

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246350 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **442084**

(22) Data zgłoszenia: **2022.08.24**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.02.26 BUP 09/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.01.13 WUP 02/2025**

(51) MKP:

C07D 417/12 (2006.01)

C07D 277/34 (2006.01)

C07D 213/02 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Lublin, PL
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**NAZAR TROTSKO, Lublin, PL
AGNIESZKA GŁOGOWSKA, Warszawa, PL
BARBARA KAPROŃ, Świdnik, PL
EWA AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Bełz, Lublin, PL

(54) Tytuł:

**Pochodne kwasu (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-3-yl)octowego, sposób ich wytwarzania
oraz ich zastosowanie medyczne**

PL 246350 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe pochodne kwasu (2,4-dioksa-1,3-tiazolidyn-3-yl)octowego z pirydino-4-karbohydrydowym fragmentem o wzorze 1, gdzie R oznacza H, Br, Cl, i OC₂H₅, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowanie medyczne w leczeniu gruźlicy.

Gruźlica to choroba zakaźna wywołwana przez prątki *Mycobacterium tuberculosis*, która wciąż stanowi jedną z 10 najważniejszych przyczyn zgonów na całym świecie oraz jest główną przyczyną zgonów u osób z ko-infekcją HIV/AIDS. Szacuje się, że w 2020 r. na całym świecie wśród osób niezakażonych wirusem HIV doszło do 1,3 mln zgonów, w porównaniu z 1,2 mln w 2019 r., oraz dodatkowe 214 000 zgonów wśród osób zakażonych wirusem HIV, niewielki wzrost z 209 000 w 2019 r. [WHO *Global Tuberculosis Report 2021*]. W 2019 roku odnotowano 7,1 mln nowych przypadków gruźlicy, natomiast w 2020 roku liczba zarejestrowanych nowych zachorowań wyniosła 5,8 mln. Po dużych wzrostach w latach 2017–2019 nastąpił spadek o 18% w latach 2019–2020. Przyczyny spadku wykrywalności i raportowania nowych przypadków choroby upatruje się w zamieszaniu związanym z pandemią COVID-19 [WHO *Global Tuberculosis Report 2021*].

Współistnienie zakażenia HIV i gruźlicy zwykle nasila proces chorobowy, zarówno w odniesieniu do gruźlicy, jak i zakażenia wirusowego [Jagielski T. Drug resistance in tuberculosis – microbiological and clinical aspects. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych* 2017, 66, 41–58].

Inną przyczyną, która znacząco negatywnie wpływa na sytuację epidemiologiczną gruźlicy jest lekooporność *M. tuberculosis* [Kruczak K., Niżankowska-Mogilnicka E. Multidrug resistance tuberculosis – current problems. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2009, 77, 276–283; Jagielski T. Drug resistance in tuberculosis – microbiological and clinical aspects. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych* 2017, 66, 41–58; Augustynowicz-Kopeć E. The new face of tuberculosis. *Acta Medicorum Polonorum* 2018, Nr 8, zeszyt 1, 23–36]. Jak wynika z raportu WHO (*WHO Global Tuberculosis Report 2021*) w 2020 r. na świecie wykryto 71% lekoopornych przypadków zakażeń gruźlicą płuc. Lekooporność dotyczyła prątków opornych przynajmniej na rifampicynę (RR-TB, Rifampicin-resistant tuberculosis).

