RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237552**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426156**

(22) Data zgłoszenia: **29.06.2018**

(51) Int.Cl.
C07D 233/58 (2006.01)
C07D 233/94 (2006.01)
C07D 233/95 (2006.01)
C07D 233/96 (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01)
A61K 31/4174 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

(54) **Pochodne 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu, sposób ich wytwarzania i zastosowanie medyczne**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
02.01.2020 BUP 01/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
04.05.2021 WUP 09/21

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE, Lublin, PL
UNIWERSYTET ŁÓDZKI, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
LIDIA WĘGLIŃSKA, Piotrków Kolonia, PL
MONIKA WUJEC, Lublin, PL
AGATA PANETH, Łęczna, PL
KATARZYNA DZITKO, Dobieszków, PL
ADRIAN BEKIER, Warszawa, PL
JUSTYNA GATKOWSKA, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Bełz

PL 237552 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są pochodne 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu o wzorze przedstawionym na rysunku, gdzie podstawnik jodowy przypisany jest odpowiednio pozycji *orto*, *meta* lub *para* do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia toksoplazmozy oraz sposób wytwarzania tych pochodnych.

Znane są z literatury pochodne 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu oraz ich cykliczne analogi tiadiazolowe i triazolowe (*Eur J Med Chem 2010, 45, 3685; Antimicrob Agents Chemother 2014, 58, 7583; Molecules 2014, 19, 9926*), które wykazują aktywność przeciwpasożytniczą wobec chorobotwórczego pasożyta *Toxoplasma gondii*. Ich aktywność biologiczna porównywalna jest lub korzystniejsza niż powszechnie stosowanego leku sulfadiazyny. Niestety, niektóre z nich okazały się być toksyczne. Z kolei Walchshofer i wsp. (Bioorg Med Chem 2000, 10, 871) opisali serię skondensowanych pochodnych furano-izochinoliny, które przy stężeniu 2 μg/mL wykazały aktywność inhibicyjną wobec *T. gondii* w zakresie procentowym od 56 do 96,5. Również pochodna fluorochinolonu wykazała istotną aktywność biologiczną, porównywalną do leku trowafloksacyny; niestety, nie został dla niej oszacowany efekt jej toksyczności (Bioorg Med Chem Lett 2004, 14, 2773). Seria pochodnych tiazolidynonu i tiosemikarbazonu była opisana przez Goes'a i wsp. (Bioogr Med Chem Lett 2005, 15, 2575). Niestety, spośród testowanych związków jedynie wybrane pochodne wykazały aktywność biologiczną wyższą od sulfadiazyny czy hydroksymocznika.

Celem wynalazku jest otrzymanie pochodnych tiosemikarbazydu, których aktywność przeciwpasożytniczą wobec chorobotwórczego pasożyta *Toxoplasma gondii* przewyższałaby aktywność znanych związków z tej grupy.

Toxoplasma gondii jest kosmopolitycznym pasożytem wywołującym toksoplazmozę u wszystkich gatunków ssaków, w tym ludzi i ptaków. Według Światowej Organizacji Zdrowia szacuje się, iż nawet 1/3 populacji ludzkiej uległa inwazji tym pasożytem.

W zależności od postaci choroby stosuje się różne schematy leczenia. Różne ośrodki zalecają też różny czas leczenia. Najczęściej stosuje się terapię skojarzoną lub podaje się poszczególne leki kolejno po sobie. Terapia skojarzona, polega na podawaniu pirymetaminy w skojarzeniu z sulfadiazyną z jednoczesną suplementacją kwasem folinowym (Toxoplasmosis. Med 2005, 33, 120; Drugs 1997, 53, 40; Antimicrob Agents Chemother 2008, 52, 1269; Drug Discovery Today 2005, 10, 121).

Wyjątek stanowią zarażone kobiety ciężarne poniżej 6-go m-ca ciąży, którym podaje się spiromycynę wykazującą wysokie powinowactwo do łożyska, ale niestety słabe działanie protekcyjne (Zdrowie Publiczne 2010, 120, 80). W terapii toksoplazmozy ocznej, oprócz standardowego połączenia pirymetaminy z sulfonamidami, stosowane są również trimetoprim z sulfametoksazolem, atowakwon, azytromycyna oraz przeciwzapalne leki steroidowe (Int J Med Sci 2009, 6, 140).

