

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) 2 641 107 (13) C1ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

[C07D 487/04 \(2006.01\)](#)[A61K 31/53 \(2006.01\)](#)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: может прекратить свое действие (последнее изменение статуса: 27.02.2019)

(21)(22) Заявка: [2016141757](#), 24.10.2016(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.10.2016Дата регистрации:
16.01.2018Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 24.10.2016(45) Опубликовано: [16.01.2018](#) Бюл. № [2](#)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2294936 C1, 10.03.2007. RU 2330036 C1, 27.07.2008. RU 2404182 C2, 20.01.2010. М.А. Безматерных и др. Синтез 1,4-дигидроимидазо[5,1-с]-1,2,4-триазин-4-онов и имидазо[5,1-с]-1,2,4-триазолов. Химия гетероциклических соединений, 1999, N11, 1544-1553. EP 2957562 A1, 23.12.2015.

Адрес для переписки:
620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19,
УрФУ, ЦИС, Марке Т.В.

(72) Автор(ы):

Русинов Владимир Леонидович (RU),
Чупахин Олег Николаевич (RU),
Чарушин Валерий Николаевич (RU),
Сапожникова Ирина Михайловна (RU),
Близник Анастасия Михайловна (RU),
Спасов Александр Алексеевич (RU),
Петров Владимир Иванович (RU),
Кузнецова Валентина Андреевна (RU),
Ковалева Анастасия Игоревна (RU),
Васильев Павел Михайлович (RU),
Ворфоломеева Виктория Викторовна (RU)

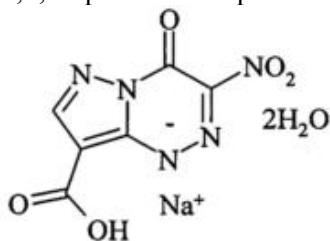
(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина" (RU),
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

(54) НАТРИЕВАЯ СОЛЬ 3-НИТРО-4-ОКСО-1,4-ДИГИДРОПИРАЗОЛО[5,1-с]-1,2,4-ТРИАЗИН-8-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ, ДИГИДРАТ

(57) Реферат:

Изобретение относится к натриевой соли 3-нитро-4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-8-карбоновой кислоты, дигидрату,



Технический результат: получено новое соединение, проявляющее антигликирующие свойства. 2 табл., 3 пр.

1. Область техники, к которой относится изобретение.

Изобретение относится к области биологически активных соединений - натриевой соли 3-нитро-4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-8-карбоновой кислоты, дигидрату, обладающей антигликирующей активностью, предназначенной для лечения и профилактики последствий сахарного диабета.

Изобретение может быть использовано в лечебных учреждениях и научно-исследовательских лабораториях.

2. Уровень техники

1. Накопление конечных продуктов гликирования белков, протекающее в рамках реакции Майяра (Aldini G., Vistoli G., Stefek M., Chondrogianni N., Grune T., Sereikaite J. *Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycoxidation and advanced lipoxidation end products. Free Radical Res.* - 2013. - N 47. - P. 93.), является одной из главных причин развития сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз, офтальмопатия, почечная недостаточность, поражение нервной системы, нарушение периферической циркуляции крови и т.д. (Емельянов В.В., Максимова Н.Е., Мочульская Н.Н. Неферментативное гликозилирование белков: химия, патофизиология, перспективы коррекции. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* - 2010. - N 1. - С. 50).

Реакция неферментативного гликирования белка особенно интенсивно протекает в организме больных сахарным диабетом ввиду сопутствующей данному заболеванию гипергликемии. Многочисленные осложнения при сахарном диабете напрямую связаны с данным процессом (Балаболкин М.И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете. *Сахарный диабет.* - 2002. - N 4. - С. 8).

Основными механизмами, через которые реализуются эффекты КПП, являются гликирование внутриклеточных белков, образование поперечных сшивок, взаимодействие с рецепторами КПП (G. Pugliese, Do advanced glycation end products contribute to the development of long-term diabetic complications? *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* - 2008. - №18(7). - P. 457-460). Формирование устойчивых меж- и внутримолекулярных поперечных сшивок патогенетически более значимо для структурных, долгоживущих белков, обновляющихся в течение нескольких месяцев, лет, например белков базальной мембраны (коллаген, эластин, миелин), белков хрусталика глаза (кристаллины). Нарушение конфигурации структурных белков вызывает последующие функциональные изменения сосудистой стенки (снижение эластичности, изменение ответа на сосудорасширяющее действие оксида азота) (M. Janic, M. Lunder, and M. Šabovič. Arterial stiffness and cardiovascular therapy. *Biomed. Res. Int.* - 2014. - P. 1-11).

