Malwina Krause

Synteza nowych pochodnych pikolinonitrylu o aktywności przeciwgruźliczej

Praca doktorska wykonana
w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej
Wydziału Farmaceutycznego
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Katedry: Prof. dr hab. Jarosław Sławiński
Promotor pracy: Dr hab. Katarzyna Gobis

Gdańsk 2020

STRESZCZENIE

Poszukiwanie nowych leków przeciwgruźliczych jest nadal aktualnym tematem badawczym ze względu na rosnącą oporność *Mycobacterium tuberculosis*, pojawienie się szczepów wielolekoopornych (MDR-TB) oraz szczepów o rozszerzonej oporności (XDR-TB). Co więcej, nasilające się zjawisko migracji ludności skutkuje problemami nie tylko w sektorze politycznym, społecznym czy ekonomicznych, ale także w sektorze medycznym. Masowe przemieszczanie się ludności tworzy realne zagrożenie bezpieczeństwa epidemiologicznego wynikające m.in. z innej wirulentności oraz innych wzorców oporności szczepów bakteryjnych obecnych w krajach migrantów. Duży potencjał biologiczny polegający na hamowaniu wzrostu prątków gruźlicy zaobserwowano w grupie pochodnych tiosemikarbazydowych oraz pochodnych pirydyny. Analogiczną tendencję potwierdził zespół badawczy Katedry i Zakładu Chemii Organicznej GUMed.

W części teoretycznej scharakteryzowano izoniazyd i jego pochodne, a także zaprezentowano związki o aktywności tuberkulostatycznej testowane w różnych fazach badań klinicznych. Ponadto dokonano przeglądu literaturowego na temat aktywności przeciwprątkowej związków posiadających w swojej strukturze pierścień pirydyny oraz fragment hydrazynokarbotioamidowy.

W niniejszej pracy doktorskiej zaprojektowano syntezę nowych pochodnych pikolinonitrylu. Wśród zaprojektowanych związków znajdowały się pochodne o budowie tiosemikarbazydowej, iminowej oraz 1,2,4-triazolu.

4-Chloropikolinonitryl posiadający w swojej strukturze pierścień pirydyny stanowił substrat wyjściowy do zaprojektowanych syntez. W pierwszym etapie atom chloru w pozycji C-4 pierścienia pirydyny został poddany reakcji podstawienia (**1-4**). Podstawione pochodne pikolinonitrylu przeprowadzono w metyloiminoestry (**5-8**) w obecności metanolu i DBU, bądź metanolu i sodu metalicznego. Następnie w wyniku reakcji metyloiminoestrów z cykloalkiloaminokarbotiohydrazynami otrzymano pochodne cykloalkiloaminotiosemikarbazydowe (**9-24**) posiadające fragment amidrazonowy. W celu otrzymania pozostałych pochodnych o budowie tiosemikarbazydowej, metyloiminoestry w reakcji z hydrazyną lub metylohydrazyną zostały przeprowadzone w amidrazony (**25-32**), które następnie poddano reakcji z odpowiednimi izotiocyjanianami (**33-64**). Kolejną serię związków stanowiły pochodne iminowe (**65-80**), które otrzymano w wyniku kondensacji amidrazonów z aldehydami.

Zaprojektowano także reakcje cyklizacji amidrazonów lub metyloamidrazonów z ortomrówczanem trietylu, metyloiminoestrami oraz heterocyklicznymi metyloketonami. Reakcje te miały doprowadzić do otrzymania pochodnych 1,2,4-triazolu. Cyklizacja z udziałem ortomrówczanu trietylu oraz metyloiminoestrem przebiegła zgodnie z założeniami (**81-88**, **93-96**). Natomiast nie udało się otrzymać produktów o budowie cyklicznej w wyniku reakcji amidrazonów z metyloketonami. Efektem tej reakcji były pochodne o budowie łańcuchowej posiadające ugrupowanie azometinowe (**97-112**).