Niestety, tradycyjne leczenie toksoplazmozy niesie ze sobą liczne skutki uboczne. W trakcie leczenia mogą wystąpić zarówno objawy hematologiczne (niedokrwistość megaloblastyczna, małopłytkowość, leukopenia), jak i zaburzenia neurologiczne (bóle i zawroty głowy, niezborność, napady drgawek, bezsenność i depresja), czy też zmiany na skórze i błonach śluzowych (zapalenia skóry, nieprawidłowa pigmentacja, osutka, zapalenie języka). Może też wystąpić: suchość w jamie ustnej, zaburzenia żołądkowo-jelitowe, gorączka, uszkodzenie szpiku kostnego, teratogenność, kamica nerkowa, oporność (Int J Med Sci 2009, 6, 140; Wiad Parazytol 2011, 57, 87; Mutat Res 1998, 415, 69; Toxicol Lett 1982, 10, 51; Antimicrob Agents Chemother 2008, 52, 1269; Drugs 2004, 64, 245; Ann Allergy Asthma Immunol 2008, 100, 91).

Jak jasno wynika z powyższych faktów, zastosowanie klasycznych leków do leczenia toksoplazmozy łączy się ze znacznym ryzykiem. Ponadto, ze względu na wąski zakres terapeutyczny pirymetaminy (0,08–0,6 μg/mL krwi) trudno jest ustalić właściwą dawkę leku. Jak donosi Lipka i wsp. (Wiad Parazytol 2011, 57, 57), tylko u 58,3% leczonych dzieci odnotowano odpowiednie poziomy pirymetaminy w surowicach, zaś 29,2% wykazywało wartość niższą, niż sugerowana dawka lecznicza, a 12,5% badanych wybiegało ponad tą normę. Istnieje zatem rzeczywiste zapotrzebowanie na opracowanie nowych leków, zdolnych do skutecznego leczenia toksoplazmozy, a pozbawionych działania ubocznego omówionego powyżej.

Związki według wynalazku stanowią nowe pochodne 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilo)tiosemikarbazydu o wzorze przedstawionym na rysunku, gdzie podstawnik jodowy przypisany jest odpowiednio pozycji *orto*, *meta* lub *para*.

Związki według wynalazku o wzorze przedstawionym na rysunku do zastosowania w leczeniu toksoplazmozy.

Zastosowanie związków według wynalazku do wytwarzania preparatu przeznaczonego do leczenia toksoplazmozy.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób otrzymywania pochodnych 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilo)tiosemikarbazydu polegający na tym, że hydrazyd kwasu 4-metylo-5-imidazolo-5-karboksylowego poddaje się reakcji z izotiocyjanianem w stosunku molowym 1:1. Reakcję prowadzi się w środowisku bezwodnego etanolu w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, korzystnie gdy czas reakcji wynosi od 10 do 30 min. Postęp reakcji monitoruje się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Po otrzymaniu produktu zawartość kolbki chłodzi się, wytrącony osad odsącza, a po wysuszeniu krystalizuje z 96% etanolu.

Związki według wynalazku wykazują silne hamowanie proliferacji pierwotniaka *T. gondii in vitro* oraz brak znaczącej cytotoksyczności względem komórek żywicielskich. Tak więc, otrzymane według wynalazku związki mogą znaleźć zastosowanie do wytwarzania nowych leków w terapii toksoplazmozy.

Uzyskane wyniki wskazują na silną aktywność przeciwpasożytniczą wobec *T. gondii* pochodnych będących przedmiotem wynalazku, co istotne w zakresie stężeń nietoksycznych. Aktywność przeciwpasożytniczą związków będących przedmiotem wynalazku jest wielokrotnie wyższa od aktywności obecnie stosowanego leku sulfadiazyny. Otrzymane dane pozwalają oczekiwać, że badane związki mogą stanowić związki wyjściowe w poszukiwaniu nowych leków do walki z toksoplazmą.

Poniżej zamieszczono wyniki badań aktywności biologicznej nowych związków.

