

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237514**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428441**

(22) Data zgłoszenia: **31.12.2018**

(51) Int. Cl.

C07D 277/34 (2006.01)

C07D 277/38 (2006.01)

A61K 31/426 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

(54) **Pochodne kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego, sposób ich wytwarzania,
ich zastosowanie medyczne oraz kompozycja farmaceutyczna**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
13.07.2020 BUP 15/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
19.04.2021 WUP 08/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Lublin, PL**

UNIwersytet Łódzki, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

NAZAR TROTSKO, Lublin, PL

KATARZYNA DZITKO, Dobieszków, PL

ADRIAN BEKIER, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Belz

PL 237514 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe pochodne kwasu (4-okso-1,2,3,4-tiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze 1, gdzie R oznacza 4-HO-C₆H₄, 4-HO-3-CH₃O-C₆H₃, 3-C₂H₅O-4-HO-C₆H₃, 3-Cl-4-HO-C₆H₃ i 3-Br-4-HO-C₆H₃. Przedmiotem wynalazku jest także sposób ich wytwarzania, ich zastosowanie medyczne oraz kompozycja farmaceutyczna.

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) należy do gatunku kosmopolitycznego pasożyta wywołującego toksoplazmozę u wszystkich gatunków ptaków i ssaków w tym ludzi. Szacuje się, że nawet 1/3 populacji jest zarażona tym pasożytem [Tenter A.M., Heckerroth A.R., Weiss L.M. *Int. J. Parasitol.* 2000, 30, 1217–1258]. Rozwinięta odpowiedź humoralna i komórkowa u osób immunokompetentnych szybko ogranicza intensywną proliferację tachyzoitów, ale gdy nie wyeliminuje pasożyta całkowicie z organizmu gospodarza, skutkuje to długotrwałą obecnością cyst tkankowych zlokalizowanych głównie w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), mięśniach i gałce ocznej. Ta długotrwała obecność pasożyta może nieść ryzyko wystąpienia trwałych uszkodzeń narządu wzrokowego oraz (lub) mózgu, a także wykazuje korelację z występowaniem poważnych zaburzeń nerwowych takich jak: schizofrenia, choroba Parkinsona czy padaczka [Bosch-Driessen L.E., Berendschot T.T., Ongkosuwito J.V., Rothova A. *Ophthalmology* 2002, 109, 869–878; Torrey E.F., Yolken R.H. *Emerg. Infect. Dis.* 2003, 9, 1375–1380].

Zarażenie pierwotniakiem wiąże się również z poważnymi skutkami u osób z dysfunkcją układu odpornościowego (osoby HIV+, chorzy na AIDS, pacjenci poddani chemioterapii/po przeszczepach). U ciężarnych natomiast może powodować wady płodu, a nawet poronienia. Noworodki z toksoplazmozą wrodzoną charakteryzują się występowaniem zmian patologicznych w obrębie układu nerwowego, przy czym skutki wrodzonej inwazji *T. gondii* często są zauważalne dopiero po kilkunastu latach i obejmują uszkodzenia narządu wzroku lub OUN, zaburzenia gospodarki hormonalnej czy nieprawidłowy rozwój płciowy [Wallon M., Kodjikian L., Biquet C., Garweg J., Fleury J., Quantin C., Peyron F. *Pediatrics* 2004, 113, 1567–1572]. Z kolei toksoplazmoza u osób z obniżoną odpornością objawia się bólami głowy, poczuciem dezorientacji, bólami w klatce piersiowej oraz problemami z oddychaniem [Ferreira M.S., Borges A.S. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2002, 97, 443–457]. Ponadto istnieje u tych pacjentów ryzyko wystąpienia trwałych uszkodzeń narządu wzrokowego lub mózgu [Guex-Crosier Y. *Int. J. Med. Sci.* 2009, 6, 140–142; Długońska H. *Pol. Merkuriusz Lekarski* 2008, 24, 275–277]. W przypadkach skrajnych choroba ta jest śmiertelna. Obecnie dostępne leki działają jedynie na ostrą fazę toksoplazmozy lecz nie powodują eradykacji pierwotniaka z organizmu oraz nie eliminują całkowicie cyst pasożytniczych, a co gorsze, wykazują poważne skutki uboczne, do których zaliczyć należy m.in. zaburzenia hematologiczne i neurologiczne, zmiany skórne i błon śluzowych, zaburzenia żołądkowo-jelitowe, uszkodzenia szpiku kostnego, teratogenność, czy kamienicę nerkową [Guex-Crosier Y. *Int. J. Med. Sci.* 2009, 6, 140–142; Lipka B., Milewska-Bobula B., Filipek M. *Wiadomości Parazytologiczne* 2011, 57, 87–92]. Odnotowywane są również przypadki oporności wielolekowej. Istnieje zatem rzeczywiste zapotrzebowanie na opracowanie nowych leków, zdolnych do skutecznego leczenia toksoplazmozy oraz pozbawionych skutków ubocznych. Dodatkowo nie są znane jeszcze skuteczne narzędzia immunoprofilaktyczne działające protekcyjnie na ludzi.

