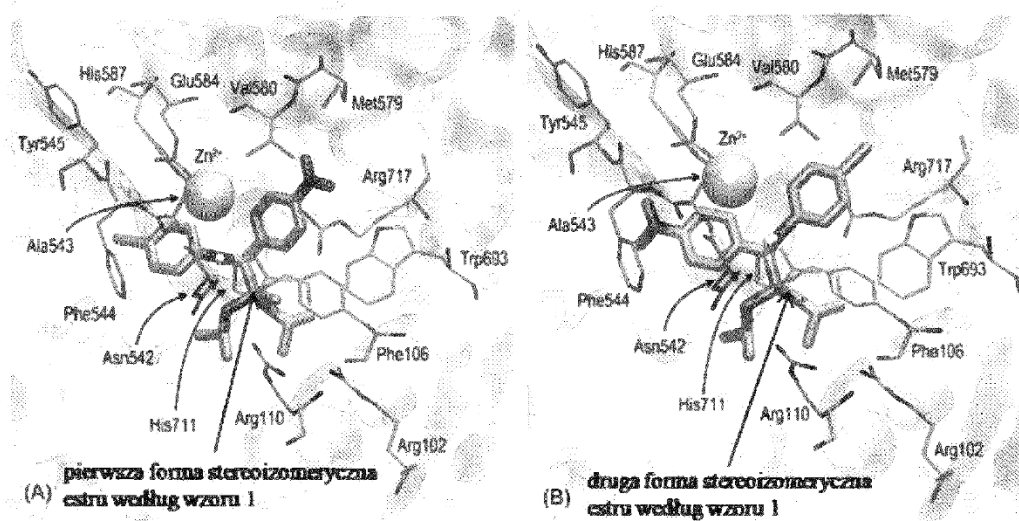


Fig. 2

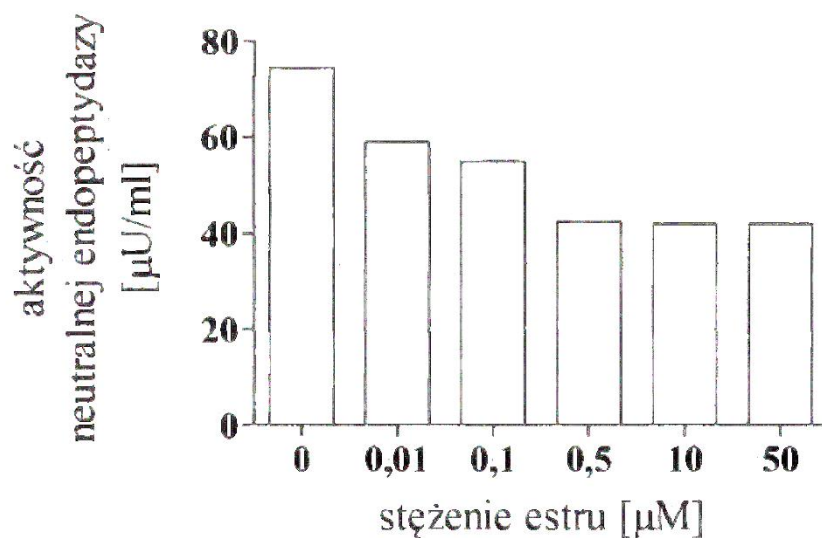


Fig.3

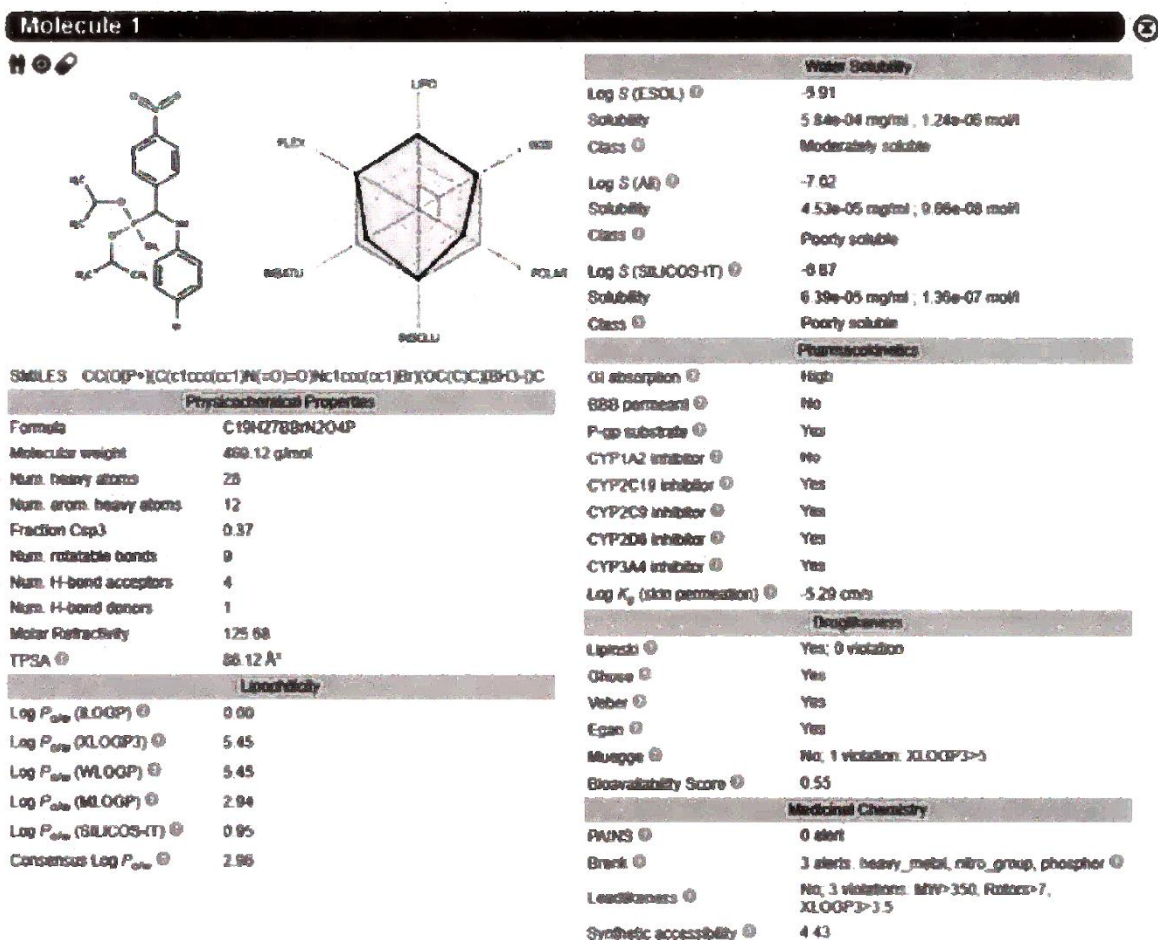


Fig.4