

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **233882**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **406596**

(22) Data zgłoszenia: **19.12.2013**

(51) Int.Cl.

A61K 31/381 (2006.01)

A61K 31/175 (2006.01)

C07D 333/38 (2006.01)

C07D 337/06 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(54) **Zastosowanie pochodnych 1-podstawionego 4-benzoilotiosemikarbazdu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

22.06.2015 BUP 13/15

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.12.2019 WUP 12/19

(73) Uprawniony z patentu:

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

UNIwersytet Łódzki, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

AGATA SIWEK, Łączna, PL

ALEKSANDRA STRZELCZYK, Łódź, PL

PAWEŁ STĄCZEK, Swędów, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Belz

PL 233882 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie pochodnych 1-podstawionego 4-benzotiosemikarbazydu, o wzorze przedstawionym na Fig. 1, gdzie R¹ oznacza podstawnik tiofen-2-yłowy lub 3-chlorofenyłowy, zaś R² oznacza atom wodoru lub chloru.

Pochodne 1-podstawionego 4-benzotiosemikarbazydu znane są z bazy związków chemicznych (Sci Finder) i posiadają następujące numery rejestracyjne: związek oznaczony jako Fig. 1a w treści naszego opisu nr CAS 448929-00-8, zaś związek oznaczony jako Fig. 1b związek oznaczony jako Fig. 1a nr CAS 648880-10-8.

Choroby zakaźne wywoływane przez drobnoustroje są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Od czasu odkrycia penicyliny oraz, w kolejnych latach, innych grup antybiotyków, ludziom wydawało się, że w znaczny sposób zapanowali nad infekcjami powodowanymi przez patogeny. Jednakże, w ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost szczepów bakteryjnych „wymykających” się spod kontroli człowieka i nadal wysoki poziom zakażeń trudnych do wyleczenia.

Antybiotyki są to naturalne, półsyntetyczne lub syntetyczne substancje o aktywności bakteriobójczej lub bakteriostatycznej. Ich nadużywanie oraz niewłaściwe stosowanie doprowadziło w ostatnich latach do znacznego wzrostu liczby szczepów wielolekoopornych i ich rozprzestrzeniania po całym świecie. W samej Unii Europejskiej zakażenia wywołane przez szczepy antybiotkooporne powodują 25000 zgonów i generują koszty leczenia przewyższające 1,5 miliarda euro rocznie (Gyles, *CVJ*, 2011, 52, 817). Stosowane do tej pory „klasyczne” antybiotyki wydają się być coraz mniej efektywne, dlatego większość badań powinna być skierowana na znalezienie nowych, syntetycznych chemioterapeutyków charakteryzujących się wysoką aktywnością antibakteryjną, szerokim spektrum działania oraz niską opornością wśród drobnoustrojów.

W wyniku prowadzonych badań okazało się, że pochodne 1-podstawionego 4-benzotiosemikarbazydu o wzorze ogólnym 1, gdzie R¹ oznacza podstawnik tiofen-2-yłowy lub 3-chlorofenyłowy, zaś R² oznacza atom wodoru lub chloru wykazują aktywność przeciwbakteryjną. Związki według wynalazku pokazano na rysunku i oznaczono jako wzory 1a i 1b. Związki te mogą być zastosowane jako lek do leczenia infekcji bakteryjnych.