Ocena wpływu pochodnych 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazolo-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu na żywotność komórek linii L929-test MTT

Zasada testu MTT

Oznaczenie żywotności komórek linii L929 wykonano przy użyciu testu MTT, zgodnie z Normą Europejską: ISO I0993-5:2009(E), *Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Test MTT oparty jest na przekształceniu żółtej soli MTT (bromku 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-ilo]--2,5-difenylotetrazoliowego) do fioletowo-niebieskiego, nierozpuszczalnego formazanu. Za tę konwersję odpowiedzialne są NADPH lub NADH, produkowane przez enzym dehydrogenazę mitochondrialną, obecną w aktywnych metabolicznie komórkach. Stężenie niebieskiego produktu jest wprost proporcjonalne do liczby żywych komórek w próbce i może być mierzone spektrofotometrycznie.

Część doświadczalna

Na płytkę 96-dołkową (Nunc^{TC}), nanoszono komórki L929 - ATTC-Catalog No. CCL-1™ o gęstości 1x10^4/100 μL/dołek, zawieszone w podłożu hodowlanym IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium – CytoGen) i inkubowano je (37°C, 10% CO_2) przez 24 h. Po inkubacji usuwano podłoże znad komórek i dodawano po 100 μL odpowiednich rozcieńczeń badanego związku 1, 2 i 3 (0,0; 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,50; 125,00) oraz dla porównania sulfadiazynę (Sigma), których końcowe stężenia wynosiły: 0,0; 5,0; 25,0; 50,0; 125,0; 500,0; 1250,0; 2500,0 μg/mL. Oceniano także wpływ rozpuszczalnika na żywotność komórek, w końcowym stężeniu w mikrohodowli: 0,05; 0,10; 0,25; 0,5; 1; 2% DMSO. Kontrolę stanowiły komórki hodowane w pełnym podłożu hodowlanym IMDM.

Po dodaniu ww. związków komórki inkubowano 24 h w 37°C, 10% CO_2. Po tym czasie hodowle obserwowano pod mikroskopem i wykonywano zdjęcia. Następnie znad monolayeru ściągano podłoże, a do każdego dołka na płytce dodawano po 50 μL MTT (C = 1 mg/mL, Sigma) i inkubowano (37°C i 5% CO_2). Po 2 h płytki wirowano (200xg, 10 min), a kryształy formazanu rozpuszczano dodając po 150 μL DMSO/studzienkę. Barwę produktu stabilizowano dodając po 25 μL buforu glicynowego. Poziom absorbancji mierzono za pomocą czytnika ELISA, przy długości fali λ = 550 nm.

Poziom istotności p wyznaczono nieparametrycznym testem U Manna-Whitney'a za pomocą programu SigmaStat. Wyniki przy poziomie istotności $p<0,05$ uznano za znamienne statystycznie. Wartości CC_{30} (*cytotoxic concentration 30* – stężenie powodujące efekt cytotoksyczny dla 30% badanych komórek) wyznaczono na podstawie analizy zależności zastosowanych stężeń badanego związku i stopnia przeżywalności komórek (Statistica 10 PL).

Wyniki

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

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

T. gondii należy do obligatoryjnych pasożytów wewnątrzkomórkowych, a jego namnażanie zachodzi tylko w żywych komórkach żywicielskich. Z tego względu do badania wpływu związków na wewnątrzkomórkowe namnażanie się pierwotniaka wybrano tylko te stężenia, przy których żywotność komórek linii L929 wynosiła ≥70%.

Według normy ISO 109935:2009 (E), dany związek można uznać za nietoksyczny dla komórek, jeśli nie powoduje on spadku żywotności komórek poniżej 70%, dlatego też wyznaczono wartość CC_{30} odczytując ją z krzywej zależności przeżywania komórek [%] od zastosowanych stężeń związków oraz sulfadiazyny [μg/mL], wykreślonej na podstawie danych zamieszczonych odpowiednio w Tabeli 1 i Tabeli. 2.

Ze względu na konieczność rozpuszczania związków w DMSO, w pierwszym etapie doświadczenia zbadano wpływ zastosowanych stężeń rozpuszczalnika na żywotność komórek linii L929. Ustalono, iż stężenia DMSO użyte w doświadczeniu nie mają istotnego wpływu na żywotność i morfologię komórek linii L929 (Tabela 1).

