RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **236365**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **429178**

(22) Data zgłoszenia: **07.03.2019**

(51) Int.Cl.
C07D 249/12 (2006.01)
C07D 403/04 (2006.01)
C07D 215/14 (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)

(54) **4-(3-acetylofenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3-tion – sposób wytwarzania i zastosowanie medyczne**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
18.05.2020 BUP 11/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
11.01.2021 WUP 01/21

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE, Lublin, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
ANNA BOGUCKA-KOCKA, Świdnik, PL
MONIKA WUJEC, Lublin, PL
PRZEMYSŁAW KOŁODZIEJ, Lublin, PL
AGATA PANETH, Łęczna, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Bełz

PL 236365 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 4-(3-acetylofenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo--3-tion, sposób jego wytwarzania oraz zastosowanie medyczne.

Znane są pochodne 1,2,4-triazolu, będące przedmiotem 15 zgłoszeń patentowych z ostatnich 18 lat, wykazujące aktywność nicieniobójczą (inne niż wskazany w wynalazku). Ich zastosowanie opisywane jest jako potencjalne pestycydy i insektycydy. Brak jest natomiast doniesień literaturowych, które wskazywałyby na potencjalną aktywność pochodnych tego układu heterocyklicznego wobec nicieni pasożytujących u człowieka i zwierząt.

Wzrastająca częstość chorób pasożytniczych wywołanych przez nicienie oraz rosnąca lekooporność pasożytów na dostępne leki powodują konieczność poszukiwania nowych, skutecznych leków nicieniobójczych.

Zgłaszający prowadzili badania mające na celu uzyskanie nieopisanych w literaturze fachowej pochodnych triazolu, o znaczącej aktywności nicieniobójczej wobec modelu nicieni z rodzaju *Rhabditis sp*. Uzyskane wyniki wskazują na silną aktywność nicieniobójczą wobec badanych nicieni pochodnej będącej przedmiotem wynalazku, co istotne w zakresie stężeń nietoksycznych. Aktywność nicieniobójcza związku będącego przedmiotem wynalazku jest wielokrotnie wyższa od aktywności obecnie stosowanego leku mebendazolu. Otrzymane dane pozwalają oczekiwać, że badany związek może stać się obiecującym kandydatem na lek nicieniobójczy.

Przedmiotem wynalazku jest 4-(3-acetylofenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo--3-tion o wzorze przedstawionym na rysunku.

Przedmiotem wynalazku jest także 4-(3-acetylofenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4--triazolo-3-tion do zastosowania w leczeniu chorób pasożytniczych wywołanych przez nicienie.

Związek według wynalazku wykazuje silną aktywność nicieniobójczą (nicieni z rodzaju *Rhabditis sp*.) oraz brak znaczącej cytotoksyczności względem komórek prawidłowych człowieka (linia komórek prawidłowych WS1). Tak więc, otrzymany według wynalazku związek może znaleźć zastosowanie do wytwarzania nowych leków w terapii chorób pasożytniczych wywołanych przez nicienie.

Badanie wpływu 4-(3-acetylofenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3-tionu na żywotność nicieni z rodzaju *Rhabditis sp*.

Hodowlę i ocenę żywotności nicieni z rodzaju *Rhabditis sp*. przeprowadzono wg autorskiej procedury (nr zgłoszenia patentowego P.421846, Bogucka-Kocka A., Kołodziej P., 2017) w 6-dołkowych płytkach przeznaczonych do hodowli *in vitro* na agarowej pożywce stałej przez 5 dni w temperaturze pokojowej, w celu uzyskania wszystkich form rozwojowych. Następnie nicienie wymywano z agarowego podłoża stałego przy pomocy 0,6% NaCl i nanoszono na nowe sterylne płytki 24-dołkowe w celu prowadzenia hodowli na podłożu płynnym. Do hodowli na podłożu płynnym dodawano badany związek w postaci homogennej zawiesiny oraz mebendazol (kontrola dodatnia).

