

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240872**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **434141**

(22) Data zgłoszenia: **29.05.2020**

(51) Int.Cl.

C07D 413/14 (2006.01)

A61K 31/455 (2006.01)

A61K 31/443 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/5395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Nowe pochodne 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyny, sposób ich otrzymywania i zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

06.12.2021 BUP 36/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

20.06.2022 WUP 25/22

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW
ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**PIOTR ŚWIĄTEK, Pęgów, PL
JOLANTA SACZKO, Wrocław, PL
JULITA KULBACKA, Wrocław, PL
NINA REMBIAŁKOWSKA, Wrocław, PL
TERESA GLOMB, Wrocław, PL
ŁUKASZ SZCZUKOWSKI, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Rożkowicz

PL 240872 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe pochodne 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyny wykazujące aktywność przeciwnowotworową, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie do leczenia nowotworów zwłaszcza czerniaka złośliwego oraz gruczolakoraka gruczołu sutkowego.

Z analizy stanu techniki wynika, że związki, które zawierają pierścień 1,3,4-oksadiazolu są ważną grupą pochodnych, wśród których poszukuje się nowych kandydatów na leki. Szczególnie dużo doniesień naukowych dotyczy aktywności antyproliferacyjnej czy też cytotoksycznej związków zawierających pierścień 1,3,4-oksadiazolu. Spośród wielu związków 1,3,4-oksadiazolowych aktywność cytostatyczną udowodniono również dla pochodnych o budowie zasad Mannicha. Wprowadzenie w pozycję 3-pierścienia 1,3,4-oksadiazolu odpowiedniej grupy aminometylowej skutkuje powstaniem związków o aktywności przeciwnowotworowej (S. Shahzad, M. Yar, M. Bajda, B. Jadoon, Z. Khan, S. Naqvi, A. Shaikh, K. Hayat, A. Mahmmod, N. Mahmood, S. Filipek, *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 3, 1008–1015, 2014; N. Yadav, P. Kumer, A. Chhikara, M. Chopra, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 95, 721–730, 2017). Badania wpływu 4-fenylopiiperazynylometylowych pochodnych 2-tioakso-1,3,4-oksadiazolu na linie komórek nowotworowych potwierdzają ich aktywność cytostatyczną (J. Sun, S. Z. Ren, X. Y. Lu, J. J. Li, F. Q. Shen, C. Xu i H. L. Zhu, *Bioorg. Med. Chem.*, 25, 9, 2593–2600, 2017). Ponadto w porównaniu z innymi izomerycznymi oksadiazolami, pochodne 1,3,4- wykazują lepszą stabilność metaboliczną, rozpuszczalność w wodzie oraz mniejszą lipofilowość (J. Boström, A. Hogner, A. Llinàs, E. Wellner i A. Plowright, *Oxadiazoles in medicinal chemistry*, *J. Med. Chem.*, 55, 5, 1817–1830, 2012). Pierścień 1,3,4-oksadiazolu działa również jako biozosteryczny akceptor wiązania wodorowego dla związków karbonylowych, takich jak ketony, estry, amidy i karbaminiany, będąc jednocześnie odpornym na rozkład przez peptydazy i esterazy hydrolityczne (J. R. Frost, C. Scully, A. K. Yudin, *Oxadiazole grafts in peptide macrocycles*, *Nature Chemistry*, 8, 12, 1105–1111, 2016).

Z drugiej strony jako związki o potencjalnym zastosowaniu w terapii nowotworów badane są często pochodne pirydyny. Wykazano między innymi, że związki zawierające w swojej strukturze resztę pirydynową hamują angiogenezę (Lukasik P.M. et al., *Eur. J. Med.Chem.* 2012, 57, 311–322; Ahn C.M. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 15, 3893–3896) czy też kierują komórki nowotworowe na drogę apoptozy (Ari F. et al., *Bioorg. Med. Chem.* 2013, 21, 6427–6434; Zhang Y.B. et al., *Med. Chem.Res.* 2013, 22, 3193–3203).