T a b e l a 1. Przeżywalność komórek [%] linii L929 w poszczególnych stężeniach DMSO ± odchylenie standardowe

Stężenie DMSO [%]	2,0	1,0	0,5	0,25	0,10	0,05
komórki żywe [%]	69,23* ±4,34	82,26 ±10,02	89,89 ±9,25	90,36 ±5,99	92,56 ±8,02	95,67 ±4,59

* $p<0,05$; żywotność komórek poniżej 70%

Równolegle do testu MTT prowadzono obserwację mikroskopową mikrohodowli inkubowanych z różnymi stężeniami DMSO. Obserwacja komórek pod mikroskopem, potwierdziła brak zmian cytopatycznych w hodowlach ze stężeniem DMSO do 1%. Oceniono także wpływ leku powszechnie stosowanego w leczeniu toksoplazmozy – sulfadiazyny na żywotność komórek linii L929. Ustalono, iż dawka CC_{30} w przypadku sulfadiazyny wynosi >2500 μg/mL (Tabela 2). Podczas analizy mikroskopowej, nie zaobserwowano zmian w morfologii komórek inkubowanych z różnymi stężeniami komercyjnie dostępnego leku.

T a b e l a 2. Przeżywalność komórek [%] linii L929 w poszczególnych stężeniach sulfadiazyny ± odchylenie standardowe

Stężenie sulfadiazyny [μg/mL]	2500,0	1250,0	500,0	125,0	50,0	25,0	5,0	CC_{30} [μg/mL]
komórki żywe [%]	81,01 ±5,46	83,28 ±2,56	94,59 ±3,59	95,34 ±4,79	94,59 ±4,56	91,99 ±3,21	81,29 ±4,13	>2500

Przebadano wpływ związków na żywotność komórek linii L929. Wyznaczono stężenia CC_{30} dla linii komórkowej L929 (Tabela 3) i wykonano zdjęcia hodowli komórkowej z dodatkiem wyznaczonego stężenia badanego związku (1, 2, 3).

T a b e l a 3. Przeżywalność komórek [%] linii L929 w zakresie stężeń 1,4-dipodstawionych pochodnych tiosemikarbazydu 1-125 μg/mL ± odchylenie standardowe

związek	Stężenie związku [μg/mL]						CC_{30} [μg/mL]
	125,00	62,50	31,25	15,63	7,81	3,91	
1	75,82 ±3,69	84,89 ±4,89	77,06 ±3,26	85,26 ±5,89	85,47 ±2,48	89,69 ±2,59	>125
2	94,67 ±8,02	96,98 ±4,24	84,29 ±8,02	83,66± 3,89	88,11 ±5,23	87,78 ±2,99	
3	97,36 ±3,84	93,74 ±4,44	92,57 ±4,02	97,47 ±4,69	93,84 ±5,62	99,76 ±2,52	

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że pochodne 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu (1, 2, 3) nie wykazują cytotoksyczności w zakresie stężeń 0,0––125 μg/mL. Badane pochodne tiosemikarbazydu powyżej stężenia 125 μg/mL wytrącają się w postaci kryształków w trakcie prowadzonego eksperymentu, co uniemożliwia dokładne określenie wartości CC_{30}.

Badanie wpływu pochodnych 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu na namnażanie się *T. gondii* w komórkach linii L929 (test inkorporacji trytowanego uracylu).

Wpływ pochodnych 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu (1, 2, 3) na wewnątrzkomórkowe namnażanie się pierwotniaka T. gondii szczepu BK w komórkach linii L929 przebadano za pomocą testu wbudowywania uracylu znakowanego trytem. Kontrolę doświadczenia stanowiły komórki fibroblastów mysich zarażone pierwotniakiem i inkubowane w podłożu hodowlanym bez leku (zmierzoną wartość proliferacji przyjęto jako 100%). Wyznaczono wartość IC_{50} (inhibitory concentration 50 – stężenie powodujące zahamowanie namnażania się pierwotniaka o 50%).

Zasada reakcji

Test inkorporacji ^{3}H-uracylu polega na pomiarze poziomu radioaktywności pierwiastka – trytu (^{3}H), który wraz z uracylem jest wychwytywany i wbudowywany do łańcucha RNA *T. gondii*. Mniejsza liczba zliczeń przez czytnik scyntylacyjny w porównaniu do kontroli świadczy o hamowaniu namnażania się pierwotniaka w mikrohodowli.