Rozwój gruźlicy wielolekoopornej (MDR-TB, multidrug resistant tuberculosis) oraz gruźlicy wielolekoopornej o rozszerzonej oporności prątków (XDR-TB, extensively drug resistant tuberculosis) powoduje potrzebę opracowania nowych leków, zdolnych do skutecznego leczenia gruźlicy. Układy heterocykliczne w tym tiazolidyna mają wielkie znaczenie w chemii medycznej do poszukiwania nowych substancji leczniczych. W ostatnich latach zainteresowanie naukowców pochodnymi tiazolidyno-2,4-dionu wzrasta ze względu na szerokie spektrum ich aktywności biologicznych (przeciwcukrzycowe, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i in.). Potwierdzają to liczne prace przeglądowe na temat aktywności i mechanizmów działania tiazolidyno-2,4-dionów [Chadha N., Bahia M.S., Kaur M., Silakari O. Thiazolidine-2,4-dione derivatives: Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 2953–2974; Asati V., Mahapatra D.K., Bharti S.K. Thiazolidine-2,4-diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 87, 814–833; Jain V.S., Vora D.K., Ramaa C.S. Thiazolidine-2,4-diones: progress towards multifarious applications. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, 21, 1599–1620; Imran M., Ilyas B., Deepanjali, Khan S.A. Recent thiazolidinediones as antidiabetics. *J. Sci. Industr. Res.* 2007, 66, 99–109]. Informacja z ostatnich dwóch dekad dotycząca aktywności przeciwprątkowej pochodnych tiazolidyno-2,4-dionu opisana została w publikacji przeglądowej w 2021 r. [Trotsko N. Antitubercular properties of thiazolidin-4-ones – A review. *Eur. J. Med. Chem.* 2021, 215, 113266].

3,5-Dipodstawione pochodne tiazolidyno-2,4-dionu zawierające różne układy heterocykliczne wykazują także zróżnicowaną aktywność przeciwprątkową. Pochodne tiazolidyno-2,4-dionu z układem benzotiazolu oraz pirydino-1,3,4-oksadiazolu w pozycji 3 wykazują aktywność przeciwprątkową z minimalnym stężeniem hamującym w przedziale 25–62,5 µg/mL [Patel N.B., Khan I.H. Synthesis of newer 5-benzylidene-2,4-thiazolidinediones as potential antimicrobials. *Indian J. Res. Pharm. Biotechnol.* 2014, 2, 993–1001; Patel N.B., Purohit A.C., Rajami D. Design and synthesis of newer thiazolidinediones incorporated with pyridine and 1,3,4-oxadiazole moieties as antimicrobial agents. *Int. J. Drug Des. Discov.* 2014, 5, 1342–1351].

Nieco lepsze wyniki aktywności przeciwprątkowej uzyskano dla pochodnych tiazolidyno-2,4-dionu z benzimidazolowym fragmentem w pozycji 3 (MIC=6,25–12,5 µg/mL) [Araujo D.M.L., Maste M.M., Alegaon S., Saxena A. Synthesis, antitubercular evaluation and docking studies of novel benzimidazole analogues. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2018, 9, 3696–3704].

Spośród pochodnych 5-arylidentiazolidyno-2,4-dionu z 2-cyklopropylo-1-(2-fluorofenylo)-2-oksoetylowym podstawnikiem w pozycji 3 najlepszy związek wykazywał aktywność przeciwprątkową już w mikromolowym stężeniu (MIC=25 μ M) [Ponnuchamy S., Kanchithalaivan S., Kumar R.R., Ali M.A., Choon T.S. Antimycobacterial evaluation of novel hybrids arylidene thiazolidine-2,4-diones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, 24,1089–1093]. Bardzo dobrą aktywność przeciwprątkową wykazywały pochodne zawierające w pozycji 5 układu tiazolidyno-2,4-dionu 2-metylochromen (MIC=0,36 μ M) [Angelova V.T., Valcheva V., Vassilev N., Buyukliev R., Mihaylova R., Momekov G. Synthesis, *in vitro* antiproliferative and antimycobacterial activity of thiazolidine-2,4-dione and hydantoin derivatives. *Bulgarian Chem. Comm.* 2017, 49, 643–651].

