

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **237553**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426157**

(22) Data zgłoszenia: **29.06.2018**

(51) Int.Cl.

A61K 31/4164 (2006.01)

A61K 31/4174 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

C07D 233/96 (2006.01)

(54)

Zastosowanie medyczne
4-(2-fluorofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilo-kar-bonylo)tiosemikarbazydu

(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

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Bełz

PL 237553 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie medyczne 4-(2-fluorofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilo-karbonaylo)tiosemikarbazydu o wzorze ogólnym przedstawionym na rysunku zwłaszcza do leczenia toksoplazmozy.

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 przeciw pasożytniczą 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. (*Bioorg Med Chem Lett* 2005, 15, 2575). Niestety, spośród testowanych związków jedynie wybrane pochodne wykazały aktywność biologiczną wyższą od sulfadiazyny czy hydroksymocznika.

Celem wynalazku było określenie pochodnych tiosemikarbazydu, które wykazywałyby wysoką aktywność przeciw pasożytniczą wobec chorobotwórczego pasożyta *Toxoplasma gonidii*, która 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 Polsce zakażenie występuje u 50–60% osób (Int J Parasitol 2000, 30, 1217; *Mikrobiol Med* 1996, 1, 14; Ann Agric Environ Med 2001, 8, 25). Jednakże znacznej liczby zakażeń nie odnotowuje się, gdyż toksoplazmoza u zdrowych ludzi przebiega zwykle bezobjawowo, w większości przypadków w sposób niewymagający zastosowania jakiejkolwiek terapii, bądź interwencji medycznej. Źródłem zarażenia jest najczęściej żywność: surowe bądź niedogotowane mięso, warzywa, owoce i woda (droga horyzontalna) (*Clin Infect Dis* 2007, 45, 88; *Adv Food Nutr Res* 2010, 60, 1; *Epidemiol Infect* 1999, 122, 305). Kolejna droga zarażenia tzw. wertykalna ma miejsce u kobiet ciężarnych, w wyniku której może dojść do przekazywania pierwotniaków z matki na rozwijający się płód (toksoplazmoza wrodzona) (*Parasitology* 2011, 9, 1; *J Pediatr Health Care* 2011, 25, 355).

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 spiramycynę 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 (ból i zawroty głowy, niezdolność, 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, żółdkowo-jelitowe, gorączka, uszkodzenie szpiku kostnego, teratogenność, kamica nerkowa, oporność (Int J Med Sci 2009, 6, 140; *Wiad Parazytol* 2011, 57, 87; *Mutat Mes* 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, 87), 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.

4-(2-fluorofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilo)tiosemikarbazyd według wynalazku do zastosowania w leczeniu toksoplazmozy.

Jak wykazano, na podstawie badań, 4-(2-fluorofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilo)tiosemikarbazyd o wzorze przedstawionym na rysunku wykazuje aktywność przydatną do leczenia toksoplazmozy. Związek ten wykazuje silne hamowanie proliferacji pierwotniaka *T. gondii in vitro* oraz brak znaczącej cytotoksyczności względem komórek żywicielskich. Tak więc, związek ten może znaleźć zastosowanie do wytwarzania nowych leków w terapii toksoplazmozy.

Poniżej zamieszczono opis badań oraz wyniki aktywności związku o zastosowaniu według wynalazku.

Ocena wpływu 4-(2-fluorofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilo)karbonylo)tiosemikarbazynu 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 10993-5:2009(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-difenylo-4-tetrazoliowego) 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 – ATCC-Catalog No. CCL-1TM o gęstości $1 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ dołek, zawieszone w podłożu hodowlanym IMDM (Isocove's Modified Dulbecco's Medium – CytoGen) i inkubowano je (37°C , 10% CO_2) przez 24 h. Po inkubacji usuwano podłoże z komórek i dodawano po $100 \mu\text{L}$ odpowiednich rozcieńczeń badanego związku (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 $\mu\text{g/mL}$. 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 z nadmonolayeru ściągano podłoże, a do każdego dołka na płytce dodawano po $50 \mu\text{L}$ MTT ($C = 1 \text{ mg/mL}$, Sigma) i inkubowano (37°C i 5% CO_2). Po 2 h płytki wirowano (200 x g, 10 min), a kryształy formazanu rozpuszczano dodając po $150 \mu\text{L}$ DMSO/studzienkę. Barwę produktu stabilizowano dodając po $25 \mu\text{L}$ buforu glicynowego. Poziom absorpcji mierzono za pomocą czytnika ELISA, przy długości fali $\lambda = 550 \text{ nm}$.