Część doświadczalna

24-godzinną hodowlę komórek L929 (1x 10^4/50 μL/ studzienkę) zarażono tachyzoitami *T. gondii* szczepu BK w stosunku 1 komórka żywicielska: 10 komórek pierwotniaka (1x10^5/50 μL/ studzienkę). Mikrohodowlę inkubowano 2 h w 37°C, 10% CO_2, umożliwiając pierwotniakowi wniknięcie do komórek i utworzenie wakuoli pasożytniczej. Po tym czasie dodano po 100 μL: i) badanego związku (1, 2 lub 3) uzyskując końcowe stężenia: 0,0; 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,50; 125,0 μg/mL, a do równoległych mikrohodowli ii) DMSO (0,0; 0,10; 0,5; 1,0; 2,0) i iii) sulfadiazynę,: 0,0; 5,0; 25,0; 50,0; 125,0; 500,0; 1250,0; 2500,0 pg/mL. Płytki inkubowano 48 h (37°C, 10% CO_2), a następnie do każdej studzienki dodawano ^{3}H-uracylu (1 μCi/ 50 μL), po czym kontynuowano inkubację przez 24 h w warunkach jw. Po tym czasie płytki zamrożono w -20°C. Przed przystąpieniem do odczytu testu płytkę, rozmrażano, a zawartość studzienek zbierano na bibułę (PrintedFiltermat A), którą pozostawiano do wyschnięcia. Do pomiaru poziomu promieniowania β użyto czytnika scyntylacyjnego (WALLAC), uprzednio nasączając bibuły płynem scyntylacyjnym (BetaplateScint, PerkinElmer).

Poziom istotności p wyznaczono nieparametrycznym testem U Manna-Whitney'a za pomocą programu SigmaStat. Wyniki przy poziomie istotności $p<0,05$ uznano za znamienne statystycznie. Wartości IC_{50} wyznaczono na podstawie analizy zależności zastosowanych stężeń badanego związku i stopnia wewnątrzkomórkowego namnażania się pasożyta (EDSOplus v 1.0).

Wyniki

W pierwszym etapie doświadczenia przebadano wpływ rozpuszczalnika na proliferację *T. gondii* w komórkach linii L929 (Tabela 4).

T a b e l a 4. Intensywność proliferacji T. gondii w komórkach linii L929 hodowanych w obecności różnych stężeń DMSO ± odchylenie standardowe

Stężenie DMSO [%]	2	1	0,5	0,25	0,10	0,5
proliferacja pierwotniaka [%]	66,32* ±9,52	70,31 ±8,56	99,59 ±9,36	101,23 ±5,89	99,69 ±8,68	99,32 ±7,23

* $p<0,05$

Spadek namnażania pierwotniaka zaobserwowano jedynie w stężeniu 2% DMSO. Kontrolę dodatnią doświadczeń nad wpływem badanego związku stanowiła mikrohodowla z sulfadiazyną, lekiem od dawna stosowanym w terapii toksoplazmozy (Tabela 5). W tabeli nr 5 dla porównania aktywności związków według wynalazku ze znanym i stosowanym lekiem zamieszczono dane o jego działaniu przeciwko *T. gondii*, zaś w tabeli nr 6 wskazano dane z aktywności związków według wynalazku. Jak wynika z danych związki według wynalazku wykazują wyższą skuteczność niż znany lek.

T a b e l a 5. Intensywność proliferacji [%] T. gondii w komórkach linii L929 hodowanych w obecności sulfadiazyny – komercyjnego leku stosowanego w terapii toksoplazmozy

* $p<0,05$

Stężenie sulfadiazyny [μg/mL]	2500	1250	500	250	125	50	25	5	IC_{50} [μg/mL]
Proliferacja pierwotniaka [%]	*44,95** ±9,42	*44,44** ±8,94	*54,10** ±8,29	*59,58*± 11,26	*62,18** ±6,29	*62,53** ±11,65	*81,88* ±11,65	*93,98* ±11,65	773,97

Oceniono wpływ pochodnych 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu (Tabela 6) na namnażanie się pierwotniaka w hodowlach komórek linii L929. Wartości stężeń IC_{50} odczytano z wykresów wykonanych na podstawie danych zamieszczonych w ww. tabeli.

