

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **239292**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428106**

(22) Data zgłoszenia: **10.12.2018**

(51) Int.Cl.

C07D 285/24 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(54) **Analogi 4-(1,1-dioksydo-2H-1,2,4-benzotiadiazyn-3-ylo)benzeno-1,3-diolu
i sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
15.06.2020 BUP 13/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
22.11.2021 WUP 34/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Lublin, PL**

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

**SIEĆ BADAWCZA ŁUKASIEWICZ-INSTYTUT
PRZEMYSŁU ORGANICZNEGO, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

JOANNA MATYSIAK, Lublin, PL

WALDEMAR TURSKI, Lublin, PL

IZABELA ZAKROCKA, Zamość, PL

MONIKA KARPIŃSKA, Warszawa, PL

ANDRZEJ NIEWIADOMY, Lublin, PL

PL 239292 B1

Opis wynalazku

Przedmiot wynalazku stanowią analogi 4-(1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-3-yl)benzeno-1,3-diolu wykazujące inhibitory wpływ na syntezę kwasu kynureninowego oraz aktywność aminotransferaz kynureninowych. Przedmiot wynalazku stanowi również sposób otrzymywania tych związków, a także ich zastosowanie.

Opisano kilkanaście metod syntezy układu 1,1-ditleno-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn najczęściej podstawionych w pozycji 3 pierścieniem arylowym lub heteroarylowym. Reakcja podstawionych anilin z chlorosulfonyloizocyjanianem przy wykorzystaniu 2-aryloamin prowadzi po przekształceniu do 3-aryloamino-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-5-yl-1,1-ditlenków (Wang et al. 2007). Związki z grupy 3-(1,1-ditleno-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-yl)-4-hydroksychinazolin-2-onu otrzymywano w reakcji kondensacji aminosulfamidu z estrami etylowymi kwasu karboksychinolinowego przy udziale polifosforotrimetylosililu (PSS) (Tedesco i wsp. 2006; Wang i wsp. 2009a). Podobnie przy wykorzystaniu PPS i odpowiednich amin otrzymywano (1,1-diokso-2*H*-[1,2,4]-benzotiadiazyn-3-yl)azolo[1,5-*a*]pirydyny i azolo[1,5-*a*]pirymidyny (Wang i wsp. 2009b). Do budowy podstawowego pierścienia stosowano też liniowy substrat MeO(CO)NH(SH)N(CO)OMe (Tedesco i wsp. 2006). Niektóre pochodne otrzymywano z cyanochinoliny w reakcji z 2-aminobenzosulfamidem w obecności Me₃Al. Powstające odpowiednie amidyny cyklizują do przedmiotowych związków w obecności zasady (Tedesco i wsp. 2006). Z wykorzystaniem amidyn w reakcji z 2-chloroheteroarylosulfochlorkami otrzymywano 3-(1,1-dioksydo-2*H*-[1,2,4]-benzotiadiazyn-3-yl)-4-hydroksy-2(1*H*)chinazoliny (Tedesco i wsp. 2009).

W innym rozwiązaniu podstawowy układ cykliczny uzyskiwano przy zastosowaniu w syntezie 2-aminobenzenosulfonamidu i 1-chlorku bursztynianu-2-etylu (Tedesco i wsp. 2009). Podstawione analogii 1-hydroksynaftylowe otrzymywano w reakcji kondensacji chlorków kwasu α hydroksynaftalenokarboksylowego z 2-aminosulfamidem. Powstający podstawiony 2-aminosulfamid cyklizowano w temperaturze 200°C (Wang i wsp. 2009a). Zachowanie grup -OH w pierścieniu naftalenowym wymagało jednakże jej zabezpieczenia przez metylację (Wang i wsp. 2009a). Opracowano też syntezę 2,4-podstawionych 1,2,4-benzotiadiazyn-3-on-1,1-dioksydów w fazie stałej przez redukcję 2-nitrobenzenosulfonamidów cyklizujących z karbonylodiimidazolem (Makino i wsp. 2003).

Związki z przedmiotowej grupy znane są głównie jako inhibitory polimerazy NS5B wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) (Tedesco i wsp. 2009; Tedesco i wsp. 2006; Wang i wsp. 2009a; Wang i wsp. 2009b; Wang i wsp. 2009c). Inne pochodne opisywane są jako selektywni antagoniści receptora CXCR2 (C-X-C motif chemokine receptor 2) (Wang i wsp. 2007), modulatory kanałów potasowych (Khelili i wsp. 1995) oraz kanałów TRPC5 (transient receptor potential cation channel subfamily C member 5) (Beckmann i wsp. 2017).

Związki z tej grupy charakteryzuje działanie przeciwzapalne (Andrisano i wsp. 1981; Raffa i wsp. 1979), cytotoksyczne wobec komórek ludzkich linii nowotworowych (Tait i Di Bella 1990) oraz mikrobicydalne (Di Bella i wsp. 1979; Di Bella i wsp. 1966).

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono opisu otrzymywania 4-(1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-3-yl)benzeno-1,3-diolu. W grupach różnorodnie podstawionych analogów nie wskazywano też na ich aktywność inhibitoryjną w syntezie kwasu kynureninowego (KYNA) jak i w stosunku do aminotransferaz kynureninowych (KAT).