Układ tiazolidyn-4-onu należy do ważnej grupy związków heterocyklicznych o różnorodnych aktywnościach biologicznych, takich jak przeciwbakteryjna, przeciwcukrzycowa, przeciwnowotworowa, przeciwgrzybicza, przeciwzapalna itd. Układ ten cieszył się ciągłym zainteresowaniem naukowców na przestrzeni wielu lat. Potwierdzają to liczne prace przeglądowe na temat aktywności oraz mechanizmów działania tiazolidyn-4-onów [Kaminsky D., Kryshchyshyn A., Lesyk R. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, 140, 542–594; Havrylyuk D., Roman O., Lesyk R. *Eur. J. Med. Chem.* 2016, 113, 145–166; Chadna N., Bahia M.S., Kaur M., Silakari O. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 2953–2974; Tripathi A.C., Gupta S.J., Fatima G.N., Sonar P.K., Verma A., Saraf S.K. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 72, 52–77; Jain V.S., Vora D.K., Ramaa C.S. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, 21, 1599–1620; Verma A., Saraf S.K. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, 43, 897–905].

Pierwsza wzmianka o aktywność anty-*T. gondii* dla pochodnych tiazolidyn-4-onu, mianowicie kwasów {3-alkilo/fenilo-2-[(nitrobenzylideno)hydrazynylideno]-4-okso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno}octowych ukazała się w publikacji Tenorio R.P. i wsp. w 2005 roku [Tenorio R.P., Carvalho C.S., Pessanha C.S., de Lima J.G., de Faria A.R., Alves A.J., de Melo E.J.T., Goes A.J.S. *Bioorg. Med. Chem. Letts.* 2005, 15, 2575–2578].

De Aquino T.M. i wsp. przebadali grupę pochodnych kwasu 2-[(benzylideno)hydrazono]-3-fenilo-4-okso-tiazolidyno-5-octowego pod kątem aktywności przeciw-*T. gondii*. Wszystkie badane związki

znacząco zmniejszały procent zainfekowanych komórek i średnią liczbę tachyzoitów na komórkę w stężeniu 2 mM. Niektóre pochodne wykazały lepsze wyniki w porównaniu z standardowymi lekami: hydroksymocznikiem i sulfadiazyną. Warto zauważyć, że w stężeniach 2, 5 i 8 mM niektóre związki były wysoce toksyczne. Obserwowano brak zainfekowanych komórek i pasożytów wewnątrzkomórkowych [De Aquino T.M., Liesen A.P., da Silva R.E.A., Lima V.T., Carvalho C.S., de Faria A.R., de Araujo J.M., de Lima J.G., Alves A.J., de Melo E.J.T., Goes A.J.S. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 446–456].

Liesen A.P. i wsp. zmodyfikowali pochodne kwasu 4-oksotiazolidyno-5-octowego wprowadzając w pozycję 2 układu tiazolidyny pierścień imidazolu. Te związki zostały poddane badaniom pod kątem aktywności anti-*T. gondii*. Przebadane pochodne znaczaco zmniejszały procent infekowanych komórek oraz liczbę tachyzoitów w komórce w stężeniach od 0,1 do 10 mM w porównaniu do sulfadiazyny i hydroksymocznika [Liesen A.P., de Aquino T.M., Carvalho C.S., Lima V.T., de Araujo J.M., de Lima J.G., de Faria A.R., de Melo E.J.T., Alves A.J., Alves E.W., Alves A.Q., Goes A.J.S. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45, 3685–3691].