Гликирование структурных белков базальной мембраны почечных клубочков (коллаген IV типа, ламинин, гепарансульфат и др.) является ключевым фактором развития нефропатии - одной из главных причин инвалидизации и смертности больных сахарным диабетом. В условиях хронической гипергликемии повышенная концентрация КПП приводит к накоплению белков межклеточного матрикса и изменению их состава, утолщению базальных мембран сосудов клубочка, предшествующих таким необратимым изменениям, как гломерулосклероз и тубулоинтерстициальный фиброз. Эти процессы характеризуют финальные стадии развития нефропатии (S.-Y. Goh, M.E. Cooper. The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2008. - №93(4). - P. 1143-1152).

Рецепторзависимые эффекты КПП опосредованы их взаимодействием со специфическими рецепторами, что приводит к активации вторичных передатчиков, таких как протеинкиназа C и ядерного фактора NF-κB, который перемещается в ядро и приводит к повышению транскрипции таких белков, как молекулы межклеточной адгезии-1, E-селектин, эндотелии-1, сосудистый эндотелиальный фактор роста, провоспалительные цитокины (R. Ramasamy, S.F. Yan, A.M. Schmidt. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Ann N Y Acad Sci.* - 2011 Dec; 1243: 88-102.). Все перечисленные механизмы лежат в основе патогенеза таких последствий сахарного диабета (N.A. Ansari, Z. Rasheed. Non-enzymatic glycation of proteins: from diabetes to cancer. *Biomed Khim.* - 2010. - №56(2). - P. 168-1781), как диабетические атеросклероз, нефро-, нейро-, ретино-, кардио-, ангиопатии, которые являются причиной высокого риска инвалидизации и смертности среди пациентов с сахарным диабетом.

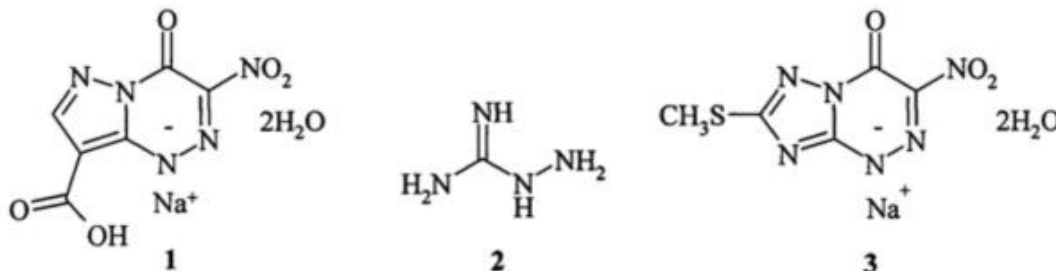
На сегодняшний день фармакологическая коррекция реакции образования конечных продуктов гликирования белков в организме больного является важной задачей в медицине. До сих пор не разработано препаратов, применяемых в клинической практике, способных нейтрализовать КППГ или ингибировать их формирование, однако научный интерес к реакциям неферментативного гликирования белков (НГБ) растет с каждым годом, и уже сейчас получены соединения, зарекомендовавшие себя как перспективные ингибиторы образования КППГ.

Первым и наиболее изученным веществом, ингибирующим гликирование белков, является амингуанидин 2 (АГ), выбранным в качестве прототипа. Он предотвращает формирование флуоресцирующих КППГ и глюкозопроизводных поперечносшитых молекул коллагена. Механизм антигликирующего действия амингуанидина основан на его взаимодействии с промежуточными продуктами гликирования белков, представляющими собой карбонильные соединения с высокой реакционной способностью. Однако ввиду токсичности и низкой эффективности соединения клинические испытания были остановлены (Freedman B.I., Wuerth J.-P., Cartwright K., Bain R.P., Dippe S., Hershon K., Mooradian A.D., Spinowitz B.S. Design and baseline characteristics for the aminoguanidine clinical trial in overt type 2 diabetic nephropathy (ACTION II). *Control. Clin. Trials* - 1999. - N 20(5). - P. 493; Bolton W.K., Cattran D.C., Williams M.E., Adler S.G., Appel G.B., Cartwright K., Foiles P.G., Freedman B.I., Raskin P., Ratner R.E., Spinowitz B.S., Whittier F.C., Wuerth J.-P. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am. J. Nephrol.* - 2004. - N 24. - P. 32).