Jako inhibitory izoformy KAT II w syntezie kwasu kynureninowego wskazywane są 6 lub 7 podstawione 3-amino-1-hydroksy-3,4-dihydrochinazolin-2(1*H*)-ony (Chang i wsp. 2018), (Dounay i wsp. 2012), (Tuttle i wsp. 2013), hybrydy 1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-izoindolo-benzenosulfonamidowe (Jayawickrama i wsp. 2018b), S-4-(etylosulfonylo)benzoyloanitina (Pellicciari i wsp. 2006) czy pochodne estrogeny (Jayawickrama i wsp. 2017) (Chang i wsp. 2018) lub kwasu aminopiperazyńlo-7-oxo-oksazynochinolinokarboksylowego (Jayawickrama i wsp. 2018a).

Problem chorób neurodegeneracyjnych jest obecnie jednym z najbardziej istotnych konsekwencji wydłużania życia i starzenia się społeczeństw. Na całym świecie rośnie liczba ludzi w podeszłym wieku. Każdego miesiąca ponad milion ludzi kończy 60 rok życia. Szacuje się, że w połowie tego stulecia będzie więcej osób starszych niż młodszych. Ponieważ długość życia ciągle rośnie, tym samym wzrasta liczba problemów zdrowotnych ludzi starszych, którzy chorują na choroby krążenia, nowotwory, zaburzenia pamięci, chorobę Parkinsona, Alzheimera i zaburzenia psychiczne (głównie depresję). Jednocześnie choroby te charakteryzują się wspólnymi cechami takimi jak:

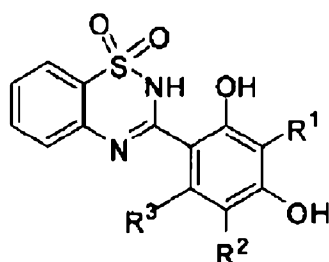
- podłoże neurodegeneracyjne,
- postępujący charakter (progresja choroby),

- ubytek funkcji psychicznych i somatycznych.

Obecnie leczenie choroby Parkinsona opiera się przede wszystkim na uzupełnieniu niedoboru dopaminy, np. poprzez podawanie prekursora dopaminy, L-DOPA, inhibitorów katabolizmu dopaminy lub agonistów receptorów dopaminergicznych. W leczeniu zaburzeń pamięci podawane są inhibitory esteraży acetylocholinowej lub memantyna, która jest niekompetycyjnym antagonistą receptora glutaminianergicznego NMDA. Skuteczność memantyny wskazuje na dużą rolę układu glutaminianergicznego w powstawaniu chorób neurodegeneracyjnych i zaburzeń pamięci. Jedną z hipotez naukowych zakłada, że za osłabienie pamięci odpowiada wzrost ilości endogenego kwasu kynureninowego (Wonodi i Schwarcz 2010). Kwas kynureninowy powstaje z kynureniny w reakcji katalizowanej przez enzym aminotransferazę kynureninową (KAT). Występują cztery izoformy KAT: I–IV (Nematollahi i wsp. 2016).

Oczekuje się zatem, że jedną z możliwości zapobiegania rozwojowi lub leczenia chorób otępiennych jest ograniczenie biosyntezy kwasu kynureninowego w mózgu. Przykładowo, z publikacji opisu patentowego EP240494B1 znane są strukturalnie 1,3,4-tiadiazole modyfikowane podstawieniem sulfamidowym, które wskazuje się jako związki o sugerowanych właściwościach.

Przedmiotem wynalazku są analogi 1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyny o wzorze ogólnym:



z różnorodnie podstawionym układem 2,4-dihydroksylowym, gdzie:

R¹: H, HO-, Me, Et, MeO;

R²: H, Me, Et, Pr, *i*-Pr, Cl, MeO, Et, HO-

R³: H, HO-, Me, Et, MeO.

Korzystnie, analogiem tym jest 4-(1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-3-yl)benzeno-1,3-diol.

Korzystnie, analogiem tym jest 4-(1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-3-yl)-2-metylobenzeno-1,3-diol.

Korzystnie, analogiem tym jest 4-(1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-3-yl)-6-metylobenzeno-1,3-diol.

Korzystnie, analogiem tym jest 4-(1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-3-yl)-6-etylobenzeno-1,3-diol.

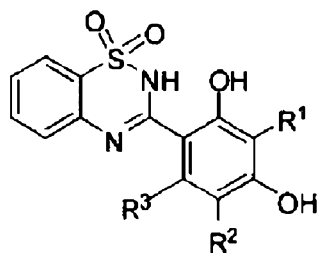
Korzystnie, analogiem tym jest 4-(1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-3-yl)-6-chlorobenzeno-1,3-diol.

Przedmiot wynalazku stanowi również sposób otrzymywania analogów 1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyny o wzorze ogólnym I z różnorodnie podstawionym układem 2,4-dihydroksyfenylowym, gdzie:

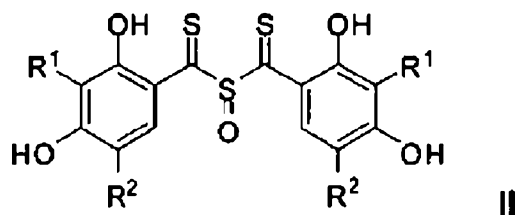
R¹: H, HO-, Me, Et, MeO;

R²: H, Me, Et, Pr, *i*-Pr, Cl, MeO, EtO, HO-;

R³: H, HO-, Me, Et, MeO:



polegający na tym, że 2-aminobenzenosulfonamid poddaje się reakcji w jednohydroksylowym alkoholu ze związkiem o wzorze ogólnym II:



gdzie podstawniki R^1 , R^2 mają wyżej wskazane znaczenie, po czym uzyskaną mieszaninę poreakcyjną przesącza się, a przesącz zatęża się lub pozostawia na 15–30 godzin, korzystnie 24 h, a uzyskany osad związku krystalizuje się z alkoholu jednohydroksylowego.