Dla podstawionych 3-benzytowych pochodnych tiazolidyn-4-onu odnotowano poziom skuteczności przeciwko tachyzoitom *T. gondii* przy $IC_{50} = 5\text{--}148 \mu\text{M}$ [Carradori S., Secci D., Bizzarri B., Chimenti P., De Monte C., Guglielmi P., Campestre C., Rivanera D., Bordon C., Jones-Brando L. J. *Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2017, 32, 746–758].

Brak 100% skuteczności obecnych leków w leczeniu toksoplazmozy były inspiracją do podjęcia badań w celu otrzymania skutecznych małotoksycznych związków o aktywności przeciw-*T. gondii*, należących do tej grupy chemicznej.

Przedmiotem wynalazku są nowe pochodne kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze 1, gdzie R oznacza 4-HO-C₆H₄, 4-HO-3-CH₃O-C₆H₃, 3-C₂H₅O-4-HO-C₆H₃, 3-Cl-4-HO-C₆H₃ i 3-Br-4-HO-C₆H₃ o aktywności anti-*T. gondii*. Związki te nie były opisane dotąd w literaturze ani pod względem ich budowy ani aktywności biologicznej.

Sposób otrzymywania pochodnych o wzorze 1, gdzie R oznacza 4-HO-C₆H₄, 4-HO-3-CH₃O-C₆H₃, 3-C₂H₅O-4-HO-C₆H₃, 3-Cl-4-HO-C₆H₃ i 3-Br-4-HO-C₆H₃ według wynalazku polega na tym, że otrzymuje się je w wyniku cyklokondensacji odpowiednich tiosemikarbazonów o wzorze 2, gdzie R oznacza 4-HO-C₆H₄, 4-HO-3-CH₃O-C₆H₃, 3-C₂H₅O-4-HO-C₆H₃, 3-Cl-4-HO-C₆H₃ i 3-Br-4-HO-C₆H₃ z acetylenodikarboksylenem dimetylu, w stosunku molowym 1:1. Reakcja przebiega w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika organicznego jak metanol lub etanol korzystnie etanol.

Pochodne kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze 1 według wynalazku do zastosowania jako lek w leczeniu toksoplazmozy.

Przedmiotem wynalazku jest także kompozycja farmaceutyczna zawierająca substancję czynną w połączeniu z co najmniej 1 nośnikiem lub rozcieńczalnikiem farmaceutycznym, która charakteryzuje się tym, że jako substancję aktywną zawiera pochodne kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze 1.

Nowe związki będące przedmiotem wynalazku wykazują aktywność anti-*T. gondii* *in vitro* oraz brak znaczącej cytotoksyczności względem komórek żywicielskich.

P r z y k ł a d I. Otrzymywanie {3-fenyl-2-[(4-hydroksybenzylideno)hydrazynylideno]-4-okso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno}octanu metylu

Do 0,003 mola 4-fenyl-1-(4-hydroksybenzylideno)-3-tiosemikarbazonydu i 0,003 mola acetylenodikarboksyleny dimetylu dodano 20 mL metanolu i ogrzewano we wrzeniu przez 1,5 godziny. Po ochłodzeniu powstały osad odsączono i wysuszono. Krystalizowano z kwasu octowego.

Wydajność 81%, t.t. 222–224°C.

¹H NMR δ (ppm) (DMSO-d₆): 3,83 s (3H, COOCH₃); 6,80 s (1H, CH=); 6,86 d, 7,64 d (4H, 4-HO-C₆H₄, $J=8,7$ Hz); 7,47-7,57 m (5H, C₆H₅); 8,33 s (1H, CH=N); 10,22 s (1H, OH).

¹³C NMR δ (ppm) (DMSO-d₆): 53,0; 115,1; 116,3; 125,0; 128,7; 129,5; 129,6; 130,6; 134,8; 142,5; 159,6; 160,3; 161,2; 164,6; 166,5.

