

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **219186**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **399048**

(22) Data zgłoszenia: **30.04.2012:**

(51) Int.Cl.

C07F 9/40 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

(54) **Estry di-(4-metylotio)fenylowe pochodne kwasów 1-izotiocyjano-metanofosfonowych,
sposób ich wytwarzania i zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
08.10.2012 BUP 21/12

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.03.2015 WUP 03/15

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

MATEUSZ PSURSKI, Kutno, PL

ŁUKASZ WINIARSKI, Zielona Góra, PL

MARTA PIGUŁA, Wrocław, PL

JÓZEF OLEKSYSZYN, Siechnice, PL

JOANNA WIETRZYK, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Meissner

PL 219186 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są estry di-(4-metylotio)fenylowe pochodne kwasów 1-izotiocyjano-metanofosfonowych, sposób ich wytwarzania oraz zastosowanie przeciwnowotworowe.

W literaturze przedmiotu, m.in. w Psurski i współ. "Synthesis and antiproliferative activity of novel α - and β -dialkoxyposphonylated isothiocyanates" *Bioorg. and Medicinal Chemistry Letters* 21 (2011) 4572-4576", opisane zostały estry dialkilowe kwasów 1-izotiocyjano-metanofosfonowych, które ze względu na wysoką reaktywność grupy izotiocyjanianowej znalazły zastosowanie w szeregu transformacji syntetycznych. Dla przykładu znalazły zastosowanie w reakcjach prowadzących do uzyskania tiomocznikowych pochodnych peptydów (m.in. Jing-Zi i współ. „Synthesis and in vitro study of pseudo-peptide thioureas containing α -aminophosphonate moiety as potential antitumor agents" *Eur. Journal of Med. Chemistry* 45 (2010) 5108-5112), które mogą być wartościowymi związkami wykazującymi aktywność biologiczną, w szczególności przeciwnowotworową. W literaturze opisano również syntezę szeregu Cbz (benzyloksykarbonylo)-zablokowanych, fosfonowych pochodnych aminokwasów, które jednakże nie wykazały aktywności antyproliferacyjnej (przeciwnowotworowej) w warunkach *in vitro* (Sieńczyk i współ. „Simple phosphonic inhibitors of human neutrophil elastase" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21 (2011) 1310-1314).

Ze stanu techniki wiadomo, iż grupa izotiocyjanianowa odpowiedzialna jest za szybką akumulację związków w komórkach eukariotycznych na drodze dyfuzji biernej (opisane m.in. w Zhang Y. *Molecular mechanism of rapid cellular accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates. Carcinogenesis*. 2001; **22**(3): 425-31) i szereg aktywności biologicznych (opisane m.in. w pracy przeglądowej Zhang Y. *The molecular basis that unifies the metabolism, cellular uptake and chemopreventive activities of dietary isothiocyanates. Carcinogenesis*. 2012; **33**(1): 2-9.).

Ze stanu techniki wiadomo jest, iż estry difenylowe fosfonianów odpowiedzialne są za aktywność inhibitorową przeciwko proteazom serynowym opisane m.in. w Sieńczyk i współ. „Simple phosphonic inhibitors of human neutrophil elastase" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21 (2011) 1310-1314.

Z publikacji Psurski i współ. „Synthesis and antiproliferative activity of novel α - and β -dialkoxyposphonylated isothiocyanates" *Bioorg. and Medicinal Chemistry Letters* 21 (2011) 4572-4576) znany jest sposób wytwarzania estrów dialkilowych 1-izotiocyjano-aralkilofosfonianów, polegający na tym, że jako substratu użyto chlorowodorków estrów dialkilowych kwasów 1-amino-aralkilofosfonowych, który z wykorzystaniem disiarczku węgla w obecności aminy i tetrafluoroboran 2-(1H-benzotriazolo-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametyloaminiowy (TBTU) przekształcany jest w docelowy związek – ester dialkilowy kwasu 1-izotiocyjano-aralkilofosfonowego.