Korzystnie, reagentem o wzorze ogólnym II jest sulfinylobis(2,4-dihydroksyfenylo)metanotion.

Korzystnie, reagentem o wzorze ogólnym II jest sulfinylobis(3-metylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotion (S3MDFM).

Korzystnie, reagentem o wzorze ogólnym II jest sulfinylobis(5-metylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotion.

Korzystnie, reagentem o wzorze ogólnym II jest sulfinylobis(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotion.

Korzystnie, reagentem o wzorze ogólnym II jest sulfinylobis(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)metanotion.

Korzystnie, reagentem o wzorze ogólnym II jest sulfinylobis(5-izopropilo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotion.

Korzystnie, jednohydroksylowy alkohol stanowi metanol lub etanol.

Korzystnie, mieszaninę reakcyjną ogrzewano we wrzeniu przez 3 godz.

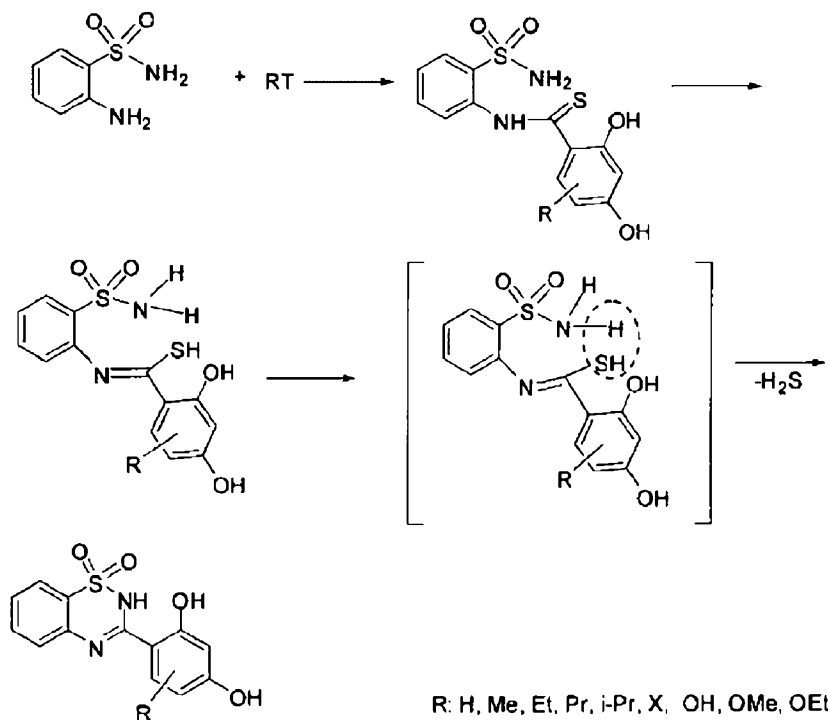
Kolejnym przedmiotem wynalazku są analogi opisane według wynalazku powyżej do zastosowania w leczeniu zaburzeń pamięci.

Kolejnym przedmiotem wynalazku są analogi opisane według wynalazku do zastosowania w leczeniu neurodegeneracyjnych chorób otępiennych.

Jeszcze jednym przedmiotem wynalazku są analogi opisane według wynalazku do zastosowania w leczeniu chorób psychicznych z zaburzeniami funkcji poznawczych.

P r z y k ł a d y – Synteza związków

Związki z grupy 4-(1,1-dioksydo-2H-1,2,4-benzotiadiazyn-3-ylo)benzeno-1,3-diole otrzymywano w syntezie przedstawionej na Schemacie 1.

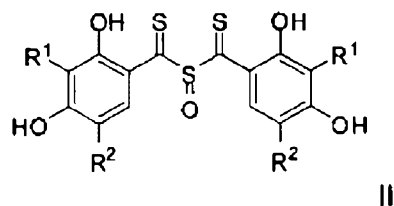


R: H, Me, Et, Pr, i-Pr, X, OH, OMe, OEt

RT – reagenty tioarylujące o wzorze ogólnym II

Schemat 1. Ogólny mechanizm syntezy związków

Ogólną budowę RT dla przykładowych związków I–V przedstawiono na Schemacie 2.



Schemat 2. Budowa RT

Oznaczenia stosowane w opisie:

R¹, R²: H – sulfinylobis(2,4-dihydroksyfenylo)metanotio (SDFM),

R¹: Me, R²: H – sulfinylobis(3-metylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotio (S3MDFM),

R¹: H, R²: Me – sulfinylobis(5-metylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotio (S5MDFM),

R¹: H, R²: Et – sulfinylobis(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotio (S3EDFM),

R¹: H, R²: Cl – sulfinylobis(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)metanotio (S5CIDFM).

Odpowiednie RT otrzymuje się w reakcji podstawionych kwasów 2,4-dihydroksybenzenokarbodi-tiowych z SOCl₂, a te z homologów i pochodnych rezorcyny w procesie tiokarbamylowania.

Metodyka badań chemicznych

Przykład I

4-(1,1-dioksydo-2H-1,2,4-benzotiadiazyn-3-ylo)benzeno-1,3-diol (związek nr I)

0,0058 mola 2-aminobenzenosulfonamidu oraz 0,0065 mola SDFM przeniesiono do 29 mL MeOH i ogrzewano we wrzeniu przez 3 godziny. Mieszaninę poreakcyjną przesączono na gorąco. Filtrat zatężono. Wydzielony związek przekrystalizowano z 12 mL MeOH.

