

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **240816**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430861**

(22) Data zgłoszenia: **12.08.2019**

(51) Int.Cl.

C07D 417/12 (2006.01)

C07D 213/86 (2006.01)

C07D 213/87 (2006.01)

C07D 277/34 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

(54) **Pochodne kwasu (2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-5-ylo/yliдено)octowego
z pirydyno-4-karbohydrazydowym podstawnikiem, sposób ich otrzymywania
oraz zastosowanie medyczne**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

22.02.2021 BUP 04/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

06.06.2022 WUP 23/22

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

NAZAR TROTSKO, Lublin, PL

JOANNA GOLUS, Lublin, PL

GRAŻYNA GINALSKA, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Belz

PL 240816 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są pochodne kwasu (2,4-dioksa-1,3-tiazolidyn-5-ylideno)octowego z pirydino-4-karbohydrydowym podstawnikiem o wzorze 1, a także sposób ich otrzymywania i ich zastosowanie medyczne w leczeniu gruźlicy.

Gruźlica to przewlekła choroba zagrażająca życiu wywołwana przez prątki *Mycobacterium tuberculosis*. Na całym świecie gruźlica jest jedną z 10 najważniejszych przyczyn zgonów i główną przyczyną zgonów u osób z HIV/AIDS [WHO *Global Tuberculosis Report* 2018].

W 2017 r. gruźlica spowodowała około 1,3 miliona zgonów wśród osób niezakażonych wirusem HIV, a wśród osób zakażonych HIV odnotowano dodatkowo 300 000 zgonów z powodu gruźlicy. Szacuje się, że rocznie liczba nowych przypadków gruźlicy wynosi 10,0 mln, co odpowiada 133 przypadkom na 100 000 ludności [WHO *Global Tuberculosis Report* 2018].

Współistnienie zakażenia HIV i gruźlicy zwykle nasila proces chorobowy, zarówno w odniesieniu do gruźlicy, jak i zakażenia wirusowego [Jagielski T. Drug resistance in tuberculosis – microbiological and clinical aspects. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych* 2017, 66, 41–58].

Innym zjawiskiem, które znacząco negatywnie wpływa na sytuację epidemiologiczną gruźlicy jest lekooporność wywołujących ją prątków [Kruczak K., Niżankowska-Mogilnicka E. Multidrug resistance tuberculosis – current problems. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2009, 77, 276–283; Jagielski T. Drug resistance in tuberculosis – microbiological and clinical aspects. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych* 2017, 66, 41–58; Augustynowicz-Kopeć E. The new face of tuberculosis. *Acta Medicorum Polonorum* 2018, Nr 8, zeszyt 1, 23–36].

Gruźlica lekooporna może być wielolekooporna (MDR-TB, multidrug resistant tuberculosis) spowodowana opornością na co najmniej izoniazyd i rifampicynę (leki pierwszego rzutu) oraz gruźlica wielolekooporna o rozszerzonej oporności prątków (XDR-TB, extensively drug resistant tuberculosis) na izoniazyd, rifampicynę, fluorochinolony oraz aminoglikozydy lub kapreomycynę (w tym leki drugiego rzutu) [Zingol M., Hosseini M.S., Wright A., Weezenbeek C.L., Nunn P., Watt C.J., Williams B.G., Dye C. Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 2006, 194, 479–485; Loddenkemper R., Sagabel D., Brendel A. Strategies against multidrug-resistant tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 2002, 36, 66–77].

Istnieje zatem zapotrzebowanie na opracowanie nowych leków, zdolnych do skutecznego leczenia gruźlicy.

Związki zawierające układy heterocykliczne mają wielkie znaczenie, zwracając szczególną uwagę na pochodne należące do klasy związków o udowodnionej przydatności w chemii medycznej. Związki heterocykliczne także odgrywają ważną rolę w leczeniu gruźlicy (izoniazyd, rifampicyna, streptomycyna, pirazynamid i in.). W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie naukowców pochodnymi tiazolidyno-2,4-dionu ze względu na ich szerokie spektrum właściwości biologicznych (przeciwcukrzycowe, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe). Potwierdzają to liczne prace przeglądowe na temat aktywności i mechanizmów działania tiazolidyno-2,4-dionów [Chadha N., Bahia M.S., Kaur M., Silakari O. Thiazolidine-2,4-dione derivatives: Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 2953–2974; Asati V., Mahapatra D.K., Bharti S.K. Thiazolidine-2,4-diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 87, 814–833; Jain V.S., Vora D.K., Ramaa C.S. Thiazolidine-2,4-diones: progress towards multifarious applications. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, 21, 1599–1620; Imran M., Ilyas B., Deepanjali, Khan S.A. Recent thiazolidinediones as antidiabetics. *J. Sci. Industr. Res.* 2007, 66, 99–109].