P r z y k ł a d II. W sposób analogiczny do opisanego w przykładzie I otrzymano pozostałe pochodne kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze 1 (gdzie R oznacza 4-HO-3-CH₃O-C₆H₃, 3-C₂H₅O-4-HO-C₆H₃, 3-Cl-4-HO-C₆H₃ i 3-Br-4-HO-C₆H₃):

{3-fenyl-2-[(4-hydroksy-3-metoksybenzylideno)hydrazynylideno]-4-okso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno}octan metylu

Wydajność 79%, t.t. 210–212°C.

^1H NMR δ (ppm) (DMSO- d_6): 3,81 s (3H, OCH₃); 3,82 s (3H, COOCH₃); 6,80 s (1H, CH=); 6,87 d, 7,25 dd, 7,35 d (3H, 4-HO-3-CH₃O-C₆H₃, $J=8,1$; 1,8 Hz); 7,49-7,58 m (5H, C₆H₅); 8,31 s (1H, CH=N); 9,84 s (1H, OH).

^{13}C NMR δ (ppm) (DMSO- d_6): 53,1; 56,0; 111,3; 115,1; 116,2; 123,4; 125,4; 128,7; 129,5; 129,6; 134,8; 142,5; 148,3; 150,8; 159,4; 160,6; 164,6; 166,5.

{2-[(3-etoksy-4-hydroksybenzylideno)hydrazynylideno]-3-fenilo-4-okso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno}joctan metylu

Wydajność 81%, t.t. 190–192°C.

^1H NMR δ (ppm) (DMSO- d_6): 1,36 t (3H, OCH₂CH₃, $J=6,9$ Hz); 3,82 s (3H, COOCH₃); 4,06 q (2H, OCH₂CH₃, $J=6,9$ Hz); 6,80 s (1H, CH=); 6,88 d, 7,25 dd, 7,33 d (3H, 3-C₂H₅O-4-HO-C₆H₃, $J=8,1$; 1,8 Hz); 7,47-7,57 m (5H, C₆H₅); 8,30 s (1H, CH=N); 9,74 s (1H, OH).

^{13}C NMR δ (ppm) (DMSO- d_6): 15,2; 53,1; 64,4; 112,8; 115,1; 116,3; 123,3; 125,4; 128,7; 129,5; 129,6; 137,8; 142,4; 147,5; 151,0; 159,3; 160,6; 164,6; 166,5.

{2-[(3-chloro-4-hydroksybenzylideno)hydrazynylideno]-3-fenilo-4-okso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno}joctan metylu

Wydajność 83%, t.t. 238–240°C.

^1H NMR δ (ppm) (DMSO- d_6): 3,83 s (3H, COOCH₃); 6,81 s (1H, CH=); 7,07 d, 7,63 dd, 7,74 d (3H, 3-Cl-4-HO-C₆H₃, $J=8,4$; 2,0 Hz); 7,49-7,57 m (5H, C₆H₅); 8,34 s (1H, CH=N); 11,00 s (1H, OH).

^{13}C NMR δ (ppm) (DMSO- d_6): 53,1; 115,3; 117,5; 120,7; 126,3; 128,5; 128,7; 129,5; 129,6; 130,4; 134,7; 142,3; 156,5; 159,2; 160,5; 164,6; 166,5.

{2-[(3-bromo-4-hydroksybenzylideno)hydrazynylideno]-3-fenilo-4-okso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno}joctan metylu

Wydajność 75%, t.t. 236–238°C.

^1H NMR δ (ppm) (DMSO- d_6): 3,83 s (3H, COOCH₃); 6,81 s (1H, CH=); 7,06 d, 7,67 dd, 7,90 d (3H, 3-Br-4-HO-C₆H₃, $J=8,4$; 2,0 Hz); 7,47-7,57 m (5H, C₆H₅); 8,34 s (1H, CH=N); 11,06 s (1H, OH).