Wydajność: 78%; t.t. = 213–215°C

C₁₃H₁₀N₂O₄S; M = 290,29

El MS (m/z, %): 290 (M⁺, 100), 277 (6), 243 (16), 228 (17), 169 (12), 156 (31), 136 (24), 108 (20), 91 (65), 65 (22), 51 (16), 44 (23), 40 (34), 34 (46),

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11,54 (s, 1H, HO-C(1)), 10,15 (SO₂NH), 8,21 (d, 1H, H-C(Ar)), 8,07 (d, 1H, H-C(Ar)), 7,91 (d, 1H, H-C(Ar)), 7,61 (m, 1H, H-C(Ar)), 7,45 (q, 1H, H-C(Ar)), 6,37 (m, 2H, H-C(4,5)) ppm;

IR (KBr) $\bar{\nu}$: 3340, 3250, 3091, 1631, 1595, 1557, 1555, 1523, 1503, 1470, 1443, 1399, 1357, 1310, 1271, 1231, 1178, 1153, 1125, 1073, 986, 943, 839, 802, 769, 739, 704 cm⁻¹.

Przykład II

4-(1,1-dioksydo-2H-1,2,4-benzotiadiazyn-3-ylo)-2-metylobenzeno-1,3-diol (związek nr II)

0,0015 mola 2-aminobenzenosulfonamidu oraz 0,0020 mola S3MDFM przeniesiono do 7,5 mL MeOH i ogrzewano we wrzeniu przez 3 godziny. Mieszaninę poreakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24 godziny i przefiltrowano. Wydzielono związek. Filtrat zatężono. Wydzielony związek przekrystalizowano z 5 mL MeOH.

Wydajność: 65%; t.t. = 179–180°C

C₁₄H₁₂N₂O₄S; M = 304,32

El MS (m/z, %): 304 (M⁺, 100), 258 (6), 239 (38), 211 (10), 156 (38), 150 (20), 122 (7), 108 (14), 92 (39), 65 (16), 52 (5).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11,85 (s, 1H, HO-C(3)), 11,17 (s, 1H, HO-C(1)), 10,15 (1H, SO₂NH), 7,97–7,95 (dd, 1H, H-C(Ar)), 7,75–7,72 (d, 1H, H-C(Ar)), 7,68–7,65 (m, 2H, H-C(Ar)), 7,44 (s, 1H, H-C(Ar-H)), 6,49–7,47 (d, 1H, H-C(Ar)), 2,03 (s, 3H, Me),

IR (KBr) $\bar{\nu}$: 3344, 3098, 2926, 2855, 1610, 1497, 1463, 1441, 1376, 1329, 1290, 1250, 1209, 1158, 1128, 1085, 1015, 909, 873, 798, 758, 726 cm⁻¹.

Przykład III

4-(1,1-dioksydo-2H-1,2,4-benzotiadiazyn-3-ylo)-6-metylobenzeno-1,3-diol (związek nr III)

0,0015 mola 2-aminobenzenosulfonamidu oraz 0,0020 mola S5MDFM przeniesiono do 7,5 mL MeOH i ogrzewano we wrzeniu przez 3 godziny. Mieszaninę poreakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24 godziny i przefiltrowano. Wydzielony związek przekrystalizowano z 6 mL MeOH.

Wydajność: 72%; t.t. = 204–205°C

C₁₄H₁₂N₂O₄S; M = 304,32

El MS (m/z, %): El MS (m/z, %): 304 (M⁺, 33), 258 (100), 188 (6), 167 (7), 149 (12), 108 (7), 92 (19), 77 (11), 65 (8), 39 (8), 34 (13).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11,74 (s, 1H, HO-C(3)), 11,36 (s, 1H, HO-C(1)), 10,16 (1H, SO₂NH), 8,11 (s, 1H, H-C(Ar)), 8,08 (d, 1H, H-C(Ar)), 7,91 (dd, 1H, H-C(Ar)), 7,60 (m, 1H, H-C(Ar-H)), 7,44 (m, 1H, H-C(Ar)), 6,46 (m, 1H, H-C(Ar)), 2,08 (s, 3 H, Me)

IR (KBr) $\bar{\nu}$: 3330, 3258, 2924, 1627, 1585, 1504, 1483, 1411, 1328, 1290, 1251, 1153, 1072, 1015, 977, 898, 843, 742 cm⁻¹.

Przykład IV

4-(1,1-dioksydo-2H-1,2,4-benzotiadiazyn-3-ylo)-6-etylobenzeno-1,3-diol (związek nr IV)

0,0015 mola 2-aminobenzenosulfonamidu oraz 0,0020 mola S5EDFM przeniesiono do 7,5 mL MeOH i ogrzewano we wrzeniu przez 3 godziny. Mieszaninę poreakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24 godziny i przefiltrowano. Wydzielony związek przekrystalizowano z 5 mL MeOH.

