

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **236031**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **414051**

(22) Data zgłoszenia: **17.09.2015**

(51) Int.Cl.
C07D 249/12 (2006.01)
C07D 401/04 (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tion
i kompozycja farmaceutyczna**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
27.03.2017 BUP 07/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.11.2020 WUP 19/20

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

(72) Twórca(y) wynalazku:
MONIKA PITUCHA, Lublin, PL
MACIEJ WOŚ, Warszawa, PL
KATARZYNA KLIMEK, Milejów, PL
GRAŻYNA GINALSKA, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Belz

PL 236031 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tion (**wzór 1**) oraz kompozycja farmaceutyczna zawierająca go do zastosowania w leczeniu raka piersi, płuc i wątroby.

Choroby nowotworowe są jednym z głównych problemów zdrowotnych w Stanach Zjednoczonych i wielu innych częściach świata „World Health Organization The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva: World Health Organization; 2008”. Szacuje się, że są one drugim, po chorobach serca, powodem zgonów i przewiduje się, że w ciągu najbliższych lat staną się główną przyczyną śmierci pacjentów. Według diagnoz Narodowego Centrum Statystyk Zdrowotnych w USA (National Center for Health Statistics) w roku 2015 pojawi się aż 1,658,370 nowych przypadków zachorowań na raka, w czym 589,430 przypadków będzie prowadziło do zgonu. Liczba jednostek zachorowalności, a także rodzaj nowotworów w dużej mierze zależy od regionu świata, płci, wieku czy stanu zdrowia pacjenta „Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. CA: A Cancer Journal for Clinicians (2015), 65, 5–29”. Nie mniej jednak wiadomo, że rak piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem kobiet i główną przyczyną zgonów, stanowiąc 23% całkowitej liczby przypadków zachorowalności i 14% zgonów. Rak płuc natomiast jest głównym typem nowotworów występujących u mężczyzn. Stanowi on 17% nowych zachorowań i u 23% przypadków prowadzi do zgonu. Ponadto wśród 10-ciu najczęściej występujących typów nowotworów podaje się również raka jelita, nerki, wątroby oraz białaczkę „Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. CA: A Cancer Journal for Clinicians (2011), 61, 69–90”, „Wojciechowska, U.; Didkowska, J. NOWOTWORY Journal of Oncology (2013), 63, 197–216”.

Pomimo wielu dostępnych na rynku cytostatyków, wciąż brakuje leku skutecznego wobec komórek nowotworowych i bezpiecznego dla komórek prawidłowych.

Jednym z najlepiej poznanych cytostatyków jest Cisplatyna (*cis*-diaminodichloroplatyna II). Od ponad 40-lat jest używana w leczeniu wielu typów nowotworów, m.in. pęcherza, piersi, głowy, szyi, płuc, jajnika i jąder „Tsimberidou, A.M.; Braithe, F.; Stewart, D.J.; Kurzrock, R. Journal of Clinical Oncology (2009) 27, 6243–6250”. Mechanizm działania przeciwnowotworowego Cisplatyny polega na zdolności do wiązania się z zasadami purynowymi w DNA, co powoduje jego uszkodzenia i w konsekwencji prowadzi do apoptozy komórek nowotworowych. Jednak ze względu na liczne niepożądane efekty uboczne, takie jak ciężkie zaburzenia czynności nerek, reakcje alergiczne, zmniejszenie odporności na infekcje, zaburzenia żołądkowo-jelitowe, krwawienia czy utrata słuchu, szczególnie u młodych pacjentów, jej zastosowanie jest ograniczone „Dasari, S.; Tchounwou, P.B. European Journal of Pharmacology (2014), 740, 364–378”.

Dlatego też, istnieje uzasadniona potrzeba poszukiwania nowych związków o aktywności przeciwnowotworowej, które będą wykazywały większą selektywność działania w kierunku komórek nowotworowych niż prawidłowych.

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie sposobu otrzymywania związku o wzorze 1, mogącego znaleźć zastosowanie w leczeniu pacjentów chorych na raka piersi, płuc i wątroby.

Będący przedmiotem wynalazku sposób otrzymywania 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tion (**wzór 1**) polega na tym, że związek o wzorze 1 otrzymuje się w reakcji cyklizacji 4-(4-nitrofenylo)-1-(pirydyn-2-ylo)karbonylotiosemikarbazydu (**wzór 2**) w roztworze 2% wodorotlenku sodu. Mieszaninę ogrzewa się we wrzeniu przez około 2 godziny a osad uzyskuje się przez wytrącenie za pomocą 3M roztworu HCl. Otrzymany 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tion (**wzór 1**) krystalizuje się z metanolu.

Otrzymany sposobem według wynalazku związek 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tion (**wzór 1**) może znaleźć zastosowanie do wytwarzania leków przeznaczonych do leczenia pacjentów chorych na raka piersi, płuc i wątroby.