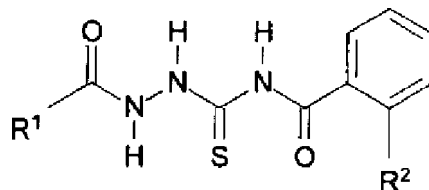
Szczególnie istotne w poszukiwaniu nowych chemioterapeutyków jest określenie odpowiedniego czynnika w komórce patogenu, na który by one działały. Często celem dla takich związków są enzymy zaangażowane w kluczowe procesy życiowe bakterii. Enzymy, takie jak topoizomerazy typu IIA (gyraza, topoizomeraza IV), stały się atrakcyjnym celem leków przeciwbakteryjnych, gdyż biorą udział w tak ważnych procesach jak synteza DNA, transkrypcja oraz utrzymanie odpowiedniej topologii chromosomu (Wang, *Nature* 2002, 3, 430). Wszystkie topoizomerazy IIA są dimerycznymi enzymami, które przecinają położone naprzeciwko siebie dwie nici helisy DNA, a następnie dokonują przeniesienia sąsiadującego fragmentu dupleksu przez uprzednio wygenerowaną przerwę, po czym odtwarzane jest przecięte wiązanie fosfodiestrowe. Enzymy te, wymagają do swojej aktywności jonów magnezu oraz cząsteczek ATP. Gyraza zbudowana jest z dwóch podjednostek GyrA i dwóch podjednostek GyrB, a topoizomeraza IV z odpowiadających im kolejno ParC i ParE. Podjednostki obu enzymów kodowane są przez oddzielne geny, odpowiednio *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* (Sissi i wsp., *Cellular and Molecular Life Science* 2010, 67, 2001). Zablockowanie aktywności gyrazy czy topoizomerazy IV jest ułatwione dzięki obecności wielu miejsc dla wiązania związku, co w rezultacie prowadzi do zahamowania wzrostu bakterii. Znaczące różnice w budowie strukturalnej topoizomeraz bakteryjnych w stosunku do enzymów człowieka umożliwiają syntezę cząsteczek wykazujących aktywność jedynie wobec komórek drobnoustrojów.

Topoizomerazy są znanym od dawna celem molekularnym dla trzech grup związków przeciwbakteryjnych, to jest chinolonów, cyklotialidyn i kumaryn (Maxwell, *Trends in Microbiology* 1997, 5, 104). Najszersze zastosowanie w terapii zakażeń znalazły fluorochinolony charakteryzujące się bardzo szerokim spektrum działania zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Jednakże, ich nadmierne lub niewłaściwe użycie doprowadziło do gwałtownego wzrostu oporności wśród drobnoustrojów, co wkrótce może postawić pod znakiem zapytania ich stosowanie w terapii. Szczególnie alarmujący wydaje się być fakt występowania szczepów wielolekoopornych. Nawet dwie trzecie izolowanych szczepów *Enterobacteriaceae* opornych na aminoglikozydy oraz produkujących β-laktamazy jest także opornych na fluorochinolony. Ponadto, fluorochinolony jak ciprofloksacyna czy lewofloksacyna prowadzą do selekcji metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus* (MRSA). Oporność na fluorochinolony jest również powszechna wśród szczepów *P. aeruginosa*. Głównymi mechanizmami nabywania oporności na tę grupę chemioterapeutyków są mutacje punktowe w genach kodujących podjednostki

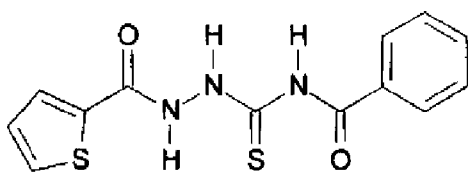
topoizomeraz, rozbudowany system pomp MDR (*multi-drug resistance*), nadekspresja systemu *acrAB-ToIC*, zmniejszona ekspresja genów topoizomeraz, odpowiedź SOS, a także oporność związana z plazmidami (Dalhoff, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2012, 1). Wszystkie te cechy sprawiają, iż niezbędne staje się poszukiwanie nowych związków, dla których cel molekularny stanowią bakteryjne topoizomerazy.

Z publikacji Eur. J. Med.Chem. 46 (2011) 5717-5726 oraz J. Mol. Model. 17 (2011) 2297-2303 znane są związki o szkielecie tiosemikarbazydowym o aktywności przeciwbakteryjnej, jednakże aktywność biologiczna tychże związków jest bardzo słaba, i często wielokrotnie niższa od aktywności stosowanych antybiotyków.