P r z y k ł a d :

Do przygotowanej hodowli na podłożu płynnym powadzonej w sterylnych 24-dołkowych płytkach dodawano badaną pochodną 1,2,4-triazolu w postaci homogennej zawiesiny w następujących stężeniach: 0,2 µg/µL; 1,1 µg/µL; 3,3 µg/µL; 5,5 µg/µL; 11,1 µg/µL i pozostawiano na 24-godzinną ekspozycję. Prowadzono także kontrolę ujemną z rozpuszczalnikiem oraz kontrolę dodatnią z mebendazolem. Nicienie poddane działaniu badanego związku obserwowano w mikroskopie optycznym i stereoskopowym pod kątem deformacji oraz zaburzeń ich rozwoju. W celu określenia ilości osobników żywych i martwych hodowlę płynną barwiono błękitem metylenowym i liczono w specjalnych komorach Bürkera (Zdjęcie – Fig. 1).

Fig. 1 przedstawia przykładowy obraz hodowli *in vitro* nicieni z rodzaju *Rhabditis sp*. prowadzonej przez 24 godzin na podłożu płynnym po ekspozycji na badaną pochodną 4-(3-acetylofenylo)-5-(chinolin--6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3-tionu.

Tabela
Porównanie aktywności nicieniobójczej badanego związku i obecnie stosowanego leku

L.p.	Nazwa związku	Aktywność nicieniobójcza (µg/µL±SD) po 24 godzinnej ekspozycji
		LC_{50}
1.	Mebendazol (kotrola dodatnia)	20±2,546
2.	4-(3-acetylofenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3-tion	2,3±0,254

Ocena wpływu 4-(3-acetylofenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3-tionu na żywotność komórek WSI.

Do doświadczeń wykorzystano linię komórek prawidłowych WS1 – fibroblasty skóry ludzkiej. Komórki hodowano w standardowych warunkach: temperatura – 37°C, stężenie CO_2 – 5%, wilgotność – 90%. Cytotoksyczność badano przy pomocy testu WST-1 zgodnie z zaleceniem producenta.

Przykład:

Do przygotowanej hodowli komórek prawidłowych WS1 (fibroblasty skóry ludzkiej) powadzonej w sterylnych 96-dołkowych płytkach dodawano badaną pochodną 1,2,4-triazolu w postaci homogennej zawiesiny w następujących stężeniach: 0,2 µg/µL; 1,1 µg/µL; 3,3 µg/µL; 5,5 µg/µL; 11,1 µg/µL i pozostawiano na 24-godzinną ekspozycję. Prowadzono także hodowlę komórek bez dodawania badanego związku (kontrola ujemna). Po 24 godzinnej inkubacji z badanym związkiem do każdego dołka na płytce dodawano po 10 µL odczynnika WST-1 i następnie płytkę worteksowano. Po godzinnej inkubacji z odczynnikiem WST-1 mierzono absorbancję przy długości fali 450 nm (długość fali referencyjnej 660 nm).

Badany związek charakteryzował się niskim działaniem toksycznym na komórki linii WS1 w stężeniach wykazujących aktywność nicieniobójczą.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób otrzymywania 4-(3-acetylofenylo)-5-(chinolin-6--ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3-tionu o wzorze ogólnym 1, polegający na tym, że hydrazyd kwasu chinolino-6-karboksylowego (wzór 2) poddaje się reakcji z izotiocyjanianem 3-acetylofenylu (wzór 3) w stosunku molowym 1 : 1. Reakcję prowadzi się w środowisku bezwodnego etanolu w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, korzystnie gdy czas reakcji wynosi od 30 min. Postęp reakcji monitoruje się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Po utworzeniu produktu zawartość kolbki chłodzi się, wytrącony osad odsącza, a po wysuszeniu krystalizuje z 96% etanolu. Następnie, otrzymany związek liniowy 1-(chinolin-6-oilo)-4-(3-acetylofenylo)tiosemikarbazyd (wzór 4) poddaje się reakcji cyklizacji w wodnym roztworze wodorotlenku, korzystnie w wodorotlenku sodu, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Po oziębieniu do temperatury pokojowej, roztwór zadaje się wodnym roztworem kwasu, korzystnie kwasem solnym do odczynu kwasowego. Wytrącony związek odsącza się, a po wysuszeniu krystalizuje z 96% etanolu.