Przedmiotem wynalazku jest także kompozycja zawierająca jako substancję aktywną związek o wzorze 1 do zastosowania w leczeniu raka piersi, płuc i wątroby.

P r z y k ł a d 1: Otrzymywanie 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tionu (**wzór 1**).

Do 3,17 g (0,01 mola) 4-(4-nitrofenylo)-1-(pirydyn-2-ylo)karbonylotiosemikarbazydu (**wzór 2**) dodano 20 ml 2% roztworu wodorotlenku sodu i ogrzewano przez 2 godziny. Następnie do ochłodzonego roztworu dodano 3M kwas solny do odczynu kwaśnego. Otrzymany osad odsączono i po wysuszeniu krystalizowano z metanolu.

Temperatura topnienia: 202–204°C

Wzór sumaryczny: C₁₃H₉N₅O₂S

Masa molowa: 299,307

Wydajność: 2,05 g (60%)

Widma ¹H NMR (d₆-DMSO, ppm, TMS): 10,02 (s, 1H) 7,09-7,11 (m, 1H), 6,78-6,81 (m, 2H) 3,89 (s, 3H) 3,72-3,82 (m, 8H), 2,86-2,98 (m, 3H).

Widma ¹³C NMR (d₆-DMSO ppm TMS): 161,68, 158,44, 141,79, 130,18, 128,31, 115,56, 110,79, 59,34, 55,26, 52,98, 50,09, 49,36, 48,56, 46,72, 38,41, 37,86, 37,50, 24,79, 23,97, 22,21, 20,98

P r z y k ł a d 2: Wpływ nowego związku 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tionu na proliferację komórek nowotworowych i prawidłowych.

Określenie stopnia proliferacji *in vitro* komórek raka piersi (MCF-7), płuc (A549) wątroby (HepG2) oraz komórek prawidłowych fibroblastów (BJ) w teście SRB po 96-godzinnej inkubacji z badanymi związkami oraz wzorcem (Cisplatyną)

Wyznaczenie wartości indeksów terapeutycznych dla 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tionu oraz wzorca (Cisplatyny).

W badaniach wykorzystano trzy linie nowotworowe (raka piersi MCF-7, raka płuc A549, raka wątroby HepG2) oraz jedną prawidłową (fibroblastów ludzkich BJ) pochodzące z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ATCC). Komórki były hodowane według zaleceń ATCC, tj. linia BJ, HepG2 oraz MCF-7 rosły w podłożu EMEM z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej oraz antybiotyków (streptomycyna, penicylina). W przypadku linii MCF-7 podłoże było dodatkowo suplementowane 0,01 mg/ml rekombinowanej insuliny ludzkiej. Linia raka płuc (A549) była hodowana w podłożu F-12K z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej oraz antybiotyków (streptomycyna, penicylina). Wszystkie linie komórkowe rosły w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37°C (Do pasażu komórek używano 0,25% roztworu trypsyny w EDTA. W celu zbadania wpływu badanych związków na proliferację komórek nowotworowych i prawidłowych, zawiesinę komórek linii A549 BJ, HepG2 oraz MCF-7 w podłożu proliferacyjnym doprowadzano do gęstości 3x10⁴ kom./ml (dla A549), 6x10⁴ kom./ml (dla BJ), 1x10⁵ kom./ml (dla HepG2) oraz 2,5x10⁵ kom./ml (dla MCF-7) i rozlewano po 100 µl do dołków w płytce 96-dołkowej. Po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C delikatnie ściągano płyn hodowlany i dodawano do kolejnych rzędów po 100 µl/dołek odpowiedniego dla danej linii płynu utrzymującego (2% FBS) z dodatkiem określonych stężeń badanych związków oraz wzorca. Po 24 godz. inkubacji w atmosferze 5% CO₂ i temp. 37°C oznaczano żywotność komórek, w teście z sulforodaminą B (SRB). Test ten pozwala w bardzo czuły sposób na określenie liczby żywych komórek. Zasada testu opiera się na elektrostatycznym wiązaniu SRB do białek komórkowych w odpowiednim pH. Następnie pochłonięty przez komórki barwnik zostaje rozpuszczony, a intensywność barwy mierzona jest spektrofotometrycznie. Intensywność barwy jest zatem wprostproporcjonalna do ilości żywych, proliferujących komórek.