Warto też zwrócić uwagę na aktywność przeciwprątkową hybryd tiazolidyno-2,4-dionu z izoniazidem ze względu na to, że izoniazyd jest lekiem pierwszego rzutu stosowanym w leczeniu gruźlicy. Pochodne tiazolidyno-2,4-dionu zawierające izoniazyd zarówno w pozycji 5 jak i 3 układy tiazolidyny nie wykazywały zbyt dobrej aktywności wobec *M. tuberculosis* H37Rv (MIC = 50 μ g/mL) [Pattan S., Kedar M., Pattan J., Dengale S., Sanap M., Gharate U., Shinde P., Kadam S. Synthesis and evaluation of some novel 2,4-thiazolidinedione derivatives for antibacterial, antitubercular and antidiabetic activities. *Indian J. Chem.* 2012, 51B, 1421–1425.]. Natomiast szereg pochodnych kwasu (2,4-dioksotiazolidyn-5-yl)octowego z fragmentem izoniazidu wykazywał bardzo dobrą aktywność wobec *M. tuberculosis* H37Ra (MIC = 1 μ g/mL) [Trotsko N., Golus J., Kazimierczak P., Paneth A., Przekora A., Ginalska G., Wujec M. Synthesis and antimycobacterial activity of thiazolidine-2,4-dione based derivatives with halogenbenzohydrazones and pyridinecarbohydrazones substituents. *Eur. J. Med. Chem.* 2020,189, 112045].

Wyżej przedstawione doniesienia literaturowe o przeciwprątkowej aktywności pochodnych tiazolidyno-2,4-dionu nie rozwiązują całkowicie problemu otrzymywania wysoce skutecznych pochodnych o aktywności przeciwprątkowej wobec referencyjnych jak i lekoopornych szczepów *M. tuberculosis*.

Wynalazek rozwiązuje problem otrzymywania skutecznych małodoksydnych związków pochodnych kwasu (2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-3-yl)octowego z pirydino-4-karbohydrazydowym fragmentem o aktywności przeciwprątkowej.

Przedmiotem wynalazku są nowe pochodne kwasu (2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-3-yl)octowego z pirydino-4-karbohydrazydowym fragmentem o wzorze 1, gdzie R oznacza H, Br, Cl, oraz OC₂H₅. Związki te nie były dotąd w literaturze ani pod względem ich budowy, ani aktywności farmakologicznej.

Sposób otrzymywania związków o wzorze 1, gdzie R oznacza H, Br, Cl, oraz OC₂H₅ według wynalazku polega na tym, że najpierw otrzymuje się związek o wzorze 2, gdzie R oznacza H, Br, Cl, oraz OC₂H₅ poprzez reakcję chlorku 2-(2,4-dioksotiazolidyn-3-yl)acetylu z odpowiednimi 4-hydroksybenzaldehydami w środowisku bezwodnego 1,4-dioksanu i obecności bezwodnej pirydyny, w stosunku molowym 1:1. Następnie związek o wzorze 2, gdzie R oznacza H, Br, Cl, oraz OC₂H₅ poddaje się reakcji z hydrazidem kwasu izonikotynowego, w stosunku molowym 1:1. Reakcja przebiega w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika organicznego korzystnie bezwodnego etanolu.

Korzystnie, gdy otrzymane związki krystalizuje się z butanolu.

Pochodne kwasu (2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-3-yl)octowego z pirydino-4-karbohydrazydowym fragmentem o wzorze 1 według wynalazku do zastosowania w leczeniu gruźlicy.

Nowe związki będące przedmiotem wynalazku wykazują aktywność przeciwprątkową w stosunku do szczepu *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Minimalne stężenie hamujące (MIC, ang. *Minimal Inhibitory Concentration*) wzrost *M. tuberculosis* H37Rv dla nowych pochodnych znajduje się w przedziale 0.0312–0.125 μ g/mL.

Przykład I. Otrzymywanie (2,4-dioksotiazolidyn-3-yl)octanu 4-[[2-(pirydino-4-karbonylo)hydrazynylideno]metylo]fenylu.

Do 0,001 mola (2,4-dioksotiazolidyn-3-yl)octanu 4-formylofenylu i 0,001 mola hydrazidu kwasu izonikotynowego dodano 10 mL bezwodnego etanolu i ogrzewano we wrzeniu przez 2 godziny. Po ochłodzeniu powstały osad odsączono i wysuszono. Krystalizowano z butanolu.