Są też doniesienia o aktywności przeciwprątkowej dla pochodnych tiazolidyno-2,4-dionu.

3,5-Dipodstawione pochodne tiazolidyno-2,4-dionu zawierające układy benzotiazolu oraz pirydyno-1,3,4-oksadiazolowy w pozycji 3 zostały przebadane pod kątem aktywności przeciwprątkowej. Minimalne stężenie hamujące dla tych pochodnych były w przedziale 25–62,5 µg/ml [Patel N.B., Khan I.H. Synthesis of newer 5-benzylidene-2,4-thiazolidinediones as potential antimicrobials. *Indian J. Res. Pharm. Biotechnol.* 2014, 2, 993–1001; Patel N.B., Purohit A.C., Rajami D. Design and synthesis of newer thiazolidinediones incorporated with pyridine and 1,3,4-oxadiazole moieties as antimicrobial agents. *Int. J. Drug Des. Discov.* 2014, 5, 1342–1351].

Nieco lepsze wyniki aktywności przeciwprątkowej uzyskano dla 3,5-dipodstawionych pochodnych tiazolidyno-2,4-dionu z benzimidazolowym fragmentem w pozycji 3 (MIC=6,25–12,5 µg/ml) [Araujo

D.M.L., Maste M.M., Alegaon S., Saxena A. Synthesis, antitubercular evaluation and docking studies of novel benzimidazole analogues. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2018, 9, 3696–3704].

Pośród pochodnych 5-arylidentiazolidyno-2,4-dionu z 2-cyklopropylo-1-(2-fluorofenylo)-2-oksoetylowym podstawnikiem w pozycji 3 najlepszy związek wykazywał aktywność przeciwprątkową już w mikromolowych stężeniach (MIC = 25 μ M) [Ponnuchamy S., Kanchithalaivan S., Kumar R.R., Ali M.A., Choon T.S. Antimycobacterial evaluation of novel hybrids arylidene thiazolidine-2,4-diones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, 24, 1089–1093].

Opisano także aktywność przeciwprątkową dla 5-podstawionych pochodnych tiazolidyno-2,4-dionu z imidazolidynowym fragmentem [Khan I.H., Patel N.B., Patel V.M. Synthesis, *in silico* molecular docking and pharmacokinetic studies, *in vitro* antimycobacterial and antimicrobial studies of new imidazolones clubbed with thiazolidinedione. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 2018, 14, 269–283]. Natomiast pochodne zawierające w pozycji 5 układu tiazolidyno-2,4-dionu 2-metylochromen wykazywały bardzo dobrą aktywność przeciwprątkową z wartością MIC = 0,36 μ M [Angelova V.T., Valcheva V., Vassilev N., Buyukliev R., Mihaylova R., Momekov G. Synthesis, *in vitro* antiproliferative and antimycobacterial activity of thiazolidine-2,4-dione and hydantoin derivatives. *Bulgarian Chem. Comm.* 2017, 49, 643–651].

Wyżej przedstawione doniesienia literaturowe o przeciwprątkowej aktywności pochodnych tiazolidyno-2,4-dionu wskazują na brak 100% skuteczności obecnych leków ze względu na istniejącą lekooporność.

Wynalazek rozwiązuje otrzymywanie skutecznych małowyciecznych związków pochodne kwasu (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno)octowego z pirydino-4-karbohydrydowym fragmentem o aktywności przeciwprątkowej.

Przedmiotem wynalazku są nowe pochodne kwasu (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno)octowego z pirydino-4-karbohydrydowym fragmentem o wzorze 1, gdzie R oznacza H, Br, Cl, OCH₃, OC₂H₅ oraz o wzorze 2, gdzie R₁ oznacza podstawnik w pozycji 2 lub 3 układu aromatycznego.

Sposób otrzymywania związków o wzorze 1, gdzie R oznacza H, Br, Cl, OCH₃, OC₂H₅ oraz o wzorze 2, gdzie R₁ oznacza podstawnik w pozycji 2 lub 3 układu aromatycznego według wynalazku polega na tym, że otrzymuje się je w wyniku kondensacji odpowiednich pochodnych (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno)octanu 2, 3 lub 4-formylofenylu z hydrazidem kwasu izonikotynowego, w stosunku molowym 1:1. Reakcja przebiega w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika organicznego korzystnie bezwodnego etanolu.