Przykład:

Mieszaninę hydrazydu (0,01 mola; 1,87 g) i 3-acetylofenylo izotiocyjanianu (0,01 mola; 1,77 g) ogrzewano w 10 cm^3 bezwodnego etanolu w kolbce okrągłodennej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Czas reakcji wynosił 30 min. Otrzymano 3,37 g 4-(3-acetylofenylo)-1-(chinolin-6-oilo)tiosemikarbazydu (wzór 4) o temperaturze topnienia 146–148°C. Wydajność reakcji wynosiła 92,8%. Następnie ogrzewano 0,01 mola otrzymanej pochodnej tiosemikarbazydu (wzór 4) oraz 20 cm^3 2% wodnego roztworu wodorotlenku sodu przez 2 godziny w temperaturze wrzenia w kolbce okrągłodennej pod chłodnicą zwrotną. Po oziębieniu roztwór zadano 3N kwasem solnym do otrzymania odczynu kwasowego. Wydzielony produkt odsączono, wysuszono na powietrzu i krystalizowano z etanolu. Otrzymano 1,97 g (57% wydajności teoretycznej) 4-(3-acetylofenylo)-5-(chinolin-6-ylo)--2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3-tionu (wzór 1) o temperaturze topnienia 273–274°C. Właściwą budowę związku oraz jego czystość potwierdzono na podstawie analizy widma ^1H NMR.

Parametry fizykochemiczne i dane spektralne 4-(3-acetylofenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro--3*H*-1,2,4-triazolo-3-tionu

Wydajność reakcji: 57%
Temperatura topienia: 273–274°C
^{1}H NMR (DMSO-d_6): 2,55 (s, 3H, CH_3); 7,56–7,68 (m, 4H, 4CH); 7,97–8,08 (m, 4H, 4CH); 8,34 (d, 1H, CH); 8,96 (s, 1H, CH); 14,36 (s, 1H, NH).

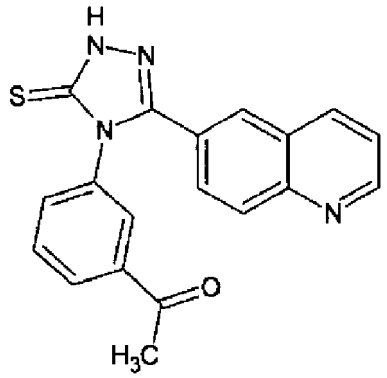
Zastrzeżenia patentowe

1. Związek 4-(3-acetylofenyto)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3-tion o wzorze ogólnym 1 przedstawionym na rysunku.
2. Sposób otrzymywania 4-(3-acetylofenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3--tionu, **znamienny tym**, że hydrazyd kwasu chinolino-6-karboksylowego poddaje się reakcji z izotiocyjanianem, przy czym reakcję prowadzi się w stosunku molowym 1 : 1, reakcję prowadzi się w środowisku bezwodnego etanolu w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, otrzymany produkt chłodzi się, wytrącony osad odsącza się, a po wysuszeniu krystalizuje, otrzymany w ten sposób produkt pośredni 4-(3-acetylofenylo)-1-(chinolin-6-oilo)tiosemikarbazyd poddaje się reakcji cyklizacji w wodnym roztworze wodorotlenku sodu, po czym po oziębieniu roztwór zadaje się wodnym roztworem kwasu korzystnie solnego, do otrzymania odczynu kwasowego, zaś strącony związek krystalizuje się z odpowiedniego rozpuszczalnika, korzystnie z etanolu.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że czas reakcji wynosi 30 min.
4. 4-(3-acetylofenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3-tion do zastosowania w leczeniu chorób pasożytniczych wywołanych przez nicienie.

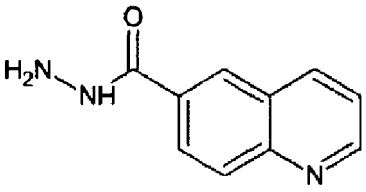
Rysunki



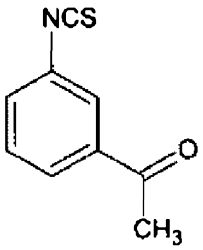
Fig. 1



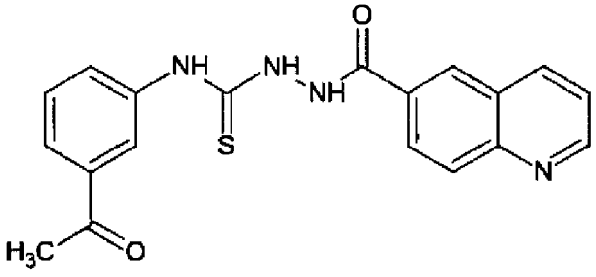
Wzór 1



Wzór 2



Wzór 3



Wzór 4