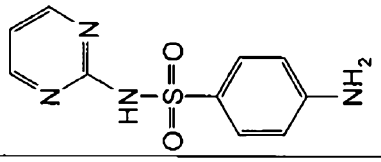
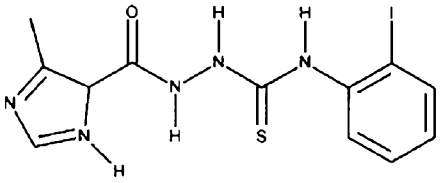
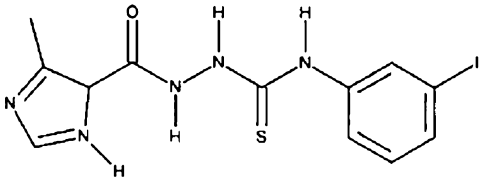
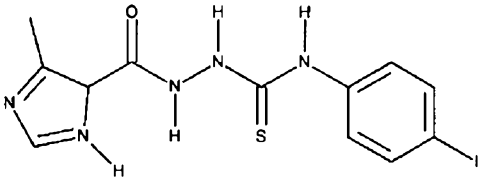
*T a b e l a 6. Intensywność proliferacji [%] T. gondii w komórkach linii L929 hodowanych w obecności pochodnych 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilo*karbonylo*)tiosemikarbazydu w zakresie stężeń 1-100 μg/mL ± odchylenie standardowe*

związek	Stężenie [μg/mL] 100	50	25	10	5	1	IC_{50} [μg/mL]
1	31,53* ±6,66	39,24* ±2,36	39,65* ±3,32	59,97* ±8,21	74,10 ±6,38	82,94 ±5,91	19,74
2	10,89* ±5,32	20,60* ±5,67	26,18* ±4,61	28,71* ±9,23	58,71* ±6,39	104,82 ±6,61	8,90
3	25,48* ±3,71	25,92* ±5,62	26,36* ±8,28	43,63* ±9,01	47,08* ±4,92	103,08 ±7,55	10,16

*$p<0,05$

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że pochodne 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu (1, 2 i 3) wykazują hamowanie proliferacji *T. gondii* przy stężeniu wyrażonym jako IC_{50} niższym (odpowiednio: 19,74; 8,90, i 10,16 μg/mL) niż stosowanego leku sulfadiazyny (IC_{50} 773,97 μg/mL) (Tabela 7).

T a b e l a 7. Struktura związków i IC_{50}

Struktura związku	Nazwa związku	IC_{50} [μg/mL]
	sulfadiazyna	773,97
	1	19,74 39× niższa dawka
	2	8,90 86,9× niższa dawka
	3	10,16 76,2× niższa dawka

P r z y k ł a d

Mieszaninę hydrazydu 0,01 mola; 1,40 g i 2-jodofenyloizotiocyjanianu 0,01 mola; 2,61 g ogrzewano w kolbce okrągłodennej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Czas reakcji wynosił 30 min. Po utworzeniu produktu zawartość kolbki ochłodzono, wytrącony osad odsączono, a po wysuszeniu przekrystalizowano z 96% etanolu. Otrzymano 3,73 g (93,02% wydajności teoretycznej, Tabela 8) 4-(2-jodofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu o temperaturze topnienia 220°C (Tabela 9). Właściwą budowę związku oraz jego czystość, potwierdzono na podstawie analizy widm ^1H NMR (Tabela 9).