Pochodne kwasu (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno)octowego z pirydino-4-karbohydrydowym fragmentem o wzorze 1 i 2 według wynalazku do zastosowania jako lek w leczeniu gruźlicy.

Nowe związki będące przedmiotem wynalazku wykazują aktywność przeciwprątkową w stosunku do referencyjnego szczepu *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177.

Minimalne stężenie hamujące (MIC, ang. *Minimal Inhibitory Concentration*) wzrost *M. tuberculosis* H37Ra dla nowych pochodnych znajduje się w przedziale 1–4 μ g/ml.

P r z y k ł a d I

Otrzymywanie (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno)octanu 4-[[2-(pirydino-4-karbonylo)hydrazynylideno]metylo]fenylu.

Do 0,002 mola (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno)octanu 4-formylofenylu i 0,002 mola hydrazidu kwasu izonikotynowego dodano 8 ml bezwodnego etanolu i ogrzewano we wrzeniu 10 min. Po ochłodzeniu powstały osad odsączono i wysuszono. Krystalizowano z butanolu.

Wydajność 91%, t.t. 258–259°C.

¹H NMR δ ppm (DMSO-d₆): 3,43–3,46 m (2H, CH-CH₂); 4,85–4,89 m (1H, CH-CH₂); 7,26 d (J=8,5 Hz), 7,81–7,84 m, 8,79 d (J=5,8 Hz) (8H, Ar); 8,48 s (1H, CH=N); 12,07 s (1H, NHCO); 12,12 s (1H, NH tiazolidyna).

P r z y k ł a d II. W sposób analogiczny do opisanego w przykładzie I otrzymano pozostałe pochodne kwasu (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze 1 (gdzie R oznacza Br, Cl, OCH₃ i OC₂H₅) oraz pochodne kwasu (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze 2, gdzie R oznacza podstawnik w pozycji 2 lub 3 układu aromatycznego.

(2,4-Dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno)octan 2-bromo-4-[[2-(pirydino-4-karbonylo)hydrazynylideno]metylo]fenylu

Wydajność 94%, t.t. 240–242°C.

^1H NMR δ ppm (DMSO- d_6): 3,51 d (2H, CH-C H₂, $J=6,0$ Hz); 4,89 t (1H, CH-CH₂, $J=6,0$ Hz); 7,42 d ($J=8,3$ Hz), 7,81-7,87 m, 8,10 d ($J=1,5$ Hz), 8,79 d ($J=5,8$ Hz) (7H, Ar); 8,45 s (1H, CH=N); 12,13 s (1H, NH tiazolidyna); 12,21 s (1H, NHCO).

(2,4-Diokso-1,3-tiazolidyn-5-ylo)octan 2-chloro-4-[[2-(pirydyno-4-karbonylo)hydrazynylideno]metylo]fenylu

Wydajność 80%, t.t. 246-247°C.

^1H NMR δ ppm (DMSO- d_6): 3,51-3,54 m (2H, CH-C H₂); 4,87-4,92 m (1H, CH-CH₂); 7,44 d ($J=8,3$ Hz), 7,79-7,84 m, 7,96 d ($J=1,7$ Hz), 8,79 d ($J=5,5$ Hz) (7H, Ar); 8,46 s (1H, CH=N); 12,13 s (1H, NH tiazolidyna); 12,21 s (1H, NHCO).

(2,4-Diokso-1,3-tiazolidyn-5-ylo)octan 2-metoksy-4-[[2-(pirydyno-4-karbonylo)hydrazynylideno]metylo]fenylu

Wydajność 85%, t.t. 249-250°C.

^1H NMR δ ppm (DMSO- d_6): 3,41-3,46 m (2H, CH-C H₂); 3,85 s (3H, OCH₃); 4,87-4,92 m (1H, CH-CH₂); 7,22 d, 7,35 dd, 7,49 d (3H, C₆H₃, $J=8,3$; 1,5 Hz); 7,83 d, 8,79 d (4H, C₅H₄N, $J=5,8$ Hz); 8,47 s (1H, CH=N); 12,08 s (2H, NHCO i NH tiazolidyna).

(2,4-Diokso-1,3-tiazolidyn-5-ylo)octan 2-etoksy-4-[[2-(pirydyno-4-karbonylo)hydrazynylideno]metylo]fenylu.

Wydajność 91%, t.t. 235-236°C.