W celu otrzymania hydrazydowych analogów pochodnych iminowych oraz cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych, iminoestry poddano kwasowej hydrolizie przekształcając je w estry (**113-116**). Następnie estry poddano reakcji z hydrazyną, otrzymując hydrazydy (**117-120**). Hydrazydy stanowiły punkt wyjściowy do pozostałych syntez. W wyniku ich kondensacji z aldehydami otrzymano związki o budowie iminowej (**121-136**) będące analogami uprzednio otrzymanych pochodnych iminowych, w których grupa aminowa jest zastąpiona grupą karbonylową. Ponadto hydrazydy zostały poddane reakcji cyklizacji z CS_2 w obecności KOH, tworząc odpowiednie oksadiazolotiony (**137-140**). W wyniku ich reakcji z odpowiednią aminą cykliczną pierścień heterocykliczny uległ otwarciu tworząc pochodne cykloalkiloaminotiosemikarbazydowe posiadające w swojej strukturze grupę karbonylową (**141-156**).

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono syntezę 156 związków. Struktura otrzymanych pochodnych została potwierdzona za pomocą spektroskopii IR, ^{1}H NMR oraz analizy elementarnej. Dla wybranych związków analiza strukturalna została poszerzona o spektroskopię ^{13}C NMR, analizę rentgenograficzną oraz widmo temperaturowe ^{1}H NMR.

Produkty końcowe zostały poddane ocenie aktywności biologicznej pod kątem działania tuberkulostatycznego. Badanie zostało przeprowadzone na dwóch szczepach *Mycobacterium tuberculosis:* standardowym H37Rv oraz szczepie klinicznym izolowanym od pacjentów Spec. 210, który wykazał oporność wobec izoniazydu, rifampicyny, etambutolu oraz kwasu *p*-aminosalicylowego. Amidrazonowe pochodne cykloalkiloaminotiosemikarbazydowe wykazywały najwyższą aktywność przeciwprątkową. Pięć spośród badanych związków wykazywało zdolność do hamowania wzrostu bakterii (MIC 0,4-3,1 μg/ml) wyższą lub porównywalną z lekiem referencyjnym, jakim był izoniazyd. Zaobserwowano, iż w tej grupie związków obecność pierścienia morfoliny lub pirolidyny przy łańcuchu tiosemikarbazydowym ma znaczny wpływ na wzrost aktywności.

Dla amidrazonowych i hydrazydowych pochodnych cykloalkiloamino-tiosemikarbazydowych wykonano również poszerzone badania mikrobiologiczne wobec

panelu bakterii G(+), G(-) oraz drożdży w celu sprawdzenia selektywności działania. Cykloalkiloaminotiosemikarbazydy o budowie amidrazonowej zostały także przebadane pod kątem działania cytotoksycznego na linii komórkowej fibroblastów ludzkiego naskórka (HDF) oraz czerniaka mysiego (B16-F10).

Otrzymane wyniki pozwoliły przeprowadzić jakościową analizę zależności struktura aktywność, określić elementy strukturalne odpowiedzialne za występowanie aktywności oraz wybrać grupę związków o najwyższym potencjale tuberkulostatycznym.

SUMMARY

The search for new antitubercular drugs is still a current research topic due to the increasing resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, the emergence of multidrug resistant strains (MDR-TB) and extensively drug resistant strains (XDR-TB). Moreover, the growing phenomenon of human migration results in problems not only in the political, social or economical sector but also in the medical one. The mass movement of people creates a real threat for epidemiological safety resulting from other virulence and resistance patterns of bacterial strains present in migrant countries. In the group of thiosemicarbazide and pyridine derivatives the high biological potential of inhibiting growth of *Mycobacterium tuberculosis* was observed. The similar trend was confirmed by the research team from the Department of Organic Chemistry at the Medical University of Gdańsk.

In the theoretical part isoniazid and its derivatives were characterized. Compounds with tuberculostatic activity tested in various phases of clinical trials were also presented. In addition, a literature review about antimycobacterial activity of compounds with pyridine and hydrazinecarbothioamide moiety was conducted.