Wyniki badań aktywności przeciwnowotworowej zamieszczono w Tabeli Nr 1

	IT (rak piersi) <u>(IC₅₀ BJ</u> IC ₅₀ MCF-7)	IT (rak płuc) <u>(IC₅₀ BJ</u> IC ₅₀ A549)	IT (rak wątroby) <u>(IC₅₀ BJ</u> IC ₅₀ HepG2)
3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tion	2,05	0,57	1,14
Cisplatyna	0,25	0,5	0,42

Po 96-godzinnej inkubacji komórek A549, BJ, HepG2 oraz MCF-7 z badaną substancją 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tionem) oraz wzorcem Cisplatyną w teście SRB, wyznaczono wartości stężenia hamującego proliferację komórek w 50% (IC₅₀). Na tej podstawie wyznaczono wartości indeksu terapeutycznego (IT), który jest miarą potencjalnego bezpieczeństwa stosowania leku. W przypadku wszystkich badanych linii nowotworowych, oba badane związki wykazały większą aktywność hamującą proliferację komórek nowotworowych niż prawidłowych. Dlatego też, wyznaczone wartości IT były wyższe dla nowego związku niż dla Cisplatyny. Zatem związek 3-(4-

-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tion wykazuje silne działanie hamujące proliferację komórek nowotworowych piersi, płuc i wątroby, a ponadto charakteryzuje się wyższym współczynnikiem bezpieczeństwa terapeutycznego *in vitro* niż popularnie stosowany cytostatyk – Cisplatyna.

P r z y k ł a d 3: Wpływ nowego związku 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tionu na aktywność proapoptotyczną komórek nowotworowych.

Określenie potencjału proapoptotycznego badanych związków w komórkach A549, hepG2 oraz MCF-7 wykorzystując barwienie oranżem akrydyny (OA) i bromkiem etydyny (BE).

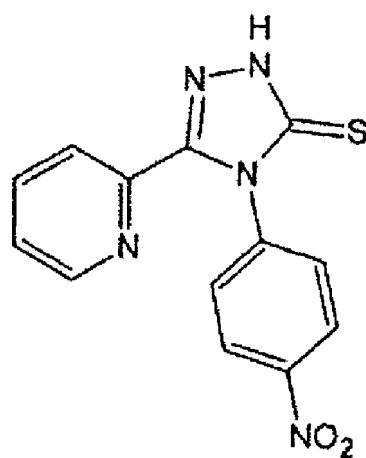
W przeprowadzonych badaniach użyto trzy limę komórkowe (raka piersi, płuc i wątroby), które były hodowane jak opisano powyżej (Przykład 2). Komórki następnie inkubowano z badanymi związkami w stężeniu 1 µg/ml przez 98 godzin w atmosferze 5% CO₂ oraz temperaturze 37°C. Po tym czasie, komórki zostały wybarwione roztworem oranżu akrydyny i bromku etydyny w celu określenia potencjału proapoptotycznego badanych związków. Barwienie to umożliwia wyodrębnienie populacji komórek żywych, wczesnoapoptotycznych, późnoapoptotycznych oraz nekrotycznych.

Po 96-godzinnej inkubacji komórek A549, HepG2 oraz MCF-7 z 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tionem w stężeniu równym 1 µg/ml, zaobserwowano niewielką liczbę komórek żywych. Większość obserwowanych komórek w populacji była wczesno i późnoapoptotyczna. Obserwowano również pojedyncze komórki nekrotyczne. Wyniki te świadczą o wysokim potencjale proapoptotycznym badanych związków w stosunku do komórek raka piersi, płuc i wątroby. Zatem można przypuszczać, że mechanizm działania przeciwnowotworowego nowych związków polega na indukcji procesu apoptozy w komórkach A549, HepG2 oraz MCF-7.

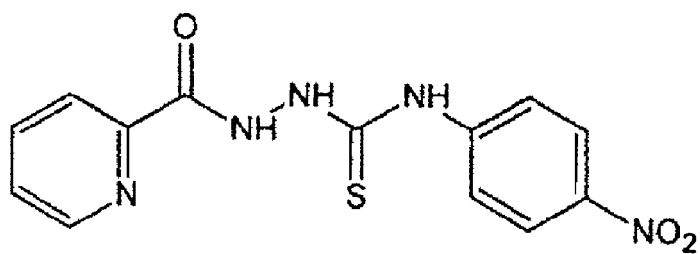
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tionu (**wzór 1**), **znamiennym tym**, że 4-(4-nitrofenylo)-1-(pirydyn-2-ylo)karbonylotiosemikarbazyd (**wzór 2**) cyklizuje w środowisku 2% roztworu wodorotlenku sodu do 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tionu (**wzór 1**), reakcję prowadzi się we wrzeniu przez około 2 godziny, po zakończeniu reakcji dodaje się 3 M HCl do odczynu kwaśnego a otrzymany osad sączy się i oczyszcza przez krystalizację z rozpuszczalnika organicznego, korzystnie z metanolu.
2. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca jako substancję aktywną związek 3-(4-nitrofenylo)-4-(pirydyn-2-ylo)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolo-5-tion, o wzorze 1, do zastosowania w leczeniu raka piersi, płuc i wątroby.

Rysunki



WZÓR 1



WZÓR 2