Wydajność 86%, t.t. 217–219°C.

¹H NMR δ (DMSO-d₆): 4,41 s (2H, SCH₂); 4,68 s (2H, NCH₂); 7,28 d (2H, C₆H₄, J = 8,7 Hz); 7,83–7,85 m (4H, C₆H₄, 4-C₅H₄N); 8,48 s (1H, CH=N); 8,80 d (2H, 4-C₅H₄N, J = 6,1 Hz); 12,13 s (1H, NH).

¹³C NMR δ (DMSO-d₆): 34,6; 42,6; 122,0; 122,6; 129,1; 132,7; 140,9; 148,4; 150,8; 151,7; 162,1; 166,3; 171,8; 172,3.

Przykład II. W sposób analogiczny do opisanego w przykładzie I otrzymano pozostałe pochodne kwasu (2,4-dioksotiazolidyn-3-yl)octowego o wzorze 1, gdzie R oznacza Br, Cl oraz OC₂H₅.

(2,4-Dioksotiazolidyn-3-ylo)octan 2-bromo-4-[[2-(pirydyno-4-karbonylo)hydrazynyliдено]metylo]fenylo

Wydajność 65%, t.t. 144–146°C.

$^1\text{H NMR } \delta$ (DMSO- d_6): 4,42 s (2H, SCH₂); 4,73 s (2H, NCH₂); 7,46 d, 7,83-7,90 m, 8,11 d (5H, C₆H₃, i 4-C₅H₄N, $J = 8,4, 1,9$ Hz); 8,45 s (1H, CH=N); 8,80 d (2H, 4-C₅H₄N, $J = 5,8$ Hz); 12,27 s (1H, NH).

$^{13}\text{C NMR } \delta$ (DMSO- d_6): 34,6; 42,4; 116,2; 122,0; 124,9; 128,3; 132,0; 134,8; 140,8; 146,8; 148,7; 150,8; 162,3; 165,4; 171,7; 172,2.

(2,4-Dioksotiazolidyn-3-ylo)octan 2-chloro-4-[[2-(pirydyno-4-karbonylo)hydrazynyliдено]metylo]fenylo
Wydajność 68%, t.t. 143–145°C.

$^1\text{H NMR } \delta$ (DMSO- d_6): 4,42 s (2H, SCH₂); 4,74 s (2H, NCH₂); 7,48 d, 7,83-7,84 m, 7,98 d (5H, C₆H₃, i 4-C₅H₄N, $J = 8,4, 1,4$ Hz); 8,46 s (1H, CH=N); 8,81 d (2H, 4-C₅H₄N, $J = 3,0$ Hz); 12,27 s (1H, NH).

$^{13}\text{C NMR } \delta$ (DMSO- d_6): 34,6; 42,3; 122,0; 125,0; 126,7; 127,6; 129,0; 134,6; 140,7; 146,9; 147,4; 150,9; 162,3; 165,4; 171,7; 172,2.

(2,4-Dioksotiazolidyn-3-ylo)octan 2-etoksy-4-[[2-(pirydyno-4-karbonylo)hydrazynyliдено]metylo]fenylo
Wydajność 70%, t.t. 138–140°C.

$^1\text{H NMR } \delta$ (DMSO- d_6): 1,33 t (3H, OCH₂CH₃, $J = 6,9$ Hz); 4,09 q (2H, OCH₂CH₃, $J = 6,9$ Hz); 4,39 s (2H, SCH₂); 4,63 s (2H, NCH₂); 7,26 d, 7,34 dd, 7,48 d (3H, C₆H₃, $J = 8,2, 1,3$ Hz); 7,82 d, 8,79 d (4H, 4-C₅H₄N, $J = 5,9$ Hz); 8,44 s (1H, CH=N); 12,13 s (1H, NH).

$^{13}\text{C NMR } \delta$ (DMSO- d_6): 14,9; 34,5; 42,1; 64,8; 111,6; 121,1; 122,0; 123,4; 123,7; 133,9; 140,9; 141,1; 148,7; 150,8; 162,2; 165,6; 171,7; 172,1.