Dokument EP2740733 ujawnia związki heteroarylowe, pochodne 3,4-dihydro-pirazyno [2,3-b] pirazyno-2(1H)-onu jako inhibitory kinazy mTOR. Ujawniono możliwość stosowania tych związków w leczeniu lub zapobieganiu nowotworom oraz chorobom związanym ze szlakiem mTOR/P13K/AKT jak stany zapalne, choroby neurodegeneracyjne, cukrzyca, otyłość, zaburzenia neurologiczne, choroby związane z wiekiem lub choroby sercowo-naczyniowe.

Zgłoszenie P. 427105 ujawnia nową pochodną 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyny wykazującą aktywność przeciwnowotworową. Hydrazyd kwasu N'-[(antracen-9-ylo)metyleno]-2-[4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydin-3-ylo-karboksamido]octowego wykazuje potencjał w leczeniu gruczolakoraka gruczołu sutkowego, gruczolakoraka jelita grubego z opornością lekową oraz ludzkiego czerniaka.

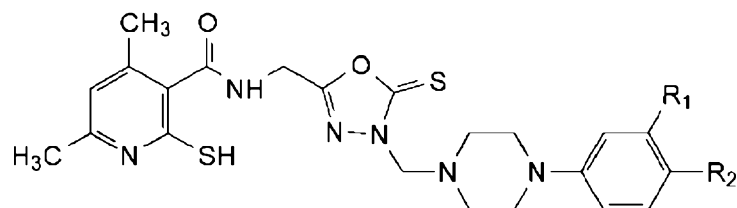
Dokument CN102807574 opisuje pochodne piridotiazyny o szerokim zakresie aktywności przeciwnowotworowej, przy czym wspomniane związki wykazują doskonałe działanie hamujące wobec różnych nowotworowych linii komórkowych w testach komórkowych in vitro. Wspomniane linie komórkowe obejmują linię komórek ludzkiej białaczki OP-1, linię komórkową ludzkiego raka okrężnicy HT29, ludzką linię komórek raka płuc H460, oporną na paklitaksel ludzką linię komórek raka płuc H460TaxR i linię komórkową ludzkiego raka sutka opornych na doksorubicynę MCF-7 /Adr.

Zasadniczym problemem w stosowaniu chemioterapeutyków obecnych na rynku jak i związków znajdujących się na różnych etapach badań jest brak ich wybiórczego działania w stosunku do komórek nowotworowych. Leki obecnie stosowane są bardzo często toksyczne dla zdrowych komórek organizmu, w związku z tym wywołują szereg działań niepożądanych, często zagrażających życiu pacjenta. Poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych koncentrują się w chwili obecnej na związkach niszczących komórki nowotworowe a jednocześnie bezpiecznych dla zdrowych tkanek.

Celem wynalazku jest dostarczenie nowych związków będących kandydatami na leki o aktywności przeciwnowotworowej, działających antyproliferacyjnie i cytotoksycznie w sposób wybiórczy wobec komórek nowotworowych.

Nieoczekiwanie okazało się, że połączenie w jednej strukturze podstawionej pirydyny i ugrupowania 1,3,4-oksadiazolowego wpływa na właściwości farmakologiczne i toksykologiczne w sposób korzystny.

Przedmiotem wynalazku jest związek będący pochodną 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyny o wzorze 1



WZÓR 1

gdzie

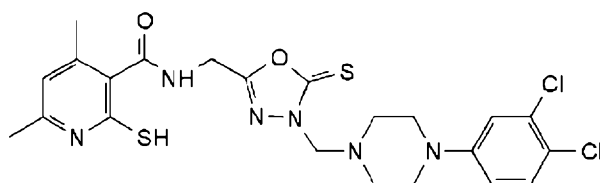
$R_1 = \text{Cl}, \text{CF}_3$

$R_2 = \text{Cl}, \text{H}$

przy czym gdy $R_1 = \text{Cl}, R_2 \neq \text{H}$

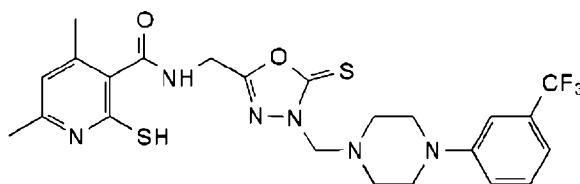
gdy $R_1 = \text{CF}_3, R_2 \neq \text{Cl}$

Korzystnie, pochodną 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyny jest 4,6-dimetylo-N-{4-[4-(3,4-dichlorofenyl)piperazyn-1-ylometylo]-5-tiokso-4,5-dihydro-1,3,4-oksadiazol-2-ilometylo}-2-sulfanylopirydyno-3-karboksamid o wzorze 2.