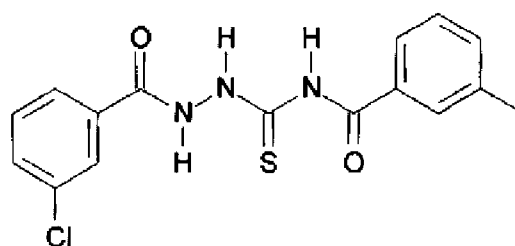
Przedmiotem wynalazku są pochodne 1-podstawionego 4-benzoilotiosemikarbazydu o wzorze ogólnym 1 do zastosowania w leczeniu zakażeń bakteryjnych.



W wyniku szeregu badań nieoczekiwanie okazało się, że pochodne 1-podstawionego 4-benzoilotiosemikarbazydu, które są przedmiotem wynalazku, wykazują zbliżony mechanizm działania do antybiotyków chinolonowych (miejscem docelowym aktywności przeciwbakteryjnej związków 1a i 1b są bakteryjne topoizomerazy typu IIA), lecz ich budowa chemiczna jest odmienna i stanowią nową generację związków, na które bakterie mogłyby wolniej nabywać oporność. Tego typu związki ze względu na aktywność przeciwbakteryjną oraz inhibicyjną wobec bakteryjnych topoizomeraz typu IIA mogą być w przyszłości wykorzystane do produkcji nowych chemioterapeutyków, stosowanych w terapii zakażeń bakteryjnych.



Wzór 1a



Wzór 1b

Badanie aktywności przeciwbakteryjnej

Do badania aktywności przeciwbakteryjnej wykorzystano osiem szczepów referencyjnych: *Escherichia coli* NCTC 8196, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6249, *Proteus vulgaris* ATCC 49990 oraz *Proteus mirabilis* ATCC 29906. Szczepy pochodziły z międzynarodowych kolekcji: ATCC (American Type Culture Collection) i NCTC (National Collection of Type Cultures). Badania prowadzono metodą krążkowo-dyfuzyjną oraz oznaczając wartość minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIC) zgodnie z zaleceniami CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute).

Część doświadczalna: w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej na podłożu Mueller-Hinton II agar (Becton Dickinson) rozprowadzono równomiernie zawiesinę drobnoustrojów o gęstości 0,5 w skali McFarland'a, a następnie nanoszono krążki bibułowe (Whatman 3) o średnicy 9 mm nasączone roztworami danego związku o stężeniu 500 μM (jako kontrola krążek nasączony rozpuszczalnikiem – DMSO o odpowiednim stężeniu). Nie wykazano wpływu rozpuszczalnika na wzrost drobnoustrojów. Płytki inkubowano 18 godzin w 37°C.

Wartości MIC (minimalnych stężeń hamujących wzrost bakterii) oznaczono metodą mikrorozcieńczeń badanego związku w zakresie stężeń 0,1–600 $\mu\text{g/mL}$, na 96-dołkowych płytkach titracyjnych

w podłożu płynnym Mueller-Hinton. Następnie na płytce nanoszono 5 μL zawiesiny drobnoustrojów o gęstości 0,5 w skali McFarland'a, całkowita objętość próby wynosiła 200 μL . Wyniki odczytywano po 18-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C w warunkach wytrząsania 110 rpm (w przypadku szczepu *Candida albicans* w temperaturze 28°C). Gęstość hodowli mierzono przy długości fali $\lambda=595$ nm. Jako wartość MIC przyjmowano stężenie, przy którym zauważono zahamowanie wzrostu drobnoustrojów. Powyższą procedurę powtarzano trzykrotnie.