Wydajność: 72%; t.t. = 192–193°C

C₁₅H₁₄N₂O₄S; M = 318,2

El MS (m/z, %): 318 (M⁺, 100), 303 (M⁺-Me, 78), 290 (6), 271 (10), 256 (16), 239 (12), 181 (6), 169 (10), 165 (21), 156 (39), 148 (36), 123 (8), 108 (29), 92 (51), 77 (161), 69 (20), 65 (27), 39 (15).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11,79 (s, 1H, HO-C(3)), 11,37 (s, 1H, HO-C(1)), 10,13 (1H, SO₂NH), 8,12 (s, 1H, H-C(Ar)), 8,08 (d, 1H, H-C(Ar)), 7,90 (m, 1H, H-C(Ar)), 7,62 (q, 1H, H-C(Ar-H)), 7,45 (s, 1H, H-C(Ar)), 6,44 (s, 1H, H-C(Ar)), 3,31 (q, 3H, CH₂CH₃), 1,12 (5, 3H, CH₂CH₃)

IR (KBr) $\bar{\nu}$: 3284, 2968, 2876, 1385, 1328, 1294, 1243, 1156, 1138, 1074, 962, 901, 846, 765, 742, 715 cm⁻¹.

Przykład V

4-(1,1-dioksydo-2H-1,2,4-benzotiadiazyn-3-ylo)-6-chlorobenzeno-1,3-diol (związek nr V)

0,0015 mola 2-aminobenzenosulfonamidu oraz 0,0020 mola S5CIDFM przeniesiono do 7,5 mL MeOH i ogrzewano we wrzeniu przez 3 godziny. Mieszaninę poreakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24 godziny i przefiltrowano. Wydzielony związek przekrystalizowano z 5 mL MeOH.

Wydajność: 75%; 221–222°C

C₁₃H₉N₂O₄SCl; M = 324,65

El MS (m/z, %): 324 (M⁺, 100), 290 (18), 278 (22), 260 (17), 231 (7), 197 (7), 169 (33), 155 (86), 138 (16), 117 (16), 108 (27), 91 (96), 78 (19), 69 (23), 65 (22), 63 (32), 39 (28).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11,85 (s, 1H, HO-C(3)), 11,76 (s, 1H, HO-C(1)), 10,98 (1H, SO₂NH), 8,35 (s, 1H, H-C(Ar)), 8,15 (d, 1H, H-C(Ar)), 7,93 (m, 1H, H-C(Ar)), 7,64 (m, 1H, H-C(Ar-H)), 7,49 (m, 1H, H-C(Ar)), 6,62 (s, 1H, H-C(Ar)).

IR (KBr) $\bar{\nu}$: 3260, 3096, 2890, 2855, 2714, 1614, 1582, 1497, 1440, 1391, 1331, 1291, 1247, 1160, 1148, 1078, 1025, 1007, 984, 960, 899, 846, 769, 746.

Oryginalnym rozwiązaniem w syntezie i jednocześnie przedmiotem wynalazku jest specyficzny przebieg reakcji cyklizacji izomeryzujących form imino-tiolowych powstających w mechanizmie S_E. Te równowagowe formy są produktem przejściowym reakcji tioaryloilowania odpowiedniego substratu. W stosunku do innych reakcji ambidentnego ugrupowania imino-tiolowego z karboksamidami (benzotiazyny), w tym przypadku grupa tiolowa nie działa litycznie na ugrupowanie sulfonamidowe z jego rozszczepieniem. Przy odpowiedniej nukleofilowości równowagowo powstającej grupy SH, cyklizacja polega na elektrofilowym ataku atomu węgla w wiązaniu iminotiolowym na azot grupy amidowej i cyklizacji według reguł substytucji z deprotonizacją amidu.

Metodyka badań biologicznych

Badania wykonano na szczurach, samcach rasy Wistar o masie ciała 150–200 gramów. Zwierzęta utrzymywano w standardowych warunkach laboratoryjnych z dostępem do wody i pokarmu bez ograniczeń. Doświadczenia zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie.

W celu analizy tkankowej produkcji kwasu kynureninowego po dekapitacji szczurów natychmiast pobrano ich mózg i nerki. Nerki homogenizowano w buforze Krebsa-Ringera (w/v 1 : 4). Kora mózgowa została oddzielona od reszty mózgowia i podzielona na skrawki o wymiarach 1 mm × 1 mm. Następnie skrawki mózgu (10 skrawków/studzienka inkubacyjna) lub homogenaty nerek (100 μl/studzienka inkubacyjna) inkubowano w natlenowanym buforze Krebsa-Ringera o pH 7,4 w temperaturze 37°C przez 2 godziny w obecności prekursora kwasu kynureninowego, kynureniny i analizowanej substancji. Ilość

wyprodukowanego kwasu kynureninowego w uzyskanych po inkubacji supernatantach oceniano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym (Thermo Fisher Scientific HPLC system, ESA catecholamine HR-80, 3 μ m, C18 reverse-phase column, długość fal detektora fluorescencyjnego: ekscytacja 344 nm, emisja 398 nm).

Do oceny aktywności aminotransferaz kynureninowych wykorzystano homogenaty mózgu i nerek szczura. Homogenaty pobranych po dekapitacji szczura narządów dializowano przez 12 godzin w buforze dializacyjnym w temperaturze 8°C. Homogenaty tkankowe (100 μ l) z wyizolowanymi enzymami inkubowano przez 2 godziny w roztworze inkubacyjnym w temperaturze 37°C w obecności kynureniny i analizowanej substancji. Po zakończeniu inkubacji ocenę ilości wytworzonego kwasu kynureninowego wykonano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym (Thermo Fisher Scientific HPLC system, ESA catecholamine HR-80, 3 μ m, C18 reverse-phase column, długość fal detektora fluorescencyjnego: ekscytacja 344 nm, emisja 398 nm).