^1H NMR δ ppm (DMSO- d_6): 1,34 t (3H, OCH₂CH₂, $J=6,9$ Hz); 3,43 d (2H, CH-CH₂, $J=5,9$ Hz); 4,11 q (2H, OCH₂CH₃, $J=6,9$ Hz); 4,84 t (1H, CH-CH₂, $J=5,9$ Hz); 7,21 d, 7,33 dd, 7,47 d (3H, C₆H₃, $J=8,3$; 1,5 Hz); 7,82 d, 8,79 d (4H, C₅H₄N, $J=5,8$ Hz); 8,45 s (1H, CH=N); 12,07 s (2H, NHCO i NH tiazolidyna).

(2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno)octanu 2-[[2-(pirydyno-4-karbonylo)hydrazynylideno]metylo]fenylu

Wydajność 75%, t.t. 238-240°C.

^1H NMR δ ppm (DMSO- d_6): 7,16 s (1H, CH=); 7,34-7,59 m, 7,98 d (4H, C₆H₄, $J=7,8$ Hz); 7,79 d, 8,78 d (4H, C₅H₄N, $J=5,8$ Hz); 8,53 s (1H, CH=N); 12,03 s (1H, NHCO); 12,86 s (1H, NH tiazolidyna).

(2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-5-ylideno)octanu 3-[[2-(pirydyno-4-karbonylo)hydrazynylideno]metylo]fenylu

Wydajność 92%, t.t. 260-261°C.

^1H NMR δ ppm (DMSO- d_6): 7,08 s (1H, CH=); 7,32-7,35 m, 7,53-7,71 m (4H, C₆H₄); 7,83 d, 8,79 d (4H, C₅H₄N, $J=5,8$ Hz); 8,49 s (1H, CH=N); 12,14 s (1H, NHCO); 12,62 s (1H, NH tiazolidyna).

P r z y k ł a d III. Aktywność nowych związków przeciw *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177.

Aktywność przeciwprątkową otrzymanych związków oceniono metodą seryjnych rozcieńczeń w płytkach mikrotitracyjnych, z resazuryną jako indykatorem aktywności metabolicznej prątków [Sawicki R., Golus J., Przekora A., Ludwiczuk A., Sieniawska E., Ginalska G. Antimycobacterial activity of cinnamaldehyde in a *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) model. *Molecules* 2018, 23(9): 2381]. Referencyjny szczep *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 hodowano na skosach Lowensteina-Jensena w temperaturze 37°C. Dwutygodniowe kolonie bakteryjne zawieszono w pożywce płynnej 7H9-S (Middlebrook 7H9 z 0,2% glicerolem i 10% wzbogaceniem ADC: albumina dekstroza i katalaza) i worteksowano przez 2 minuty ze szklanymi kuleczkami o średnicy 1 mm. Zawiesinę bakteryjną inkubowano 1 h w temperaturze pokojowej w celu sedymentacji większych zgrupowań bakterii. Po inkubacji supernatant przeniesiono do nowej probówki i doprowadzono do gęstości równej 0,5 w skali McFarlanda. Przygotowaną zawiesinę bakteryjną rozcieńczono w proporcji 1:100 i dodawano w objętości 50 μl do 50 μl badanych związków.

Otrzymane pochodne kwasu (2,4-diokso-1,3-tiazolidyn-5-ylo/ylideno)octowego z pirydyno-4-karbohydrazydowym fragmentem rozpuszczono w DMSO w stężeniu 8 mg/ml. Seryjne dwukrotne rozcieńczenia związków, w zakresie stężeń od 8 do 0,0156 $\mu\text{g/ml}$, wykonano w pożywce 7H9-S w okrągłodennej płytce 96-dołkowej. Równocześnie przeprowadzono kontrolę wzrostu, kontrolę dla DMSO oraz kontrolę jałowości. Ostateczne stężenie DMSO nie przekraczało 1% (v/v) i nie wpływało na wzrost bakterii. Jako kontrole referencyjne zastosowano leki przeciwprątkowe I wyboru: etambutol, izoniazyd i streptomycynę.

Zainokulowane płytki zamknięto samoprzylepną folią do mikropłetek i inkubowano w temperaturze 37°C. Po 8 dniach inkubacji do dołków mikropłytki dodano 15 μl roztworu resazuryny (alamarBlue,

Invitrogen). Płytkę ponownie zaklejono folią i inkubowano kolejne 48 h, po czym oceniono zmianę zabarwienia resazuryiny z koloru niebieskiego na kolor różowy. Wartości MIC oznaczono jako najniższe stężenie badanego związku, dla którego nie stwierdzono zmiany zabarwienia resazuryiny. Doświadczenie zostało powtórzone w trzech niezależnych eksperymentach.