Wnioski: Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że 4-benzoilo-1-(tiofen-2-ylokarbonylo)-tiosemikarbazyd charakteryzował się aktywnością przeciwbakteryjną wobec szczepów *S. aureus* ATCC 6538 (MIC 153 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *S. aureus* ATCC 29213 (MIC 76 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i *E. coli* NCTC 8196 (MIC 153 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Natomiast 1-(3-chlorobenzoilo)-4-(3-metylobenzoilo)-tiosemikarbazyd charakteryzował się aktywnością przeciwbakteryjną wobec następujących szczepów: *S. aureus* ATCC 6538 (MIC=10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *S. aureus* ATCC 29213 (MIC=10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oraz *S. epidermidis* (MIC=17 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Hamowanie aktywności gyrazy *E. coli* i *S. aureus*

Zasada reakcji: zrelaksowany plazmid pBR322 widoczny jest na żelu agarozowym w postaci kilku topoizomerów w zależności od stopnia relaksacji. Gyraza jest enzymem bakteryjnym zdolnym do wprowadzania superskrętów do cząsteczki DNA, co powoduje powstanie pojedynczego prążka na żelu, odpowiadającego populacji cząsteczek o wysokim negatywnym superskręceniu. Dlatego też możliwa jest prosta ocena aktywności tego enzymu, poprzez pomiar densytometryczny obrazów rozdziału elektroforetycznego cząsteczek plazmidowego DNA inkubowanych uprzednio w obecności gyrazy.

Część doświadczalna: badania prowadzono przy użyciu zestawu Gyrase Supercoiling Assay Kit (Inspiraais).

Wykonano 10 mM roztwór badanych związków 1a i 1b w DMSO, a następnie przygotowano ich rozcieńczenia 5, 10, 50, 100 μM w PBS (ang. phosphate buffered saline). Do każdej probówki o objętości 200 μL , umieszczonej na łaźni lodowej dodano kolejno; 5 μL związku o danym stężeniu, 5 μL zrelaksowanego plazmidu pBR322 (10 ng), 10 μL mieszaniny reakcyjnej zawierającej; 4 μL 5x stężonego buforu (supercoiling buffer), 2 μL gyrazy (1U) oraz 4 μL wody dejonizowanej do łącznej objętości próby równej 20 μL . Próby inkubowano przez 60 minut w temperaturze 37°C. Następnie reakcję zatrzymywano przez dodanie buforu z dodatkiem 10 mM EDTA i rozdzielano na 1% żelu agarozowym, przy napięciu 5 V/cm długości żelu. Żel barwiono bromkiem etydy (5 mg/mL) i wizualizowano w świetle UV. Aktywność badanego związku oceniono w oparciu o analizę przyrostu substratu, metodą pomiaru densytometrycznego w rosnących stężeniach inhibitora. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono dawkę inhibitora hamującą o 50% aktywność enzymu (IC_{50}).

Hamowanie aktywności topoizomerazy IV *E. coli* i *S. aureus*

Zasada reakcji: kinetoplastowy DNA (kDNA) pochodzi z komórek *Crithidia fasciculata*. Tworzące go kolisty cząsteczki DNA występują w postaci katenatów, przypominające złączone ze sobą ogniwa łańcucha. Topoizomeraza IV jest enzymem bakteryjnym zdolnym do wydajnego procesu dekatenuacji, w wyniku którego dochodzi do powstania niezależnych, pojedynczych, kolistych cząsteczek DNA. Ze względu na dużą masę cząsteczkową, kDNA nie opuszcza studzienek żelu, podczas gdy produkty dekatenuacji wykazują dużą ruchliwość elektroforetyczną. Dlatego też możliwa jest prosta ocena aktywności tego enzymu, poprzez pomiar densytometryczny obrazów rozdziału elektroforetycznego cząsteczek plazmidowego DNA poddanych inkubowanych uprzednio w obecności topoizomerazy IV.

Część doświadczalna: badania prowadzono przy użyciu zestawu Topoisomerase IV Decatenation Kit (Inspiraais).