Przykład III. Otrzymywanie (2,4-dioksotiazolidyn-3-ylo)octanu 4-formylofenylo

Do 0,03 mola chlorku (2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-3-ylo)acetylu rozpuszczonego w bezwodnym 1,4-dioksanie dodano roztwór 0,03 mola 4-hydroksybenzaldehydu w bezwodnej pirydynie. Mieszaninę reakcyjną utrzymywano w temperaturze 60°C w ciągu 15 min potem pozostawiano na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Dalej mieszaninę reakcyjną rozcieńczono wodą i zakwaszono rozcieńczonym roztworem HCl do pH 3–4. Powstały osad odsączono, wysuszono na powietrzu. Krystalizowano z etanolu.

Wydajność 61%, t.t. 84–86°C.

$^1\text{H NMR } \delta$ (DMSO- d_6): 4,40 s (2H, SCH₂); 4,69 s (2H, NCH₂); 7,40 d, 8,01 d (4H, C₆H₄, $J = 8,5$ Hz); 10,00 s (1H, CHO).

Przykład IV. W sposób analogiczny do opisanego w przykładzie III otrzymano pozostałe pochodne (2,4-dioksotiazolidyn-3-ylo)octanu 4-formylofenylo o wzorze 2, gdzie R oznacza Br, Cl oraz OC₂H₅.

(2,4-Dioksotiazolidyn-3-ylo)octan 2-bromo-4-formylofenylo

Wydajność 66%, t.t. 110–112°C. Krystalizowano z butanolu.

$^1\text{H NMR } \delta$ (DMSO- d_6): 4,42 s (2H, SCH₂); 4,74 s (2H, NCH₂); 7,60 d, 8,01 dd, 8,28 d (3H, C₆H₃, $J = 8,3, 1,9$ Hz); 9,98 s (1H, CHO).

(2,4-Dioksotiazolidyn-3-ylo)octan 2-chloro-4-formylofenylo

Wydajność 63%, t.t. 120–122°C.

$^1\text{H NMR } \delta$ (DMSO- d_6): 4,41 s (2H, SCH₂); 4,76 s (2H, NCH₂); 7,63 d, 7,98 dd, 8,15 d (3H, C₆H₃, $J = 8,3, 1,9$ Hz); 9,99 s (1H, CHO).

(2,4-Dioksotiazolidyn-3-ylo)octan 2-etoksy-4-formylofenylo

Wydajność 61%, t.t. 104–106°C.

$^1\text{H NMR } \delta$ (DMSO- d_6): 1,32 t (3H, OCH₂CH₃, $J = 6,9$ Hz); 4,12 q (2H, OCH₂CH₃, $J = 6,9$ Hz); 4,39 s (2H, SCH₂); 4,65 s (2H, NCH₂); 7,41 d, 7,56-7,60 m (3H, C₆H₃, $J = 7,9$ Hz); 9,96 s (1H, CHO).

Przykład V. Określenie aktywności przeciwpłatkowej.

Aktywność przeciwpłatkową zsyntetyzowanych związków poprzez określenie ich minimalnego stężenia hamującego wzrost prątków (MIC – *ang. minimal inhibitory concentration*) wykonano w Zakładzie Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

Związki oceniano w stosunku do szczepu wzorcowego *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 25618) oraz dwóch szczepów klinicznych: szczepu *M. tuberculosis* nr 210 opornego na izoniazyd, rifampicynę i etambutol oraz szczepu *M. tuberculosis* nr 192 w pełni wrażliwego na stosowane leki.

Badanie wykonano metodą mikrozcieńczeń w płynnym podłożu Middlebrooka 7H9 (Beckton Dickinson) z dodatkiem 10% OADC (Beckton Dickinson) na 96-dołkowych płytkach, polistyrenowych. Określenie wartości MIC badanych związków zostało przeprowadzone zgodnie z zaleceniami CLSI

(CLSI M24, 3rd ed. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes, 3rd Edition. Vol. 38 No. 21).