WZÓR 2

Korzystnie, pochodną 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyny jest 4,6-dimetylo-N-{4-[4-(3-trifluorometylofenyl)piperazyn-1-ylometylo]-5-tiokso-4,5-dihydro-1,3,4-oksadiazol-2-ilometylo}-2-sulfanylopirydyno-3-karboksamid o wzorze 3



WZÓR 3

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zdefiniowany powyżej związek do zastosowania jako lek. Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zdefiniowany powyżej związek do zastosowania w leczeniu chorób nowotworowych.

Korzystnie, chorobą nowotworową jest czerniak złośliwy oraz gruczolakorak gruczołu sutkowego.

Opis figur

Fig. 1 Ocena przeżywalności komórkowej po 24 godzinach inkubacji ze związkiem o wzorze 2 (PS62) lub związkiem o wzorze 3 (PS63) w wybranych liniach komórkowych oraz wyznaczenie współczynnika IC_{50} dla PS62 lub PS63 dla badanych linii komórkowych.

Przedmiot wynalazku ilustruje podany niżej przykład.

Przykład 1

Otrzymywanie 4,6-dimetylo-N-{4-[4-(3,4-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylometylo]-5-tiokso-4,5-dihydro-1,3,4-oksadiazol-2-ilometyl}-2-sulfanylopirydyno-3-karboksamidu (PS62) oraz 4,6-dimetylo-N-{4-[4-(3-trifluorometylofenylo)piperazyn-1-ylometylo]-5-tiokso-4,5-dihydro-1,3,4-oksadiazol-2-ilometylo}-2-sulfanylopirydyno-3-karboksamidu (PS63)

Do roztworu 0,001 mola 4,6-dimetylo-2-sulfanylo-N-[(5-tiokso-4,5-dihydro-1,3,4-oksadiazol-2-ilometylo)pirydyno-3-karboksamidu w 30 ml etanolu dodaje się 0,16 ml 40% roztworu formaldehydu i miesza się przez 15 minut. Następnie do uzyskanego roztworu dodaje się 0,001 mola 3,4-dichlorofenylo-piperazyny w przypadku związku PS62 lub 3-trifluorometylofenylo-piperazyny w przypadku związku PS63. W dalszej kolejności całość miesza się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Powstały po tym czasie osad, następnie odsącza się i krystalizuje z metanolu, otrzymując czysty 4,6-dimetylo-N-{4-[4-(3,4-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylometylo]-5-tiokso-4,5-dihydro-1,3,4-oksadiazol-2-ilometylo}-2-sulfanylopirydyno-3-karboksamidu o temp. top. 499–501 K z wydajnością 62% wydajności teoretycznej lub 4,6-dimetylo-N-{4-[4-(3-trifluorometylofenylo)piperazyn-1-ylometylo]-5-tiokso-4,5-dihydro-1,3,4-oksadiazol-2-ilometylo}-2-sulfanylopirydyno-3-karboksamidu o temp. top. 488–491 K z wydajnością 76% wydajności teoretycznej.

Charakterystykę właściwości nowych związków o czystości analitycznej przedstawiono poniżej:

Związek PS62

Wzór sumaryczny (m.cz.): $C_{22}H_{24}Cl_2N_6O_2S_2$ (539.49)

Temp. top.(°K): 499–501

IR(KBr) (cm^{-1}): 3158 (NH), 2835–3027 (CH), 1646 (C=O)

1H NMR (DMSO d_6) (ppm): 2.06 (s, 3H, $CH_{3-pirydyna}$), 2.26 (s, 3H, $CH_{3-pirydyna}$), 2.77-2.83 (m, 4H, $CH_2CH_2-piperazyna$), 3.12-3.18 (m, 4H, $CH_2CH_2-piperazyna$), 4.44-4.46 (d, 2H, CH_2 , $J=6$ Hz), 5.00 (s, 2H, CH_2), 6.48 (s, 1H, $H_{\beta-pirydyna}$), 6.88-6.93 (m, 1H, ArH), 7.08-7.10 (m, 1H, ArH), 7.34-7.37 (m, 1H, ArH), 8.82 (t, 1H, NH, $J=6$ Hz), 13.27 (s, 1H, SH)

