RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **236684**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **429177**

(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-(4-metoksyfenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3H-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:
08.02.2021 WUP 03/21

(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 236684 B1

Opis wynalazku

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

Znane są pochodne 1,2,4-triazolu, będące przedmiotem wielu 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.

Znane są z opisu wynalazku DE4219731 dimetylo-karbamoilo-1H-1,2,4-triazolowe pochodne, użyteczne do zwalczania owadów, roztoczy i nicieni na roślinach, nasionach i materiałach, a także w glebie.

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 nicieniobójczą 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-(4-metoksyfenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3-tionu o wzorze ogólnym 1 przedstawionym na rysunku, 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 WSI). Tak więc, otrzymany według wynalazku związek może znaleźć zastosowanie do wytwarzania nowych leków w terapii chorób pasożytniczych wywołanych przez nicienie.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób otrzymywania 4-(4-metoksyfenylo)-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 4-metoksyfenylu (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-metoksyfenylotiosemikarbazyd (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.

P r z y k ł a d:

Mieszaninę hydrazydu (0,01 mola; 1,87 g) i 4-metoksyfenyloizotiocyjanianu (0,01 mola; 1,65 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 3,05 g 1-(chinolin-6-oilo)-4-metoksyfenylotiosemikarbazydu (wzór 4) o temperaturze topnienia 217–219°C. Wydajność reakcji wynosiła 86,7%. 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 3,17 g (95% wydajności teoretycznej) 4-(4-metoksyfenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3-tionu (wzór 1) o temperaturze topnienia 205–207°C. Właściwą budowę związku oraz jego czystość potwierdzono na podstawie analizy widma ^1H NMR oraz MS.

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

Wydajność reakcji: 95%
Temperatura topienia: 205–207°C
^{1}H NMR (DMSO-d_6): 3,78 (s, 3H, CH_3); 7,01; 7,03 (d, 2H, 2CH, J = 10Hz); 7,31; 7,33 (d, 2H, 2CH, J = 10Hz); 7,64 (d, 1H, CH); 7,65 (d, 1H, CH); 7,96; 8,00 (m, 2H, 2CH); 8,40 (d, 1H, CH); 8,95 (s, 1H, CH); 14,22 (s, 1H, NH).
MS (m/z): 335,097 (M+1).

Przedmiotem wynalazku jest również zastosowanie nowego związku w leczeniu chorób pasożytniczych wywołanych przez nicienie.

Badanie wpływu 4-(4-metoksyfenylo)-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 (fig. 1).

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

T a b e l a

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-(4-metoksyfenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3-tion	0,3±0,027

Ocena wpływu 4-(4-metoksyfenylo)-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 WSI – 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.

P r z y k ł a d:

Do przygotowanej hodowli komórek prawidłowych WSI (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-I i następnie płytkę worteksowano. Po godzinnej inkubacji z odczynnikiem WST-I mierzono absorbancję przy długości fali 450 nm (długość fali referencyjnej 660 nm).

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

Zastrzeżenia patentowe

1. Związek 4-(4-metoksyfenylo)-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-(4-metoksyfenylo)-5-(chinolin-6-ylo)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazolo-3--tionu, **znamienny tym**, że hydrazyd kwasu chinolino-6-karboksylowego o wzorze ogólnym 2 poddaje się reakcji z izotiocyjanianem o wzorze ogólnym 3, 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 się a otrzymany w ten sposób produkt pośredni 1-(chinolin-6--oilo)-4-metoksyfenylotiosemikarbazyd o wzorze 4 poddaje się reakcji cyklizacji w wodnym roztworze wodorotlenku sodu, a po oziębieniu roztwór zadaje się wodnym roztworem kwasu korzystnie solnego, do otrzymania odczynu kwasowego, zaś strącony związek krystalizuje się z rozpuszczalnika, korzystnie z etanolu.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że czas reakcji wynosi 30 min.
4. Związek 4-(4-metoksyfenylo)-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