Wykonano 10 mM roztwór badanych związków w DMSO, a następnie przygotowano ich rozcieńczenia: 5, 10, 50, 100 μM w PBS (Phosphate Buffered Saline). Do każdej probówki o objętości 200 μL , umieszczonej na łaźni lodowej dodano kolejno; 5 μL badanego związku o danym stężeniu, 5 μL kDNA (200 ng), 10 μL mieszaniny reakcyjnej zawierającej; 4 μL 5x stężonego buforu (decatenation buffer), 2 μL topoizomerazy IV (1U) oraz 4 μL wody dejonizowanej do łącznej objętości próby równej 20 μL . Próby inkubowano przez 60 minut w temperaturze 37°C. Następnie reakcję zatrzymywano przez dodanie buforu z dodatkiem 10 mM EDTA i rozdzielano na 1% żelu agarozowym, przy napięciu 5 V/cm długości żelu. Żel barwiono bromkiem etydy (5 mg/mL) i wizualizowano w świetle UV. Aktywność badanego związku oceniono w oparciu o analizę przyrostu substratu, metodą pomiaru densytometrycznego w rosnących stężeniach inhibitora. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono dawkę inhibitora hamującą o 50% aktywność enzymu (IC_{50}).

Wyniki: Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że 4-benzoilo-1-(tiofen-2-ylokarbonylo)-tiosemikarbazyd (związek 1a) jest inhibitorem gyrazy *E. coli* przy $IC_{50}=85 \mu M$ oraz gyrazy *S. aureus* przy $IC_{50}=84 \mu M$ (Fig. 2), zaś 1-(3-chlorobenzoilo)-4-(3-metylobenzoilo)-tiosemikarbazyd (związek 1b) jest inhibitorem topoizomerazy IV *S. aureus* przy $IC_{50}=89 \mu M$ (Fig. 3).

Badano także cytotoksyczność 4-benzoilo-1-(tiofen-2-ylokarbonylo)-tiosemikarbazydu (związek 1a) oraz 1-(3-chlorobenzoilo)-4-(3-metylobenzoilo)-tiosemikarbazydu (związek 1b). Nowy chemioterapeutyk, aby mógł być powszechnie stosowany, musi odznaczać się niską toksycznością w stosunku do komórek eukariotycznych.

Do badania właściwości cytotoksycznych wykorzystano dwie linie komórkowe: fibroblasty mysie L929 (ATCC-Catalog No. CCL-1™) oraz ludzkie komórki epitelialne z raka szyjki macicy HeLa (ATCC-Catalog No. CCL-2™). Badanie przeprowadzono w oparciu o test MTT.

Zasada reakcji: Test MTT oparty jest na przekształceniu żółtej soli MTT (bromku 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-ilo]-2,5-difenylo-tetrazoliowego) do fioletowego formazanu. Za tą konwersję odpowiedzialne są cząsteczki NADPH lub NADH produkowane przez enzym dehydrogenazę mitochondrialną, obecną jedynie w aktywnych metabolicznie komórkach. Stężenie fioletowego produktu jest wprost proporcjonalne do liczby żywych komórek i może być mierzone spektrofotometrycznie. Część doświadczalna: na płytkę 96-dołkową nanoszono 100 μL zawiesiny komórek (L929 lub HeLa) o gęstości wyjściowej $1 \times 10^4 / mL$, w podłożu IMDM. Następnie inkubowano je przez 24 godziny w 37°C (10% CO₂). Po inkubacji usuwano podłoże z komórek, dodawano 100 μL związku w zakresie stężeń 5–300 $\mu g / mL$ i inkubowano 24 godziny w 37°C (10% CO₂). Następnie ściągano podłoże, a do każdego dołka dodawano 50 μL MTT (1 mg/mL) i inkubowano 2 godziny w 37°C (10% CO₂). Po inkubacji, płytki wirowano (200 xg, 10 min), a kryształy formazanu rozpuszczano dodając 150 μL DMSO na studzienkę. Barwę produktu stabilizowano dodając 25 μL buforu glicynowego. Aktywność cytotoksyczną związków 1a i 1b badano dokonując pomiaru poziomu absorpcji przy długości fali $\lambda=550 \text{ nm}$. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono dawkę związku powodującą śmierć 50% komórek (LD₅₀).