Związek PS63

Wzór sumaryczny (m.cz.): $C_{23}H_{25}F_3N_6O_2S_2$ (538.60)

Temp. top.(°K): 488–491

IR(KBr) (cm^{-1}): 3164 (NH), 2835–3027 (CH), 1648 (C=O)

1H NMR (DMSO d_6) (ppm): 2.07 (s, 3H, $CH_{3-pirydyna}$), 2.26 (s, 3H, $CH_{3-pirydyna}$), 2.79-2.85 (m, 4H, $CH_2CH_2-piperazyna$), 3.17-3.23 (m, 4H, $CH_2CH_2-piperazyna$), 4.46-4.48 (d, 2H, CH_2 , $J=6$ Hz), 5.01 (s, 2H, CH_2), 6.48 (s, 1H, $H_{\beta-pirydyna}$), 7.03-7.06 (m, 1H, ArH), 7.13-7.22 (m, 2H, ArH), 7.36-7.42 (m, 1H, ArH), 8.83 (t, 1H, NH, $J=6$ Hz), 13.27 (s, 1H, SH)

Wyniki analizy elementarnej (C,H,N) dla wzoru sumarycznego $C_{22}H_{24}Cl_2N_6O_2S_2$ i $C_{23}H_{25}F_3N_6O_2S_2$ mieściły się w granicach $\pm 0.4\%$ w porównaniu z wartościami obliczonymi.

Przykład 2

Ocena aktywności przeciwnowotworowej

Aktywność przeciwnowotworową oceniano testem MTT z zastosowaniem bromku 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowego. Test MTT jest kolorymetryczną metodą ilościową, stosowaną do oznaczania aktywności przemian energetycznych w mitochondriach. Żółta, rozpuszczalna w wodzie sól tetrazolowa (formazan błękitu triazolowego-MTT) w wyniku działania mitochondrialnej dehydrogenazy zostaje zredukowana do purpurowych nierozpuszczalnych w wodzie kryształów formazanu. Ilość wygenerowanych kryształów jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów, a w ściśle określonych warunkach badań do liczby żywych komórek, wykazujących aktywności metaboliczne. Pomiar aktywności mitochondriów mierzy się spektroskopowo przy długości fali 570 nm. Do pomiaru spektroskopowego wymagany jest roztwór jednorodny optycznie w tym celu rozpuszcza się kryształy formazanu w izopropanolu. Komórki do testu rozsadzano po 10 tys. komórek na dołek płytki 96 dołkowej. Do badań wybrano następujące linie komórkowe: ludzkie komórki gruczolakoraka gruczołu sutkowego wrażliwe (MCF-7/WT) i odporne (MCF-7/DOX) na doksorubicynę; ludzkie komórki glejaka (SNB-19); ludzkie komórki czerniaka (amelanotyczne) (C32); ludzkie komórki czerniaka złośliwego (A375) oraz komórki kontrolne (HaCaT) – ludzkie keratynocyty. Po 24 godzinach dodawano $C_{22}H_{24}Cl_2N_6O_2S_2$ lub $C_{23}H_{25}F_3N_6O_2S_2$ w stężeniu od 1 do 500 μM w co najmniej trzykrotnym powtórzeniu. Komórki ekspono-

wano na czynniki przez 24 godziny, następnie wykonano test MTT. Wyniki testu przedstawiono na Wykresie 1. Otrzymane wyniki były podstawą do wyznaczenia współczynnika IC_{50} dla badanych linii komórkowych.

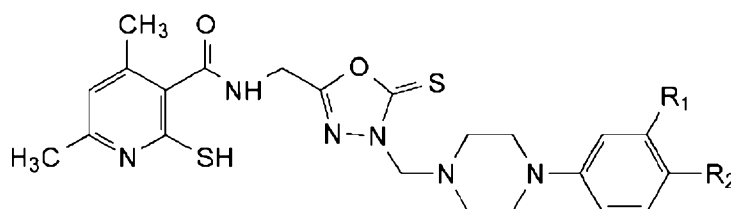
T a b e l a 1. Wartość IC_{50} związków PS62 i PS63 dla badanych linii komórkowych