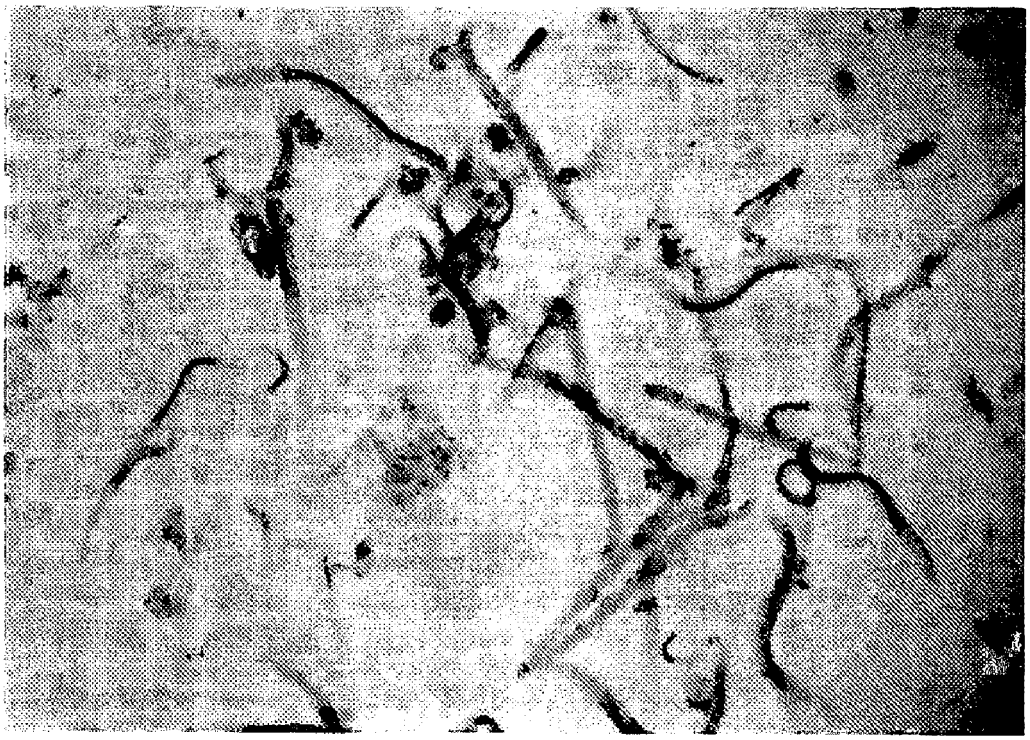
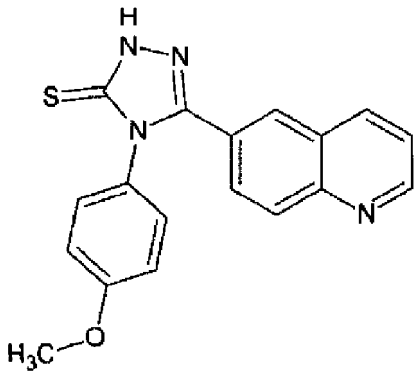
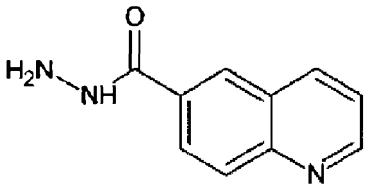


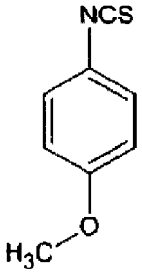
Fig. 1



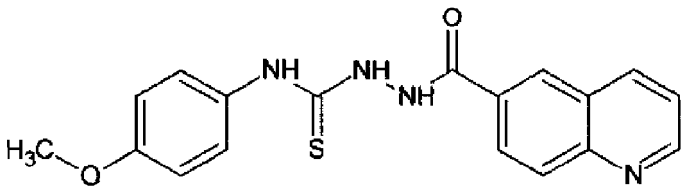
Wzór 1



Wzór 2



Wzór 3



Wzór 4