Analizowane związki rozpuszczano w DMSO (Sigma-Aldrich), a następnie sporządzano ich rozcieńczenia w postępie geometrycznym uzyskując zakres stężeń roboczych od 0,125 do 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Serie rozcieńczeń związków wykonywano w podłożu płynnym Middlebrooka 7H9 z 10% OADC w objętości 100 μL na płytkach polisterynowych.

Inoculum prątków wykonano ze świeżej hodowli uzyskanej na pożywce L-J w roztworze jałowej soli fizjologicznej. Po ustaleniu gęstości optycznej na poziomie 0,5 w skali McFarland (około $1,5 \times 10^8$ CFU/ml) zawiesinę rozcieńczano 100-krotnie za pomocą płynnego bulionu Middlebrooka 7H9 z dodatkiem OADC. W kolejnym kroku do szeregu rozcieńczeń związków dodawano po 100 μL zawiesiny prątków. Końcowa wartość zagęszczenia prątków wynosiła 5×10^5 CFU/mL, a końcowe badane stężenia związków były w zakresie od 0,0625 do 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Każda płytka zawierała kontrolę wzrostu prątków (bez dodatku związków) oraz kontrolę jałowości (bez inokulacji zawiesiną prątków).

Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 21 dni. Po tym czasie do każdej studzienki dodawano po 30 μL roztworu alamarBlue (bioRad) a następnie całość poddawano reinkubacji przez 24 godziny. Po tym czasie obserwowano zmianę zabarwienia w poszczególnych studzienkach.

Zmiana barwy z niebieskiej na różową wskazywała na wzrost prątków w danej studzienki. Najniższe stężenie badanych związków, przy którym nie obserwowano zmiany zabarwienia uznawano za wartość MIC (Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol.* 1998;36(2):362-6; Reck F, Alm R, Brassil P, Newman J, Dejonge B, Eyermann CJ, Breault G, Breen J, Comita-Prevoir J, Cronin M, Davis H, Ehmann D, Galullo V, Geng B, Grebe T, Morningstar M, Walker P, Hayter B, Fisher S. Novel N-linked aminopiperidine inhibitors of bacterial topoisomerase type II: broad-spectrum antibacterial agents with reduced hERG activity. *J Med Chem.* 2011;54(22):783-47.).

Badanie przeprowadzone w dwóch powtórzeniach. Dla porównania do badań dołączono izoniazyd (INH), rifampicynę (RMP), streptomycynę (SM) oraz etambutol (EMB) jako leki referencyjne.

Przykład VI. Ocena cytotoksyczności

Linie komórek nowotworowych HEK-293, zakupione od certyfikowanego dostawcy (ATCC), hodowano w pożywce EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) wzbogaconym w 10% FBS, penicylinę (100 U/mL) and streptomycynę (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Hodowlę prowadzono w atmosferze zawierającej 5% CO_2 , w temperaturze 37°C. Zawiesinę komórek nowotworowych przenoszono do dołków na płytkach 96-dołkowych (100 $\mu\text{L}/\text{dołek}$), stosując gęstość zawiesiny 1×10^5 komórek/mL. Po 24 godzinach wymaganych do całkowitego przyklejenia się komórek do podłoża, na płytce dodawano roztwory zawierające wzrastające od 20 do 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ stężenia badanej substancji, całość inkubowano przez kolejne 24 godziny, po czym dodawano roztwór odczynnika MTT. Po trwającej kolejne 3 godziny inkubacji, do dołków dodawano roztwór 10% SDS. Po całonocnej inkubacji odczytywano absorbancję roztworów w dołkach przy długości fali 570 nm, stosując czytnik mikropłytek (Epoch, BioTek). Wyniki przedstawiono w postaci wartości % żywotności względem kontroli.