Nazwa linii komórkowej	Wartość IC_{50} [μM]	Wartość IC_{50} [μM]
	PS62	PS63
MCF-7/WT	261,40	119,29
MCF-7/DOX	137,31	295,81
SNB-19	126,02	295,81
C32	170,28	304,39
A375	80,79	202,47
HaCaT (ludzka linia prawidłowa, kontrolna)	115,12	270,32

Przeprowadzone badania wskazują najwyższą aktywność przeciwnowotworową związku PS62 wobec ludzkich komórek czerniaka złośliwego ($IC_{50} = 80,79 \mu M$). Natomiast, prawidłowe komórki HaCaT eksponowane na związek PS62 wykazały się mniejszą wrażliwością ($IC_{50} = 115,12 \mu M$). Najwyższą aktywność przeciwnowotworową dla związku PS63 badania wskazują wobec wrażliwych ludzkich komórek gruczolakoraka gruczołu sutkowego ($IC_{50} = 119,29$), z kolei prawidłowe komórki eksponowane na związek PS63 okazały się mniej wrażliwe HaCaT $IC_{50} = 270,32 \mu M$).

Zastrzeżenia patentowe

1. Związek będący pochodną 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyny o wzorze 1



WZÓR 1

gdzie

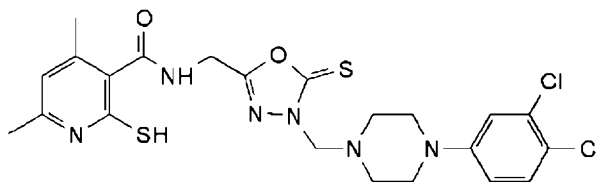
$R_1 = Cl, CF_3$

$R_2 = Cl, H$

przy czym gdy $R_1 = Cl, R_2 \neq H$

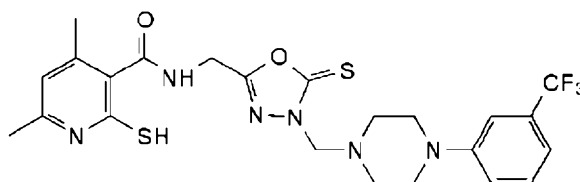
gdy $R_1 = CF_3, R_2 \neq Cl$

2. Związek według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pochodną 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyny jest 4,6-dimetylo-N-{4-[4-(3,4-dichlorofenilo)piperazyn-1-ylometylo]-5-tiokso-4,5-dihydro-1,3,4-oksadiazol-2-ylometylo}-2-sulfanylopirydyno-3-karboksamid o wzorze 2.



WZÓR 2

3. Związek według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pochodną 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyny jest 4,6-dimetylo-N-{4-[4-(3-trifluorometylofenylo)piperazyn-1-ylometylo]-5-tiokso-4,5-dihydro-1,3,4-oksadiazol-2-ylometylo}-2-sulfanylopyrydino-3-karboksamid o wzorze 3.



WZÓR 3

4. Związek według któregokolwiek z zastrzeżeń 1–3 do zastosowania jako lek.
5. Związek według któregokolwiek z zastrzeżeń 1–3 do zastosowania w leczeniu chorób nowotworowych.
6. Związek według któregokolwiek z zastrzeżeń 1–3 do zastosowania według zastrz. 5, **znamienny tym**, że chorobą nowotworową jest czerniak złośliwy oraz gruczolakorak gruczołu sutkowego.

Rysunek

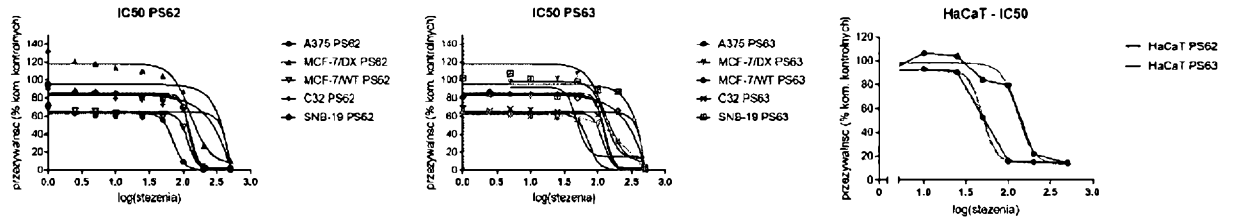


Fig. 1