Statystyka

Wyniki wyrażono jako % kontrolnej produkcji kwasu kynureninowego w analogicznych warunkach ale pod nieobecność badanego związku. Wyznaczono średnie arytmetyczne i odchylenie standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu t-Studenta (co najmniej $p < 0,05$).

Wyniki badań biologicznych

Produkcja kwasu kynureninowego (KYNA) w skrawkach kory mózgu szczura *in vitro*.

W badaniach *in vitro* przy zastosowaniu związku **I** w stężeniu 0,1 i 1,0 mM na skrawki kory mózgu szczura stwierdzono zmniejszenie produkcji kwasu kynureninowego do odpowiednio 76% ($p < 0,05$) i 74% ($p < 0,05$) wartości kontrolnej.

Po zastosowaniu związku **IV** w stężeniu 0,1 mM i 1 mM stwierdzono zmniejszenie produkcji KYNA w skrawkach kory mózgu szczura *in vitro* do odpowiednio 73% ($P < 0,01$) i 70% ($P < 0,05$) wartości kontrolnej.

Stwierdzono zmniejszenie produkcji KYNA w skrawkach kory mózgu szczura *in vitro* po zastosowaniu substancji **V** w stężeniu 0,1 mM i 1 mM do odpowiednio 54% ($P < 0,001$) i 34% ($P < 0,001$) wartości kontrolnej.

W relacjach budowy związków czytelny jest wpływ podstawnika w pierścieniu rezorcylowym. W ocenie zależności wydaje się, że bardzo istotne znaczenie ma specyficzność działania tej grupy związków, bowiem zwiększenie ich stężenia nie wywołuje spektakularnego efektu inhibicyjnego. Wydaje się, że może to być szczególnie istotny mechanizm działania układowego związków. W przypadku farmakologicznego zastosowania tego rodzaju substancji, dla których obserwuje się niepełną relację dawka-efekt, może to być bardzo korzystny mechanizm inhibicji, a związek bardziej bezpieczny.

Uzyskane wyniki odnoszą się do hipotezy badawczej i są obiecujące, gdyż stwierdzono dotychczas, że endogenne nagromadzenie kwasu kynureninowego w mózgu jest przyczyną niektórych objawów chorób neurodegeneracyjnych takiej jak choroba Alzheimera oraz zaburzeń psychicznych (głównie schizofrenii) i zaburzeń pamięci.

Aktywność aminotransferaz kynureninowych (KAT) w homogenacie kory mózgu szczura

Po zastosowaniu związku **I** w stężeniu 1 mM zaobserwowano wzrost aktywności aminotransferazy kynureninowej typu I (KAT I) w homogenacie kory mózgu szczura do 210% ($P < 0,05$) wartości kontrolnej, natomiast spadek aktywności aminotransferazy kynureninowej typu II (KAT II) w homogenacie kory mózgu szczura do 51 % ($P < 0,05$) wartości kontrolnej.

Stwierdzono zmniejszenie aktywności KAT I w homogenacie kory mózgu szczura do 43% ($P < 0,05$) wartości kontrolnej oraz zmniejszenie aktywności KAT II w homogenacie kory mózgu szczura do 36% ($P < 0,05$) wartości kontrolnej po zastosowaniu związku **IV** w stężeniu 1 mM. Po zastosowaniu substancji **V** w stężeniu 1 mM stwierdzono zmniejszenie aktywności KAT I w homogenacie kory mózgu szczura do 45% ($P < 0,05$) wartości kontrolnej oraz brak zmian w aktywności KAT II w homogenacie kory mózgu szczura.

Produkcja kwasu kynureninowego (KYNA) oraz aktywność aminotransferaz kynureninowych w homogenacie nerki szczura *in vitro*

Po zastosowaniu substancji nr **I**, **IV** i **V** nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w produkcji KYNA w homogenacie nerki szczura *in vitro*. Po zastosowaniu substancji nr **I**, **IV** i **V** nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w aktywności aminotransferazy kynureninowej typu I (KAT I) oraz aminotransferazy kynureninowej typu II (KAT II) w homogenacie nerki szczura.

Literatura

Andrisano MG, Di Bella M, Ferrari P, Raffa L, Baggio GG (1981) [Heteroarylalkanoic acids with potential anti-inflammatory activity. II]. *Farmaco Sci* 36(11):905–15.

Beckmann H, Richter J, Hill K, Urban N, Lemoine H, Schaefer M (2017) A benzothiadiazine derivative and methylprednisolone are novel and selective activators of transient receptor potential canonical 5 (TRPC5) channels. *Cell Calcium* 66:10–18 doi:10.1016/j.ceca.2017.05.012.

Chang C, Fonseca KR, Li C, et al. (2018) Quantitative Translational Analysis of Brain Kynurenic Acid Modulation via Irreversible Kynurenine Aminotransferase II Inhibition. *Mol Pharmacol* doi:10.1124/mol.118.111625.

Di Bella M, Monzani A, Albasini A, Conti G (1966) [Research in the field of 1,2,4-benzothiadiazine. XXXVI. Halogen derivatives of 3-oxodihydro-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxide]. *Farmaco Sci* 21(2):829–38.

Di Bella M, Monzani A, Andrisano MG, Fabio U, Quaglio GP (1979) [Antimicrobial effect of derivatives of 1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxide. VII]. *Farmaco Sci* 34(1):81–8.

Dounay AB, Anderson M, Bechle BM, et al. (2012) Discovery of Brain-Penetrant, Irreversible Kynurenine Aminotransferase II Inhibitors for Schizophrenia. *ACS Med Chem Lett* 3(3): 187–92 doi:10.1021/ml200204m.