^{13}C NMR δ (ppm) (DMSO- d_6): 53,1; 110,3; 115,3; 117,2; 126,7; 128,7; 129,2; 129,5; 129,6; 133,4; 134,7; 142,3; 157,5; 159,0; 160,4; 164,6; 166,5.

Badania biologiczne.

P r z y k ł a d III. Wpływ na żywotność komórek linii L929 – test MTT.

Zasada testu MTT

Oznaczenie cytotoksyczności związków z wykorzystaniem komórek linii L929 wykonano przy użyciu testu MTT, zgodnie z Normą Europejską: ISO 10993-5:2009(E), Biological evaluation of medical devices, Part 5: Test for *in vitro* cytotoxicity. Test MTT oparty jest na przekształceniu żółtej soli MTT (bromku 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowego) do fioletowego, nierozpuszczalnego formazanu. Za tę konwersję odpowiedzialne są NADPH lub NADH, produkowane przez enzym dehydrogenazę mitochondrialną obecną w aktywnych metabolicznie komórkach. Natężenie barwy fioletowego produktu jest wprost proporcjonalne do liczby żywych komórek w próbce i może być mierzone spektrofotometrycznie.

Część doświadczalna

Na płytkę 96-dołkową (Nunc^{TC}), naniesiono komórki (L929 ATTC-catalog No. CCL-1TM) o gęstości $1 \times 10^4/100$ μl /dołek, zawieszona w pełnym podłożu hodowlanym RPMI 1640 bez czerwieni fenolowej (Biowest) suplementowanym 10% surowicy płodów bydłęcych [FBS – fetal bovine serum] (Cytogen), 2 mM/ml L-glutaminy (Sigma), 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycyny (Sigma), 100 U/ml penicyliny (Sigma) i inkubowano je (37°C, 5% CO₂) przez 24 godziny. Po inkubacji usuwano podłoże z komórek i dodawano po 100 μl związków (stężenia końcowe wynosiły: 200 $\mu\text{g/ml}$). Związki rozpuszczono w 0,5 M wodorotlenku sodu (NaOH) 6,25 mg/ml i następnie seryjnie rozcieńczono w pełnym podłożu. Końcowe stężenie NaOH nie było wyższe niż 3,2%. Dodatkowe kontrole stanowiły: rozpuszczalnik NaOH, sulfadiazyna oraz sulfadiazyna + trimetoprim (5:1). Kontrolę negatywną stanowiły komórki hodowane w pełnym podłożu hodowlanym RPMI.

Po dodaniu ww. związków komórki inkubowano 24 godziny w 37°C, 5% CO₂. Po tym czasie hodowlę obserwowano pod mikroskopem i wykonywano zdjęcia. Następnie do każdego dołka na płytce dodawano po 50 μl roztworu MTT (C=1 mg/ml PBS bez jonów Ca i Mg, Sigma) i inkubowano (37°C i 5% CO₂). Po 4 godzinach płytki wirowano (200xg, 10 min), zbierano supernatant z komórek,

a kryształy formazanu rozpuszczano dodając po 150 μ l DMSO/studzienkę. Barwę produktu stabilizowano dodając po 25 μ l buforu glicynowego. Poziom absorbancji mierzono od razu za pomocą czytnika ELISA (Multiskan EX, Labsystems, Vienna, VA, USA), przy długości fali $\lambda=570$ nm.

W doświadczeniu oceniano wpływ testowanych związków na żywotność komórek linii L929 przy pomocy testu MTT. Za kontrolę przyjęto hodowle komórkowe inkubowane w pełnym podłożu RPMI, bez dodatku badanych substancji i rozpuszczalnika (NaOH). Żywotność komórek obliczono według wzoru:

$$\text{Żywotność} = \frac{\text{Wartość absorbancji próby badanej}}{\text{Wartość absorbancji próby kontrolnej}} \times 100\%$$

Dla badanych związków wyznaczono stężenie CC_{30} – stężenie cytotoksyczne związków dla 30% komórek (Tabela 1).

Oceniono także wpływ leków powszechnie stosowanych w leczeniu toksoplazmozy na żywotność komórek linii L929. W przypadku sulfadiazyny CC_{30} wynosi 1506,00 μ g/ml, oraz dla sulfadiazyny + trimetoprim CC_{30} wynosi 850,00 μ g/ml.