В ряду азоло-1,2,4-триазинов известны соединения, обладающие противовирусным действием. Противовирусный препарат Триазавирин - 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-он, тригидрат 3 (Чупахин О.Н., Русинов В.Л., Чарушин В.Н., Уломский Е.Н., Петров А.Ю., Киселев О.И., Патент РФ 2294936 от 10.03.2007), зарегистрирован в реестре лекарственных средств РФ как препарат для лечения гриппозной инфекции (№ гос. регистрации ЛП-002604).

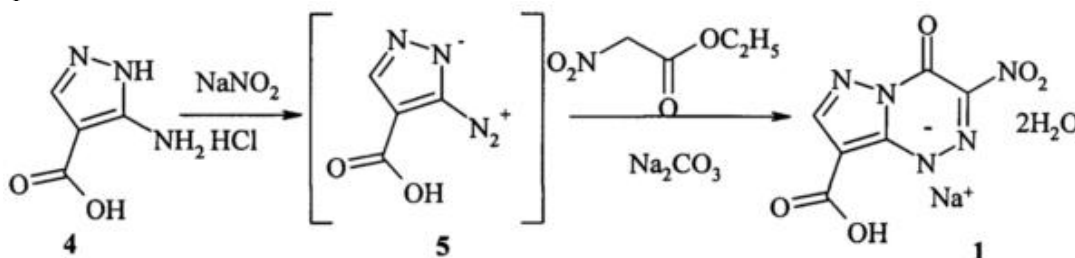
3. Сущность изобретения

Сущность изобретения составляет натриевая соль 3-нитро-4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-8-карбоновой кислоты, дигидрат, обладающая антигликирующей активностью, формулы (1).



4. Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

4.1. Заявляемое соединение - натриевая соль 3-нитро-4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-8-карбоновой кислоты, дигидрат 1, получено по следующей схеме: diazotирование 5-аминопиразол-4-карбоновой кислоты 4 с образованием диазопиразола 5, азосочетание с этилнитроацетатом с последующей циклизацией промежуточно образующегося гидразона в присутствии карбоната натрия.



Пример 1. Синтез натриевой соли 3-нитро-4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-8-карбоновой кислоты, дигидрата:

1.50 г (0.012 моль) 5-аминопиразол-4-карбоновой кислоты 4 растворяют в 2.4 мл соляной кислоты и 1.2 мл воды. Раствор охлаждают до -10°C и диазотируют раствором 0.84 г NaNO_2 в 1.2 мл воды. Полученный раствор соли диазония приливают к смеси 14 мл 2М раствора Na_2CO_3 и 1.3 мл (0.012 моль)

этилнитроацетата, pH должен быть 8-10. Реакционную массу выдерживают 1 час при

температуре от -10 до 0°C и 1 час при комнатной температуре. Осадок отфильтровывают, сушат и перекристаллизовывают сначала из 50% уксусной кислоты, затем из 50% этанола. Выход 1.02 г (31%).

Заявляемое соединение - натриевая соль 3-нитро-4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-8-карбоновой кислоты, дигидрат 1, имеет следующие физико-химические характеристики: $T_{пл}$ 248-250°C. 1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): 8.19 (1H, с, NH). ^{13}C ЯМР (100 МГц, DMSO- d_6): 103.97 (C=C), 144.20 (C-NO $_2$), 144.31 (C=O), 146.94 (C-H), 152.12 (C-N), 164.14 (COOH). Найдено, %: C - 25.62; H - 2.23; N - 24.70; C $_6$ H $_2$ N $_5$ NaO $_5$ *2H $_2$ O; Вычислено, %: C - 25.45; H - 2.12; N - 24.74.

Физико-химические характеристики соединения 1 полностью соответствуют приписываемой структуре.