In the presented dissertation the synthesis of novel picolinonitrile derivatives was designed. Derivatives with thiosemicarbazide, imine and 1,2,4-triazole structures occurred among the designed compounds.

4-Chloropicolinonitrile possessing pyridine ring in its structure was a starting substrate to designed syntheses. In the first step the chlorine atom at the C-4 position of the pyridine ring underwent the substitution reaction (**1-4**). Substituted picolinonitrile derivatives were converted into methyliminoesters (**5-8**) in the presence of methanol and DBU or methanol and metallic sodium. Subsequently the cycloalkylaminethiosemicarbazide derivatives (**9-24**) with amidrazone moiety were obtained in the reaction between methyliminoesters and cycloalkylamino-1-carbothiohydrazides. In order to obtain remaining compounds with thiosemicarbazide moiety, methyliminoesters were converted in the reaction with hydrazine or methylhydrazine to the amidrazones (**25-32**), which then reacted with appropriate isothiocyanates (**33-64**). The next series of compounds were imine derivatives (**65-80**) which were obtained by condensation of amidrazones with aldehydes.

The cyclization reactions of amidrazones or methylamidrazones with triethyl orthoformate, methyliminoesters and heterocyclic methylketones were also designed. These reactions led to obtain the 1,2,4-triazole derivatives. Cyclization with triethyl orthoformate and methyliminoester proceeded as predicted (**81-88**, **93-96**). However, the products with cyclic

structure in the reaction between amidrazones and methylketones were not obtained. The effect of these reactions were derivatives of chain structure possessing an azomethine group (**97-112**).

In order to obtain hydrazide analogues of imine and cycloalkylaminethiosemicarbazide derivatives iminoesters were subjected to the acidic hydrolysis reactions. These reactions transformed iminoesters into esters (**113-116**). Then hydrazides (**117-120**) were received in the reaction between hydrazine and appropriate esters. The hydrazides were the starting point for further syntheses. As the results of their condensation with aldehydes compounds with imine structure (**121-136**) were obtained. The compounds were analogues of previously obtained imine derivatives, in which the amino group was replaced with a carbonyl group. Moreover, hydrazides were subjected to the cyclization reactions with CS_2 in the presence of KOH to form oxadiazolothiones (**137-140**). As a result of their reactions with the cyclic amines the heterocyclic rings were opened to form cycloalkylaminethiosemicarbazide derivatives with a carbonyl group in their structure (**141-156**).

As a part of this dissertation 156 compounds were synthesized. The structure of obtained compounds were confirmed by IR, ^{1}H NMR spectroscopy and elemental analysis. For selected compounds the structural analysis was extended by ^{13}C NMR spectroscopy, X-ray analysis and ^{1}H NMR temperature spectra.

The final products have been evaluated for their antitubercular activity. The study was conducted on two *Mycobacterium tuberculosis* strains: standard H37Rv and “wild-type” strain isolated from patients Spec. 210, which is resistant against isoniazid, rifampicin, ethambutol and p-aminosalicylic acid.

Amidrazone derivatives of cycloalkylaminethiosemicarbazide exhibited the highest antimycobacterial activity. Five of the tested compounds have the ability to inhibit mycobacterial growth (MIC 0,4-3,1 μg/mL) higher or comparable to the reference drug isoniazid. It was observed that the presence of morpholine or pyrrolidine ring at the end of thiosemicarbazide chain have substantial influence on the increase of antitubercular activity of this group of compounds.

Extended microbiological assays against on bacteria G(+), G(-) and yeasts were performed for amidrazone and hydrazide derivatives of cycloalkylaminethiosemicarbazide to check their selectivity. Cycloalkylaminethiosemicarbazides with amidrazone moiety were also tested for their cytotoxic activity on human dermal fibroblasts (HDF) and mouse melanoma cell line (B16-F10).

Received results allowed to conduct the qualitative analysis of structure activity relationship, determine the structural element significant for tuberculostatic activity and select a group of compounds with the highest antitubercular potential.