T a b e l a 1. Cytotoksyczność pochodnych kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze 1 (stężenie wyjściowe 6,25 mg/ml 0,5M NaOH), rozcieńczonych seryjnie w pełnym podłożu hodowlanym RPMI. Procent żywych komórek (%) \pm odchylenie standardowe.

pochodne kwasu (4-oksotiazolidyn- 5-ylideno)octowego	Stężenia [μ g/ml]									CC_{30} [μ g/ml]
	200	100	50	25	12,5	6,25	3,1	1,6	0,8	
1	25,06 $\pm 1,90$	101,31 $\pm 9,83$	101,90 $\pm 0,81$	96,12 $\pm 1,11$	89,64 $\pm 1,86$	91,16 $\pm 0,52$	92,75 $\pm 1,41$	97,80 $\pm 1,34$	99,99 $\pm 2,02$	180,00
2	50,62 $\pm 5,50$	76,27 $\pm 4,81$	98,47 $\pm 5,43$	87,96 $\pm 1,62$	89,73 $\pm 4,90$	90,32 $\pm 7,37$	97,72 $\pm 2,92$	99,73 $\pm 9,78$	98,47 $\pm 2,54$	120,00
3	35,40 $\pm 3,02$	106,22 $\pm 7,16$	101,42 $\pm 6,57$	88,30 $\pm 7,27$	85,77 $\pm 6,10$	87,62 $\pm 5,70$	90,99 $\pm 9,67$	94,69 $\pm 6,28$	97,30 $\pm 8,92$	191,00
4	29,60 $\pm 3,21$	105,29 $\pm 3,21$	103,03 $\pm 8,99$	103,94 $\pm 1,37$	95,19 $\pm 2,00$	94,69 $\pm 1,76$	93,43 $\pm 4,71$	97,72 $\pm 5,11$	99,48 $\pm 2,75$	183,00
5	33,55 $\pm 9,57$	103,88 $\pm 5,33$	104,43 $\pm 5,76$	102,85 $\pm 2,66$	93,09 $\pm 2,94$	93,26 $\pm 6,50$	95,28 $\pm 4,87$	100,91 $\pm 4,24$	103,18 $\pm 9,11$	186,00

Objaśnienia skrótów: **1** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza 4-HO-C₆H₄); **2** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza 4-HO-3-CH₃O-C₆H₃); **3** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza 3-C₂H₅O-4-HO-C₆H₃); **4** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza 3-Cl-4-HO-C₆H₃); **5** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza 3-Br-4-HO-C₆H₃).

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że pochodne kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze 1 wykazują niską cytotoksyczność. Stężenie cytotoksyczne CC_{30} w kierunku linii komórek L929 wynosiło odpowiednio: 180,00 μ g/ml (dla związku **1**), 120,00 μ g/ml (dla związku **2**), 191,00 μ g/ml (dla związku **3**), 183,00 μ g/ml (dla związku **4**), 186,00 μ g/ml (dla związku **5**).

P r z y k ł a d IV. Badanie wpływu pochodnych tiazolidyn-4-onu na wewnątrzkomórkowe namnażanie się tachyzoitów *T. gondii* szczepu RH ATCC* PRA-310™ na komórkach linii Vero ATCC* CCL-81™ (test inkorporacji uracylu znakowanego trytem).

Wpływ pochodnych kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego na wewnątrzkomórkowe namnażanie się pierwotniaka *T. gondii* szczepu RH na komórkach linii Vero wykonano przy użyciu testu wbudowywania uracylu znakowanego trytem. Kontrolę doświadczenia stanowiły komórki fibroblastów nerki mały zielonej zarażone pierwotniakiem i inkubowane w podłożu hodowlanym bez leku (kontrola negatywna – przyjęto jako 100% proliferacji *Tg*). Wyznaczono wartość IC_{50} (half maximal inhibitory concentration – stężenie powodujące zahamowanie namnażania się pierwotniaka o 50%).