Guidetti P, Okuno E, Schwarcz R. Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II. *J Neurosci Res.* 1997 Nov 1;50(3):457–65.

Jayawickrama GS, Nematollahi A, Sun G, Church WB (2018a) Fragment Screening of Human Kynurenine Aminotransferase-II. *SLAS Discov*:2472555218764620 doi:10.1177/2472555218764620.

Jayawickrama GS, Nematollahi A, Sun G, Church WB (2018b) Improvement of kynurenine aminotransferase-II inhibitors guided by mimicking sulfate esters. *PLoS One* 13(4):e0196404 doi:10.1371/journal.pone.0196404.

Jayawickrama GS, Nematollahi A, Sun G, Gorrell MD, Church WB (2017) Inhibition of human kynurenine aminotransferase isozymes by estrogen and its derivatives. *Sci Rep* 7(1): 17559 doi:10.1038/s41598-017-17979-7.

Khelili S, Leclerc G, Faury G, Verdeti J (1995) Synthesis and vasodilator effects of 3- and 7-sulfonylurea-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxides on rat aorta. *Bioorg Med Chem* 3(5):495–503.

Makino S, Nakanishi E, Tsuji T (2003) Efficient synthesis of 2,4-disubstituted benzothiadiazin-3-one 1,1-dioxides on solid support. *J Comb Chem* 5(1):73-8 doi:10.1021/cc020056k.

Nematollahi A, Sun G, Jayawickrama GS, Church WB. Kynurenine Aminotransferase Isozyme Inhibitors: A Review. *Int J Mol Sci.* 2016 Jun 15;17(6). pii: E946. doi:10.3390/ijms17060946.

Pellicciari R, Rizzo RC, Costantino G, et al. (2006) Modulators of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism: synthesis and preliminary biological evaluation of (S)-4-(ethylsulfonyl)benzoylalanine, a potent and selective kynurenine aminotransferase II (KAT II) inhibitor. *ChemMedChem* 1(5):528–31 doi:10.1002/cmdc.200500095.

Raffa L, Di Bella M, Ferrari P, Monzani A, Andrisano MG, Baggio G (1979) [Heteroarylalkanoic acids with potential anti-inflammatory activity], *Farmaco Sci* 34(3): 199–210.

Tait A, Di Bella M (1990) Antitumor activity of methyl-4 H-1,2,4-benzothiadiazin-3-yl-carbamodithioate-S,S,-dioxide. *Boll Chim Farm* 129(9):273–5.

Tedesco R, Chai D, Darcy MG, et al. (2009) Synthesis and biological activity of heteroaryl 3-(1,1-dioxo-2H-(1,2,4)-benzothiadiazin-3-yl)-4-hydroxy-2(1H)-quinolinone derivatives as hepatitis C virus NS5B polymerase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19(15):4354–8 doi:10.1016/j.bmcl.2009.05.080.

Tedesco R, Shaw AN, Bambal R, et al. (2006) 3-(1,1-dioxo-2H-(1,2,4)-benzothiadiazin-3-yl)-4-hydroxy-2(1H)-quinolinones, potent inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Med Chem* 49(3):971–83 doi:10.1021 /jm050855s.

Tuttle JB, Anderson M, Bechle BM, et al. (2013) Structure-Based Design of Irreversible Human KAT II Inhibitors: Discovery of New Potency-Enhancing Interactions. *ACS Med Chem Lett* 4(1):37–40 doi: 10.1021 /ml300237v.

Wang G, He Y, Sun J, et al. (2009a) HCV NS5B polymerase inhibitors 1: Synthesis and in vitro activity of 2-(1,1-dioxo-2H-benzothiadiazin-[1,2,4]benzothiadiazin-3-yl)-1-hydroxynaphthalene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 19(15):4476–9 doi:10.1016/j.bmcl.2009.05.063.

Wang G, Lei H, Wang X, et al. (2009b) HCV NS5B polymerase inhibitors 2: Synthesis and in vitro activity of (1,1-dioxo-2H-[1,2,4]benzothiadiazin-3-yl) azolo[1,5-a]pyridine and azolo[1,5-a]pyrimidine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 19(15):4480–3 doi:10.1016/j.bmcl.2009.05.022.

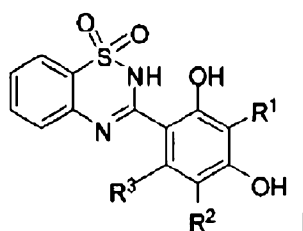
Wang G, Zhang L, Wu X, et al. (2009c) HCV NS5B polymerase inhibitors 3: Synthesis and in vitro activity of 3-(1,1-dioxo-2*H*-benzothiadiazin-3-yl)-4-hydroxy-2*H*-quinolizin-2-one derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 19(15):4484–7 doi:10.1016/j.bmcl.2009.05.021.

Wang Y, Busch-Petersen J, Wang F, et al. (2007) 3-Arylamino-2*H*-1,2,4-benzothiadiazin-5-ol 1,1-dioxides as novel and selective CXCR2 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 17(14):3864–7 doi:10.1016/j.bmcl.2007.05.011.

Wonodi I, Schwarcz R (2010) Cortical kynurenine pathway metabolism: a novel target for cognitive enhancement in Schizophrenia. *Schizophr Bull* 36(2):211–8 doi:10.1093/schbul/sbq002.