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 testowanego związku na żywotność komórek żywicielskich linii L929 przy pomocy testu MTT. Za kontrolę przyjęto hodowle komórkowe inkubowane w podłożu IMDM, bez dodatku badanego związku i rozpuszczalnika (DMSO). Żywotność komórek obliczono według wzoru:

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

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

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 związku oraz sulfadiazyny [$\mu\text{g/mL}$], wykreślonej na podstawie danych zamieszczonych odpowiednio w Tabeli 1 i Tabeli 2.

Ze względu na konieczność rozpuszczania związku 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).

Tabela 1. Przeżywalność komórek [%] linii L929 w poszczególnych stężeniach DMSO $\pm$ odchylenie standardowe

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

* $p < 0,05$; 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 $> 2500 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). Podczas analizy mikroskopowej, nie zaobserwowano zmian w morfologii komórek inkubowanych z różnymi stężeniami komercyjnie dostępnego leku.

Tabela 2. Przeżywalność komórek [%] linii L929 w poszczególnych stężeniach sulfadiazyny $\pm$ odchylenie standardowe

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

Przebadano wpływ związku 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.

Tabela 3. Przeżywalność komórek [%] linii L929 w zakresie stężeń 4-(2-fluorofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilo)tiosemikarbazydu 1–125 $\mu\text{g/mL}$ $\pm$ odchylenie standardowe

związek	Stężenie związku [$\mu\text{g/mL}$]						CC_{30} [$\mu\text{g/mL}$]
	125,00	62,50	31,25	15,63	7,81	3,91	
1	77,69 $\pm 4,56$	79,75 $\pm 3,61$	84,33 $\pm 3,59$	93,60 $\pm 3,56$	91,07 $\pm 3,48$	93,13 $\pm 5,04$	> 125

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że 4-(2-fluorofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazyd nie wykazuje cytotoksyczności w zakresie stężeń 0,0–125 $\mu\text{g/mL}$. Badany związek powyżej stężenia 125 $\mu\text{g/mL}$ wytrąca się w postaci kryształków w trakcie prowadzonego eksperymentu, co uniemożliwia dokładne określenie wartości CC_{30} .

Badanie wpływu 4-(2-fluorofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilokarbonylo)tiosemikarbazydu na namnażanie się *T. gondii* w komórkach linii L929 (test inkorporacji trytowanego uracylu).

Wpływ 4-(2-fluorofenyl)-1-(4-metyloimidazol-5-yl)tiosemikarbazydu 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 (zmierzona wartość proliferacji przyjęto jako 100%). Wyznaczono wartość IC_{50} (*inhibitory concentration 50* – stężenie powodujące zahamowanie namnażania się pierwotniaka o 50%).

Zasada reakcji

Test inkorporacji 3H -uracylu polega na pomiarze poziomu radioaktywności pierwiastka – trytu (3H), 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.

Część doświadczalna

24-godziną hodowlę komórek L929 ($1 \times 10^4/50 \mu L$ / studzienkę) zarażono tachyzoitami *T. gondii* szczepu BK w stosunku 1 komórka żywicielska: 10 komórek pierwotniaka ($1 \times 10^5/50 \mu L$ / studzienkę). Mikrohodowle inkubowano 2h w $37^\circ C$, 10% CO_2 , umożliwiając pierwotniakowi проникnięcie do komórek i utworzenie wakuoli pasożytniczej. Po tym czasie dodano po 100 μL : i) badanego związku uzyskując końcowe stężenia: 0,0; 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,50; 125,0 $\mu g/mL$, 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 $\mu g/mL$. Płytki inkubowano 48 h ($37^\circ C$, 10% CO_2), a następnie do każdej studzienki dodawano 3H -uracylu (1 $\mu Ci/ 50 \mu L$), po czym kontynuowano inkubację przez 24 h w warunkach jw. Po tym czasie płytki zamrożono w $-20^\circ C$. Przed przystąpieniem do odczytu testu płytkę rozmrażano, a zawartość studzienek zbierano na bibułę (Printed Filtermat A), którą pozostawiano do wyschnięcia. Do pomiaru poziomu promieniowania β użyto czytnika scyntylicyjnego (WALLAC), uprzednio nasączając bibułę płynem scyntylicyjnym (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 (ED50plus 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 $\pm$ odchylenie standardowe