Test inkorporacji ³H-uracylu polega na pomiarze radioaktywności pierwiastka trytu, który wraz z uracylem jest wychwytywany i wbudowywany do łańcucha RNA *T. gondii*. Mniejsza liczba zliczeń przez czytnik scyntylicyjny w porównaniu do kontroli świadczy o hamowaniu namnażania się pierwotniaka w mikrohodowli w obecności testowanych związków.

Część doświadczalna

24-godzinna hodowlę komórek Vero (1x10⁴/studzienkę) zarażono tachyzoitami *T. gondii* szczepu RH w stosunku 1 komórka żywicielska do 10 komórek pierwotniaka (1x10⁵/100 μ l/studzienkę) – w całym

teście inkorporacji uracylu stosowano podłoże hodowlane DMEM [Dulbecco's Modified Eagle's Medium] (ATCC) suplementowane 3% termicznie inaktywowanej surowicy płodów bydłych [HIFBS – heat inactivated fetal bovine serum] (ATCC), 100 µg/ml streptomycyny (ATCC), 100 U/ml penicyliny (ATCC). Mikrohodowle inkubowano 1 godzinę w 37°C, 5% CO₂, umożliwiając pierwotniakowi wniknięcie do komórek i utworzenie wakuoli pasożytniczej. Po tym czasie dodano po 100 µl badanego związku, uzyskując końcowe stężenia: 0,8–200 µg/ml, kontrolę pozytywną stanowiła sulfadiazyna (najwyższe stężenie 2500 µg/ml) oraz sulfadiazyna + trimetoprim w stosunku 5:1 (najwyższe stężenie odpowiednio 2500 i 500 µg/ml). Płytki inkubowano 24 godziny (37°C, 5% CO₂), a następnie do każdej studzienki dodawano ³H-uracylu (1 µCi/50 µl), po czym kontynuowano inkubację przez 48 godzin w warunkach jw. Po tym czasie płytki zamrożono w -20°C. Przed przystąpieniem do odczytu testu płytkę rozmrażano, a zawartość studzienek zbierano na bibułę z włókna szklanego (Wallac Oy PrintedFiltermat A), którą pozostawiono do wyschnięcia. Do pomiaru poziomu promieniowania β użyto czytnika scyntylicyjnego (Wallac Oy, Turku, Finland), uprzednio nasączając bibułę płynem scyntylicyjnym (BetaplateScint, PerkinElmer).

Oceniono wpływ pochodnych kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego według wynalazku na namnażanie się pierwotniaka w hodowlach komórek linii Vero. Wartości stężeń IC₅₀ obliczono za pomocą programu GraphPad Prism wersja 7.00 dla Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) na podstawie danych zamieszczonych w Tabeli 2.

T a b e l a 2. Aktywność przeciw-*Toxoplasma gondii*. Procent proliferacji *T. gondii* ± odchylenie standardowe.

pochodne kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego										
	1		2		3		4		5	
µg/ml	wartość	±SD	wartość	±SD	wartość	±SD	wartość	±SD	wartość	±SD
200	3,44	1,08	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0,32	0,14
150	17,22	1,05	28,38	7,22	23,97	9,17	0,55	0,14	0,45	0,14
100	44,94	10,59	43,59	9,16	49,61	8,23	5,54	1,38	2,26	1,59
50	55,82	18,99	60,67	8,72	59,09	6,63	35,69	11,01	21,30	3,86
25	59,98	16,18	70,19	14,24	79,30	13,78	56,66	6,02	46,20	26,70
12,5	72,45	8,50	84,13	9,81	83,12	10,33	53,70	7,67	59,65	13,66
6,25	73,58	9,39	81,82	7,87	81,72	8,66	61,27	9,37	69,26	8,41
3,13	81,60	11,32	84,27	4,44	76,98	11,80	68,87	13,21	77,17	11,77
1,56	78,96	7,66	85,43	8,16	82,90	3,14	71,09	12,17	74,97	4,70
0,78	87,58	10,09	75,58	8,23	78,67	4,03	74,65	14,37	81,08	3,16
IC ₅₀	40,69		74,17		87,07		13,33		14,54	
CC ₃₀	180,00		120,00		191,00		183,00		186,00	
IC ₅₀ :CC ₃₀	0,23		0,62		0,46		0,07		0,08	
Kontrola	sulfadiazyna					sulfadiazyna + trimetoprim (5:1)				
IC ₅₀	1756,40					130,70				
CC ₃₀	1506,00					850,00				
IC ₅₀ :CC ₃₀	1,17					0,15				