Zastrzeżenia patentowe

1. Analogi 1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn o wzorze ogólnym I:



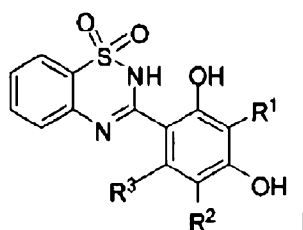
z różnorodnie podstawionym układem 2,4-d i hydroksylowym, gdzie:

R¹: H, HO-, Me, Et, MeO,

R²: H, Me, Et, Pr, iPr, Cl, MeO, EtO, HO-,

R³: H, HO-, Me, Et, MeO.

2. Analog według zastrzeżenia 1 **znamienny tym**, że stanowi go 4-(1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-3-yl)benzeno-1,3-diol.
3. Analog według zastrzeżenia 1 **znamienny tym**, że stanowi go 4-(1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-3-yl)-2-metylobenzeno-1,3-diol.
4. Analog według zastrzeżenia 1 **znamienny tym**, że stanowi 4-(1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-3-yl)-6-metylobenzeno-1,3-diol.
5. Analog według zastrzeżenia 1 **znamienny tym**, że stanowi 4-(1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-3-yl)-6-etylobenzeno-1,3-diol.
6. Analog według zastrzeżenia 1 **znamienny tym**, że stanowi 4-(1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn-3-yl)-6-chlorobenzeno-1,3-diol.
7. Sposób otrzymywania analogów 1,1-dioksydo-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyn o wzorze ogólnym I:



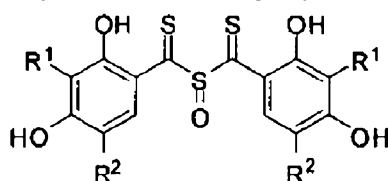
z różnorodnie podstawionym układem 2,4-dihydroksylowym, gdzie:

R¹: H, HO-, Me, Et, MeO,

R²: H, Me, Et, Pr, iPr, Cl, MeO, EtO, HO-,

R³: H, HO-, Me, Et, MeO,

w którym do rozpuszczalnika organicznego wprowadza się substraty, po czym wydziela się produkt, **znamienny tym**, że w jednohydroksylowym alkoholu poddaje się reakcji 2-amino-benzenosulfonamid, ze związkiem o wzorze ogólnym II:

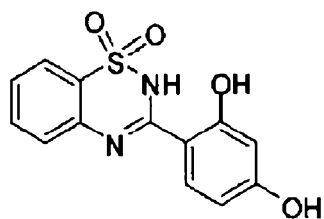


gdzie podstawniki R^1 , R^2 mają wyżej wskazane znaczenie, po czym uzyskaną mieszaninę poreakcyjną przesącza się, a przesącz zateęza się lub pozostawia na 15-30 godzin, korzystnie 24 godziny, a uzyskany osad związku krystalizuje się z alkoholu jednohydroksylowego.

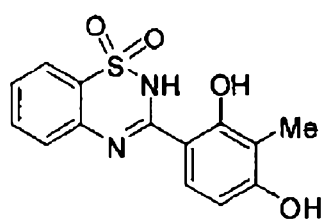
8. Sposób według zastrzeżenia 7 **znamienny tym**, że reagent o wzorze ogólnym II stanowi sulfinylobis(2,4-dihydroksyfenylo)metanotion.
9. Sposób według zastrzeżenia 7 **znamienny tym**, że reagent o wzorze ogólnym II stanowi sulfinylobis(3-metylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotion (S3MDFM).
10. Sposób według zastrzeżenia **znamienny tym**, że reagent o wzorze ogólnym II stanowi sulfinylobis(5-metylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotion.
11. Sposób według zastrzeżenia 7 **znamienny tym**, że reagent o wzorze ogólnym II stanowi sulfinylobis(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotion.
12. Sposób według zastrzeżenia 7 **znamienny tym**, że reagent o wzorze ogólnym II stanowi sulfinylobis(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)metanotion.
13. Sposób według zastrzeżenia 7 **znamienny tym**, że reagent o wzorze ogólnym II stanowi sulfinylobis(izopropylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotion.
14. Sposób według zastrzeżenia 7 **znamienny tym**, że jednohydroksylowy alkohol stanowi metanol lub etanol.
15. Sposób według zastrzeżenia 7 **znamienny tym**, że mieszaninę reakcyjną ogrzewano we wrzeniu przez 3 godziny.
16. Analogi opisane w zastrzeżeniu 1 do 6 do zastosowania w leczeniu zaburzeń pamięci.
17. Analogi według zastrzeżenia 1 do 6 do zastosowania w leczeniu neurodegeneracyjnych chorobach otępiennych.
18. Analogi według zastrzeżenia 1 do 6 do zastosowania w leczeniu chorób psychicznych z zaburzeniami funkcji poznawczych.

Rysunki

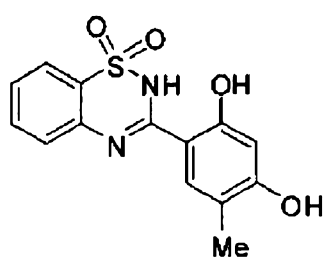
Związek I.



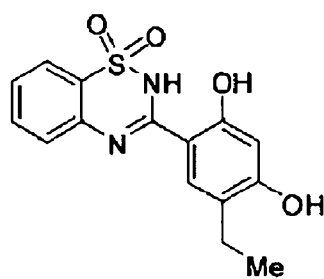
Związek II.



Związek III.



Związek IV.



Związek V.