W literaturze naukowej i patentowej nie są znane estry di-(4-metylotio)fenylowe pochodne kwasów 1-izotiocyjano-metanofosfonowych, jak również sposoby ich wytwarzania oraz zastosowanie.

Istotą rozwiązania według wynalazku są estry di-(4-metylotio)fenylowe pochodne kwasów 1-izotiocyjano-metanofosfonowych o wzorze ogólnym 1, w których R_1 oznacza podstawniki: propylowy, izopropylowy, sec-butyłowy, benzylowy, 4-metoksyfenylowy, 3,5-dimetoksyfenylowy.

Istotą rozwiązania według wynalazku jest również sposób wytwarzania estrów di-(4-metylotio)fenylowych pochodnych kwasów 1-izotiocyjanometanofosfonowych o wzorze ogólnym 1, w którym R_1 oznacza podstawniki: propylowy, izopropylowy, sec-butyłowy, benzylowy, 4-metoksyfenylowy, 3,5-dimetoksyfenylowy, polegający na tym, że otrzymuje się w reakcji tróchlorku fosforu z 4-metylotiofenolem w acetonitrylu w temperaturze wrzenia przez 2 – 4 godziny fosforyn tri-(4-metylotio)fenylowy, który następnie poddaje się reakcji z odpowiednim aldehydem wybranym spośród aldehydu butylowego, *izo*-masłowego, 2-metylobutyłowego, fenylooctowego, 4-metoksybenzaldehydu, 3,5-dimetoksybenzaldehydu oraz karbaminianem benzylu i otrzymuje się N-(benzyloksykarbonylo) zablokowaną pochodną estru di-(4-metylotio)fenylowego pochodną kwasu 1-amino-metanofosfonowego, którą poddaje się standardowej deprotekcji z użyciem 3-5 ekwiwalentów molowych 33% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym i otrzymuje się bromowodorek estru di-(4-metylotio)fenylowego pochodną kwasu 1-amino-metanofosfonowego, po czym poddaje się go reakcji z 10-15 ekwiwalentami molowymi disiarczku węgla w obecności 4-6 ekwiwalentów molowych diizopropyletyloaminy w *N,N*-dimetyloformamidzie w temperaturze pokojowej, a następnie po 20-30 minutach i powstały produkt pośredni rozkłada się do izotiocyjanianu, przy czym w reakcji wykorzystuje się 1,5 równoważnika molowego heksafluorofosforanu 2-(1H-benzotriazolo-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylo-uroniowego.

Istotą rozwiązania według wynalazku są estry di-(4-metylotio)fenylowych pochodnych kwasów 1-izotiocyjano-metanofosfonowych o wzorze ogólnym 1, w których R_1 oznacza podstawniki: propylo- wy, izopropylowy, sec-butylo- wy, benzylowy, 4-metoksyfenylowy, 3,5-dimetoksyfenylowy do stosowa- nia w preparacie farmaceutycznym przeznaczonym do leczenia nowotworów płuc, piersi, jelita grube- go ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów opornych na dokсорubicynę. Podstawową zaletą wyróżniającą związki będące przedmiotem wynalazku spośród strukturalnie zbliżonych związków, jest obecność w jednej cząsteczce dwóch grup funkcyjnych wykazujących niezależnie od siebie aktywność biologiczną. Zaletą sposobu według wynalazku jest prostota procesu oczyszczania produktu, a także wysoka wydajność reakcji i wysoka czystość otrzymywanych produktów.

Wynalazek został bliżej przedstawiony we wzorach strukturalnych oraz w przykładach jego re- alizacji.

Przykład 1

Sposób wytwarzania estru di-(4-metylotio)fenylowego kwasu 1-izotiocyjano-(propylo)metano- fosfonowego związek o **wzorce 2**.