Objaśnienia skrótów: **1** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza 4-HO-C₆H₄); **2** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza 4-HO-3-CH₃O-C₆H₃); **3** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza 3-C₂H₅O-4-HO-C₆H₃); **4** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza 3-Cl-4-HO-C₆H₃); **5** (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza 3-Br-4-HO-C₆H₃); nt – stężenie nie testowane ze względu na cytotoksyczność pochodnej.

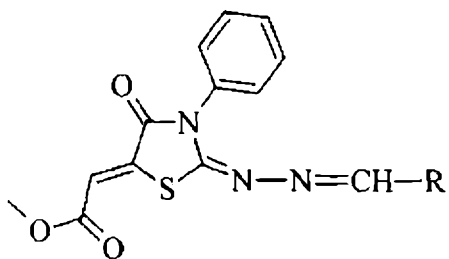
Wartości stężeń IC_{50} dla substancji wzorcowych (sulfadiazyna oraz sulfadiazyna + trimetoprim 5:1) wynosiły – 1756,40 $\mu\text{g/ml}$ (dla sulfadiazyny) oraz 130,70 $\mu\text{g/ml}$ (dla sulfadiazyny + trimetoprimu).

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że nowe pochodne kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego wykazują hamowanie proliferacji *T. gondii in vitro* przy stężeniu wyrażonym jako IC_{50} niższym niż przy stosowanych lekach wzorcowych – sulfadiazyna (1756,40 $\mu\text{g/ml}$) oraz synergistycznym działaniu sulfadiazyny + trimetoprimu (130,70 $\mu\text{g/ml}$). Ponadto związki 4 i 5 wykazują hamowanie proliferacji przy około 130 razy mniejszym wartości IC_{50} w stosunku do sulfadiazyny i ponad dziesięciokrotnie mniejszych w stosunku do synergistycznego działania sulfadiazyny z trimetoprimem.

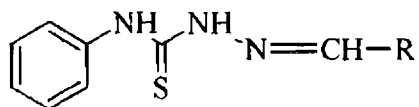
Zastrzeżenia patentowe

1. Pochodne kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze ogólnym 1 przedstawionym na rysunku, gdzie R oznacza 4-HO-C₆H₄, 4-HO-3-CH₃O-C₆H₃, 3-C₂H₅O-4-HO-C₆H₃, 3-Cl-4-HO-C₆H₃ i 3-Br-4-HO-C₆H₃.
2. Sposób otrzymywania pochodnych kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze 1, gdzie R oznacza 4-HO-C₆H₄, 4-HO-3-CH₃O-C₆H₃, 3-C₂H₅O-4-HO-C₆H₃, 3-Cl-4-HO-C₆H₃ i 3-Br-4-HO-C₆H₃, **znamienny tym**, że otrzymuje się ich w wyniku cyklokondensacji odpowiednich tiosemikarbazonów o wzorze 2, gdzie R ma wyżej podane znaczenie z acetylenodikarboksylationem dimetylu, w stosunku molowym 1:1, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika organicznego jak metanol, etanol korzystnie metanol.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że otrzymane związki krystalizuje się z lodowatego kwasu octowego.
4. Pochodne kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze ogólnym 1 przedstawionym na rysunku, gdzie R oznacza 4-HO-C₆H₄, 4-HO-3-CH₃O-C₆H₃, 3-C₂H₅O-4-HO-C₆H₃, 3-Cl-4-HO-C₆H₃ i 3-Br-4-HO-C₆H₃ do zastosowania jako lek w leczeniu toksoplazmozy.
5. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca substancję czynną w połączeniu z co najmniej 1 nośnikiem lub rozcieńczalnikiem farmaceutycznym, **znamienna tym**, że jako substancję aktywną zawiera pochodne kwasu (4-oksotiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze 1.

Rysunki



Wzór 1



Wzór 2