Wyniki

Oceniono aktywność pochodnych kwasu (2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-3-ylo)octowego według wynalazku wobec *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618 oraz dwóch szczepów klinicznych: szczepu *M. tuberculosis* nr 210 opornego na izoniazyd, rifampicynę i etambutol oraz szczepu *M. tuberculosis* nr 192 w pełni wrażliwego na stosowane leki. Otrzymane wartości MIC znajdują się w zakresie 0,0312–0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dla *M. tuberculosis* H37Rv i szczepu *M. tuberculosis* nr 192 oraz w zakresie 4–8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dla szczepu *M. tuberculosis* nr 210 opornego na leki. Dane przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Aktywność przeciwpłatkowa nowych pochodnych kwasu (2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-3-ylo)octowego

Związek	Minimalne stężenia hamujące wzrost szczepów ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>M. tuberculosis</i> <i>H₃₇R_v</i>	<i>M. tuberculosis</i> oporny na INH (nr szczepu 210)	<i>M. tuberculosis</i> wrażliwy na INH (nr szczepu 192)
1	0,0312	4	0,0625
2	0,125	4	0,25
3	0,0625	4	0,0625
4	0,125	8	0,125
INH	0,0312	1	0,0312
RMP	0,125	2	0,125
SM	0,25	1	0,25
EMB	0,5	4	0,5

Objaśnienia skrótów: **1** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza H), **2** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza Br), **3** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza Cl), **4** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza OC₂H₅).
INH – izoniazyd, RMP – rifampicyna, SM – streptomycyna, EMB – etambutol.

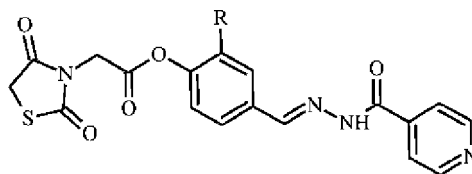
Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że nowe pochodne kwasu (2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-3-ylo)octowego z fragmentem pirydyno-4-karbohydrydowym (związki **1–4**) wykazują aktywność przeciwpłatkową lepszą niżeli leki referencyjne streptomycyna i etambutol oraz lepszą lub porównywalną aktywność do izoniazylu i rifampicyny.

Oceniono także cytotoksyczność nowych pochodnych wobec linii komórek HEK-293. Badane związki stosowane w stężeniach od 20 do 50 $\mu\text{g/mL}$ wykazują głównie słaby efekt cytotoksyczny (Rysunek 1). Żywotność komórek wynosi powyżej 70% (próg toksyczności) dla związków **2** i **3** w stężeniu 50 $\mu\text{g/mL}$ oraz dla związków **1** i **4** w stężeniu 30 $\mu\text{g/mL}$. Te stężenia znacząco przeważają stężenia aktywne dla tych pochodnych wobec szczepów *M. tuberculosis*.

Na rysunku na Fig. 1 przedstawiono żywotność komórek HEK-293 względem kontroli po podaniu nowych pochodnych kwasu (2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-3-ylo)octowego (związki **1–4**).

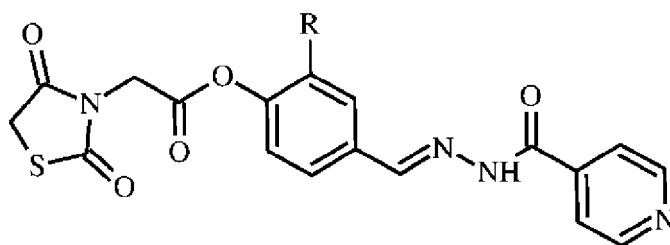
Zastrzeżenia patentowe

1. Pochodne kwasu (2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-3-ylo)octowego o wzorze 1 przedstawionym na rysunku, gdzie R oznacza H, Br, Cl, i OC₂H₅.
2. Sposób otrzymywania związków o wzorze 1 przedstawionym na rysunku, gdzie R oznacza H, Br, Cl, oraz OC₂H₅ **znamienny tym**, że najpierw otrzymuje się związek o wzorze 2, gdzie R oznacza H, Br, Cl, oraz OC₂H₅ poprzez reakcję chlorku 2-(2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-3-ylo)acetylu z odpowiednimi 4-hydroksybenzaldehydami w środowisku bezwodnego 1,4-dioksanu i obecności bezwodnej pirydyny, w stosunku molowym 1:1 a następnie związek o wzorze 2, gdzie R posiada wyżej podane znaczenie poddaje się reakcji z hydrazidem kwasu izonikotynowego, w stosunku molowym 1:1, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika organicznego korzystnie bezwodnego etanolu.
3. Pochodne kwasu (2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-3-ylo)octowego o wzorze 1 pokazanym na rysunku, gdzie R oznacza H, Br, Cl, i OC₂H₅ do zastosowania jako lek w leczeniu gruźlicy.