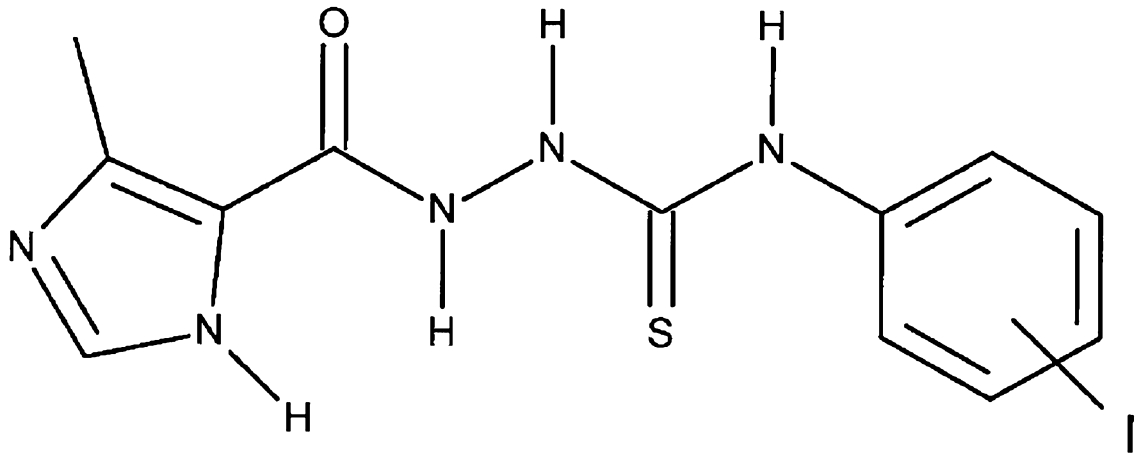
T a b e l a 8. Czas i wydajność reakcji otrzymywania pochodnych 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu

nr związku	nazwa związku	czas reakcji [min]	wydajność [g = %]
1	4-(2-jodofenylo)-1-(4-metyloimidazolo-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazyd	30	3,73 g = 93,02%
2	4-(3-jodofenylo)-1-(4-metyloimidazolo-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazyd	10	3,64 g = 90,78%
3	4-(4-jodofenylo)-1-(4-metyloimidazolo-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazyd	20	3,82 g = 95,26%

*T a b e l a 9. Parametry, fizykochemiczne pochodnych 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilo*karbonylo*)tiosemikarbazydu*

nazwa związku	parametry fizykochemiczne	
	^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ (ppm):	temp. top. [°C]
4-(2-jodofenylo)-1-(4-metyloimidazolo-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazyd	2.458 (s, 3H); 6.952-7.008 (t, 1H); 7.351-7.406 (t, 1H); 7.598-7.624 (m, 2H); 7.833-7.859 (d, 1H); 9.242 (s, 1H); 9.693 (s, 1H); 9.852 (s, 1H); 12.412 (s, 1H)	220-222
4-(3-jodofenylo)-1-(4-metyloimidazolo-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazyd	2.451 (s, 3H); 7.077-7.131 (t, 1H); 7.453-7.480 (d, 1H); 7.552-7.580 (d, 1H); 7.623 (s, 1H); 7.925 (s, 1H); 9.652 (s, 2H); 9.771 (s, 1H); 12.396 (s, 1H)	210-212
4-(4-jodofenylo)-1-(4-metyloimidazolo-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazyd	2.446 (s, 3H); 7.340-7.366 (d, 2H) 7.597-7.652 (d, 3H); 9.621 (s, 2H) 9.771 (s, 1H); 9.852 (s, 1H); 12.398 (s, 1H)	225-227

Zastrzeżenia patentowe

1. Pochodne 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu, o wzorze ogólnym przedstawionym na rysunku, gdzie podstawnik jodowy przypisany jest odpowiednio pozycji *orto*, *meta* lub *para*.
2. Sposób otrzymywania nowych pochodnych 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu określonym w zastrz. 1, **znamienny tym**, że hydrazyd kwasu 4-metylo-5-imidazolo-5-karboksylowego poddaje się reakcji z izotiocyjanianem, przy czym reakcję prowadzi się w stosunku molowym 1:1, reakcję prowadzi się w środowisku bezwodnego etanolu w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, a otrzymany produkt chłodzi się, wytrącony osad odsącza się, a po wysuszeniu krystalizuje się korzystnie z 96% etanolu.
3. Sposób według zastrz., **znamienny tym**, że czas reakcji wynosi od 10 do 30 minut.
4. Pochodne 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu, o wzorze ogólnym przedstawionym na rysunku, gdzie podstawnik jodowy przypisany jest odpowiednio pozycji *orto*, *meta* lub *para* do zastosowania w leczeniu toksoplazmozy.
5. Zastosowanie pochodnych 4-jodofenylo-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu, o wzorze ogólnym przedstawionym na rysunku, gdzie podstawnik jodowy przypisany jest odpowiednio pozycji *orto*, *meta* lub *para* do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia toksoplazmozy.

Rysunek