Wnioski:

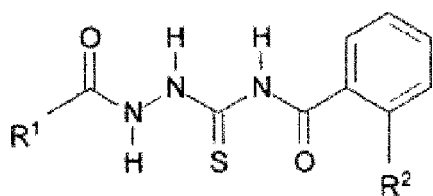
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że oba związki (1a i 1b) charakteryzowały się niską cytotoksycznością: 4-benzoilo-1-(tiofen-2-ylokarbonylo)-tiosemikarbazyd (związek 1a) charakteryzował się cytotoksycznością wobec komórek linii L929 przy LD₅₀>300 $\mu g / L$ oraz HeLa przy LD₅₀=300 $\mu g / L$, jak przedstawia Fig. 2 gdzie pokazano hamowanie aktywności gyrazy *E. coli* przez 4-benzoilo-1-(tiofen-2-ylokarbonylo)-tiosemikarbazyd (związek 1a).

Zaś 1-(3-chlorobenzoilo)-4-(3-metylobenzoilo)-tiosemikarbazyd (związek 1b) charakteryzował się cytotoksycznością wobec komórek linii L929 przy LD₅₀=166 $\mu g / L$ oraz HeLa przy LD₅₀=130 $\mu g / L$, co wykazano na fig. 3, gdzie przedstawiono hamowanie aktywności topoizomerazy IV *S. aureus* przez 1-(3-chlorobenzoilo)-4-(3-metylobenzoilo)-tiosemikarbazyd.

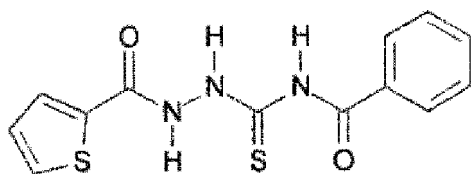
Zastrzeżenie patentowe

1. Pochodne 1-podstawionego 4-benzoioltiosemikarbazydu o wzorze ogólnym 1, gdzie R¹ oznacza podstawnik tiofen-2-yłowy lub 3-chlorofenyłowy, zaś R² oznacza atom wodoru lub chloru do zastosowania w leczeniu zakażeń bakteryjnych.

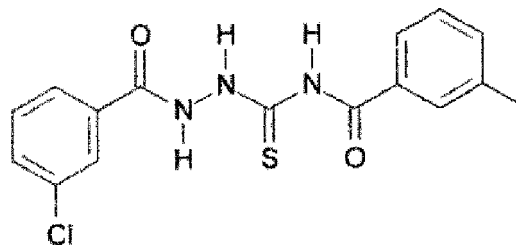
Rysunki



Wzór 1

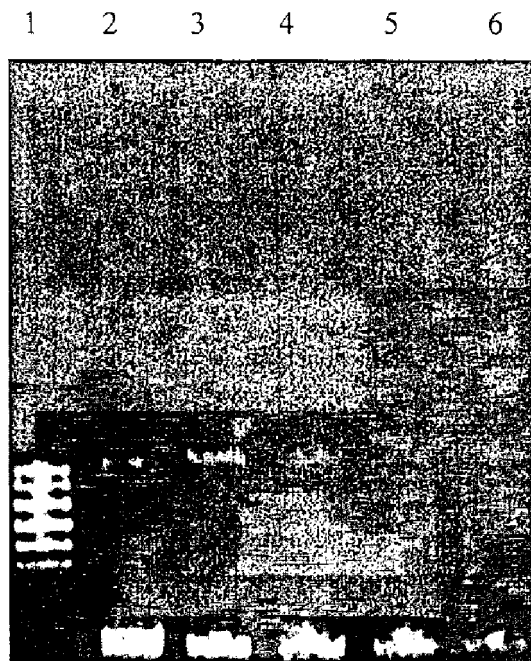


Wzór 1a



Wzór 1b

Fig. 1



1. zrelaksowany pBR322
2. 0 μM związku
3. 5 μM związku
4. 10 μM związku
5. 50 μM związku
6. 100 μM związku

Fig. 2



1. 5 μM związku
2. 10 μM związku
3. 50 μM związku
4. 100 μM związku

Fig. 3