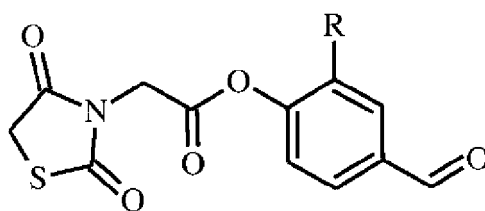


Wzór 1

Rysunki



Wzór 1



Wzór 2

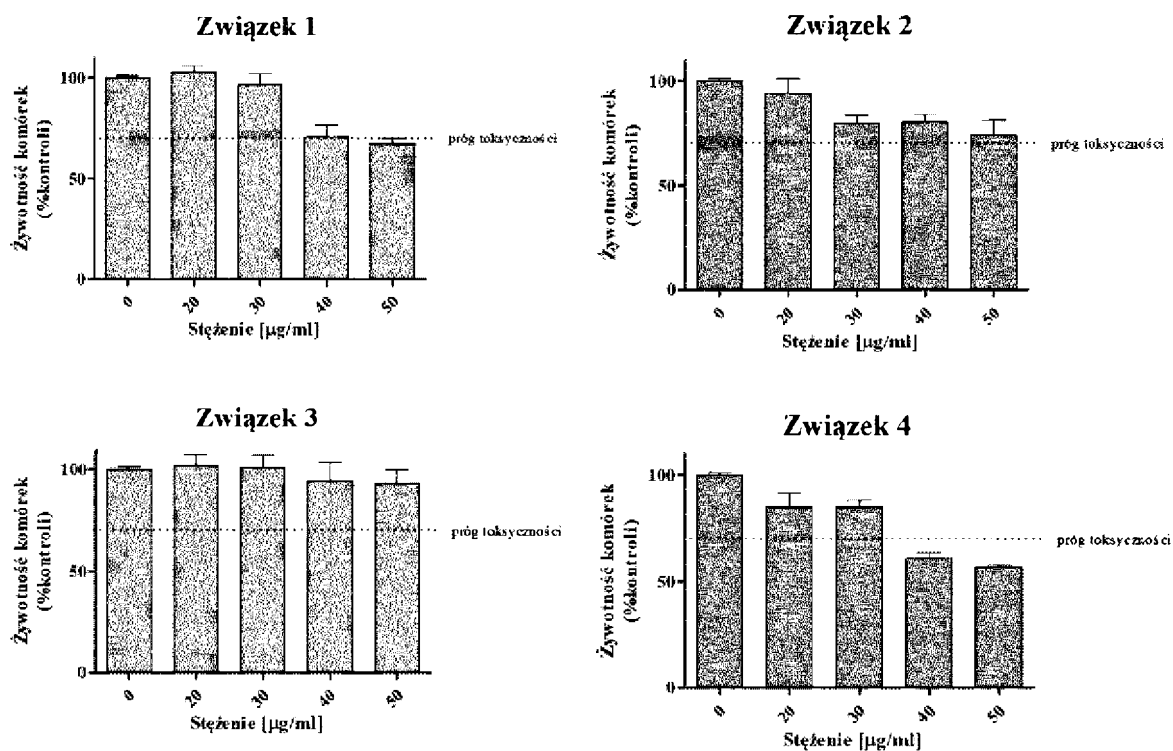


Fig.1

Objaśnienia skrótów: 1 (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza H), 2 (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza Br), 3 (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza Cl), 4 (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza OC_2H_5).