Wyniki

Oceniono aktywność pochodnych kwasu (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylo/ylieno)octowego według wynalazku przeciw *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177. Otrzymane wartości MIC znajdują się w zakresie 1–4 µg/ml. Dane przedstawiono w Tabeli 1.

T a b e l a 1. Aktywność przeciwpłatkowa nowych pochodnych kwasu (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylo/ylieno)octowego z pirydino-4-karbohydrazydowym fragmentem

Związek	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177 MIC, µg/ml
1	1
2	1
3	1
4	1
5	1
6	4
7	1
Etambutol	2
Streptomycyna	0,5
Izoniazyd	0,25

Objaśnienia skrótów: 1 (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza H), 2 (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza Br), 3 (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza Cl), 4 (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza OCH₃), 5 (związek o wzorze 1, gdzie R oznacza OC₂H₅), 6 (związek o wzorze 2, gdzie R₁ oznacza podstawnik w pozycji 2 układu aromatycznego), 7 (związek o wzorze 2, gdzie R₁ oznacza podstawnik w pozycji 3 układu aromatycznego). MIC – minimalne stężenie hamujące.

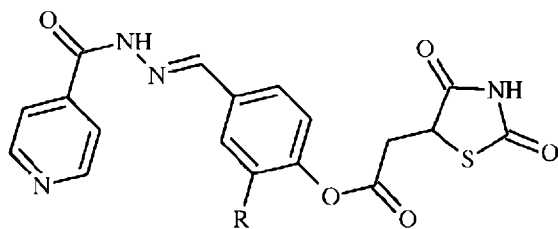
Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że nowe pochodne kwasu (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylo/ylieno)octowego z pirydino-4-karbohydrazydowym fragmentem (związki 1–5 i 7) wykazują aktywność przeciwpłatkową dwukrotnie lepszą niżeli lek referencyjny etambutol.

Zastrzeżenia patentowe

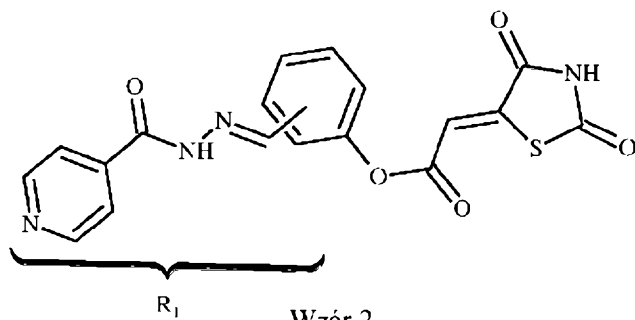
1. Pochodne kwasu (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylo)octowego o wzorze 1 przedstawionym na rysunku, gdzie R oznacza H, Br, Cl, OCH₃ i OC₂H₅.
2. Sposób otrzymywania związków o wzorze 1 **znamienny tym**, że pochodne (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylo)octanu 4-formylofenylu poddaje się kondensacji z hydrazidem kwasu izonikotynowego, w stosunku molowym 1:1, przy czym proces prowadzi się w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika organicznego, korzystnie bezwodnego etanolu.
3. Pochodne kwasu (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylieno)octowego o wzorze 2, gdzie R₁ oznacza podstawnik w pozycji 2 układu aromatycznego, mianowicie (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylieno)octan 2-{{2-(pirydino-4-karbonylo)hydrazynylideno}metylo}fenylu lub R₁ oznacza podstawnik w pozycji 3 układu aromatycznego, mianowicie (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylieno)octan 3-{{2-(pirydino-4-karbonylo)hydrazynylideno}metylo}fenylu przedstawionym na rysunku.
4. Sposób otrzymywania związków o wzorze 2, gdzie R₁ oznacza podstawnik w pozycji 2 lub 3 układu aromatycznego **znamienny tym**, że pochodne (2,4-dioekso-1,3-tiazolidyn-5-ylo/ylieno)octanu 2 lub 3-formylofenylu poddaje się kondensacji z hydrazidem kwasu izonikotynowego, w stosunku molowym 1:1, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika organicznego, korzystnie bezwodnego etanolu.

5. Pochodne kwasu (2,4-dioksy-1,3-tiazolidyn-5-ylideno)octowego o wzorze 1 przedstawionym na rysunku, gdzie R oznacza H, Br, Cl, OCH₃ i OC₂H₅ i o wzorze 2 gdzie R₁ oznacza podstawnik w pozycji 2 lub 3 układu aromatycznego do zastosowania w leczeniu gruźlicy.

Rysunki



Wzór 1



Wzór 2