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

* $p < 0,05$

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 aktywność związku 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 związek według wynalazku wykazuje 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 * ±9,4 2	44,44 * ±8,9 4	54,10 * ±8,2 9	59,58 ± 11,26	62,18 * ±6,2 9	62,53 * ±11,6 5	81,88 ±11,6 5	93,98 ±11,6 5	773,97

Oceniono wpływ 4-(2-fluorofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilo-karbonylo)tiosemikarbazydu (Tabela 6) na namnażanie się pierwotniaka w hodowlach komórek linii L929. Wartości stężenia IC₅₀ odczytano z wykresu wykonanego na podstawie danych zamieszczonych w ww. tabeli.

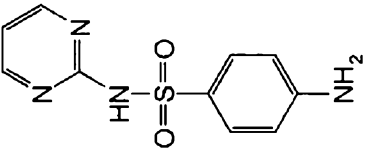
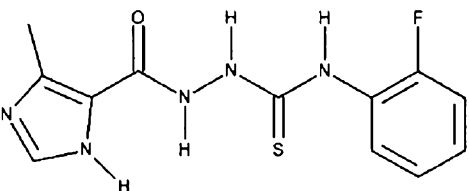
T a b e l a 6. Intensywność proliferacji [%] *T. gondii* w komórkach linii L929 hodowanych w obecności 4-(2-fluorofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilo-karbonylo)tiosemikarbazydu w zakresie stężeń 1–100 μg/mL ± odchylenie standardowe

związek	Stężenie [μg/mL]						IC ₅₀ [μg/mL]
	100	50	25	10	5	1	
1	26,59* ±3,99	73,65 ±4,36	87,49 ±4,32	111,23 ±5,21	104,95 ±5,38	97,85 ±6,02	157,59

* $p < 0,05$

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że 4-(2-fluorofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilo-karbonylo)tiosemikarbazyd wykazuje hamowanie proliferacji *T. gondii* przy stężeniu wyrażonym jako IC₅₀ niższym (IC₅₀ 157,59 μg/mL) niż stosowanego leku sulfadiazyny (IC₅₀ 773,97 μg/mL) (Tabela 7).

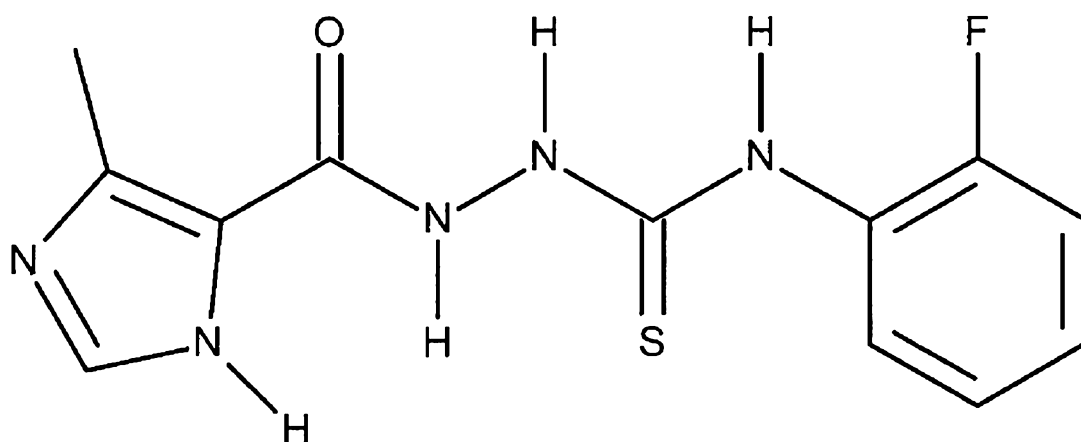
T a b e l a 7. Struktura związków i IC₅₀ – podsumowanie

Struktura związku	Nazwa związku	IC ₅₀ [μg/mL]
	sulfadiazyna	773,97
	1	157,59 4,91× niższa dawka

Zastrzeżenia patentowe

1. 4-(2-fluorofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilo-karbonylo)tiosemikarbazydu, o wzorze ogólnym 1, do zastosowania w leczeniu toksoplazmozy.
2. Zastosowanie 4-(2-fluorofenylo)-1-(4-metyloimidazol-5-ilo-karbonylo)tiosemikarbazydu, o wzorze przedstawionym poniżej, do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia toksoplazmozy.

Rysunek



WZÓR 1