4.2. Определение антигликирующей активности соединения 1 в системе in vitro

Пример 2. Реакцию гликирования воспроизводили по методу (Jedsadayanmata A. In Vitro Antiglycation Activity of Arbutin. Naresuan University Journal - 2005. - №13(2). - P. 35-41). Реакционная смесь содержала растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА) (1 мг/мл) и глюкозы (500 мМ) в фосфатном буфере (pH 7,4). В экспериментальные образцы добавляли растворы изучаемых веществ в различных концентрациях. В контрольные образцы вносили фосфатный буфер в аналогичном объеме. В буферный раствор во избежание бактериального роста добавляли азид натрия в конечной концентрации 0,02%. Все экспериментальные образцы инкубировали в течение 24 часов при 60°C. По истечении срока инкубации проводили определение специфической флуоресценции гликированного бычьего сывороточного альбумина (БСА) на спектрофлуориметре F-7000 (Hitachi, Япония) при длине волны возбуждения 370 нм и испускания 440 нм. В качестве вещества сравнения использовали аминокуанидин. Расчет ингибирующего влияния соединения на гликирование БСА проводили по формуле:

$$\Delta\% = 100 - (B/A) \times 100\%$$

где А - интенсивность флуоресценции контрольных образцов;

В - интенсивность флуоресценции образцов, содержащих изучаемое вещество.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, табличного редактора Microsoft Excel 2007 и программы GraphPad Prism 5.0.

В результате было установлено, что соединение (1) проявило высокую антигликирующую активность, превышающую активность вещества сравнения (Таблица 1). В связи с этим на следующем этапе была изучена зависимость антигликирующего эффекта соединения (1) от концентрации. Полученные результаты позволили рассчитать показатели концентрации веществ, вызывающие снижение флуоресценции гликированного БСА на 50% (IC $_{50}$). Показатели IC $_{50}$ для соединения (1) составил 104.11 мМ, а для аминокуанидина - 765.00 мМ.

Таблица 1

Антигликирующая активность соединения 1

Препарат	Антигликирующая активность (ингибирование флуоресценции гликированного БСА), Δ% (M±m)	
	Концентрация, 10 ⁻³ М	Концентрация, 10 ⁻⁴ М
Соединение 1	91.07±0.17*	58,90±1.48*
Аминокуанидин	57.83±0.58*	6.01±2.12*

* - данные достоверны по отношению к положительному контролю (критерий Манна-Уитни, p<0.05).

Пример 3. Определение LD $_{50}$ при изучении острой токсичности на лабораторных животных. Изучение острой токсичности соединения 1 и вещества сравнения аминокуанидина проводили согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая, Гриф и К, Москва, 2012, 944 с.). Острую суточную токсичность определяли на белых нелинейных мышах-самках массой 21-24 г при внутрибрюшинном введении. Величину токсикологического показателя - LD $_{50}$ рассчитывали по методу Миллера и Тейтнера (Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медгиз, 1963, 146 с.). Расчет показателей эффективной концентрации IC $_{50}$ и LD $_{50}$ проводили методом регрессионного анализа. В качестве показателя

широты терапевтического действия использовали условный терапевтический индекс (УТИ), который рассчитывали как отношение величины LD_{50} к IC_{50} .

При изучении острой токсичности соединения (1) было установлено, что показатель LD_{50} для данного вещества составил 1200.00 мг/кг (Таблица 2). На основании полученных результатов был рассчитан показатель УТИ, по величине которого соединение (1) превосходит аминогуанидин в 6.12 раза.

Таблица 2

Показатели острой токсичности (LD_{50}), ингибирующей концентрации (IC_{50}) и условного терапевтического индекса (УТИ) соединения 1 и аминогуанидина.

Шифр вещества	IC_{50} , μM	IC_{50} , mM	LD_{50} , мг/кг	Mr	LD_{50} , mM	УТИ
Соединение 1	104.11	0.104	1200.00	305.11	4.240	40.73
Аминогуанидин	765.00	0.765	562.5661	110.55	5.089	6.65

Примечание: УТИ – LD_{50}/IC_{50} .

Таким образом, заявляемое соединение - натриевая соль 3-нитро-4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-8-карбоновой кислоты, дигидрат, - превосходит по антигликирующей активности и условному терапевтическому индексу вещество сравнения (прототип).

Формула изобретения

Натриевая соль 3-нитро-4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-8-карбоновой кислоты, дигидрат,