Etap 1. Otrzymywanie fosforynu trój-4-metylotiofenylowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszałko magnetyczne dodaje się 5 g (36 mmola) 4-metylotiofenolu i 20 ml acetonitrylu. Po rozpuszczeniu do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 1,065 ml (12 mmola) chlorku fosforu (III). Całość ogrzewa się przez 3 godziny w temperaturze wrzenia. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio, bez oczyszczania do kolejnego etapu.

Etap 2. Otrzymywanie estru di-4-metylotiofenylowego kwasu N-(benzyloksykarbonylo)-1-amino-(propylo)metanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforyn trój-4-metylotiofenylo- wy powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszałko magnetyczne odważa się 1,82 g (12 mmola) karbaminianu benzylu i 1,36 ml (15 mmola) aldehydu butylowego. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 30 ml acetonitrylu mieszaninę reakcyjną schładza się w łaźni lodowej do temperatury około 5°C i dodaje się 0,05 ekwiwalenta molowego kwasu tetrafluoroborowego. Po 40 – 60 minutach powstały produkt odsącza się, a pozostały roztwór odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce rotacyjnej i pozostałość rozpuszcza się w 100 – 150 ml metanolu i umieszcza się w tempera- turze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniej- szonym ciśnieniem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Uzyskuje się 4,78 g surowego produktu ($M=531,13$ g/mol, wzór sumaryczny $C_{26}H_{30}NO_5PS_2$, wydajność 75%). Widmo masowe (ESI, m/z): teo- retyczna/znaleziona 532,1381/532,1406 $[M + H]^+$.

Etap 3. Otrzymywanie bromowodorku estru di-4-metylotiofenylowego kwasu 1-amino-(propylo)- metanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2 g estru di-4-metylotiofenylowego kwasu N-(benzyloksy- karbonylo)-1-amino-(propylo)metanofosfonowego (3,76 mmol) i dodaje się 8 ml 33% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 go- dziny. Następnie lotne składniki mieszaniny reakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietylowego do pierwszego zmęt- nienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 1,7 g ($M=477,02$ g/mol, wzór sumaryczny $C_{18}H_{25}BrNO_3PS_2$, wydajność 95%) bromowodorku estru di-4- metylotiofenylowego kwasu 1-amino-(propylo)metanofosfonowego.

Etap 4. Otrzymywanie estru di-(4-metylotio)fenylowego kwasu 1-izotiocyjano-(propylo)metano- fosfonowego.

Do kolby gruszkowej o pojemności 100 cm³ odważa się 1000 mg (2,1 mmola, $M = 477,02$ g/- /mol) bromowodorku estru di-(4-metylotio)fenylowego kwasu 1-amino-(propylo)metanofosfonowego i rozpuszcza się w 10 cm³ N,N-dimetyloformamidu (DMF). Następnie do kolby powoli dodaje się 1,3 ml (10eq, 21 mmoli, $M = 76,14$ g/mol, $d = 1,26$ g/ml) disiarczku węgla oraz 1,46 ml (4eq, 8,4 mmoli, $M = 129,24$ g/mol, $d=0,742$ g/ml) N,N-diizopropylomocetylaminu (DIPEA). Reakcję prowadzi się przez 30 minut w temperaturze pokojowej na mieszałce magnetycznej. Następnie do kolby dodaje się 1200 mg (1,5eq, 3,15 mmola, $M = 379,3$ g/mol) heksafluorofosforanu 2-(1H-benzotriazolo-1-ilo)- -1,1,3,3-tetrametylouroniowego (HBTU) i reakcję prowadzi się przez kolejne 30 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 20 cm³ toluenu i odparowuje na

wyparce rotacyjnej. Odparowanie z 20 cm³ toluenu powtarza się dwukrotnie, a następnie pozostały w kolbie olej rozpuszcza się w 30 cm³ toluenu i przenosi się do rozdzielacza o objętości 100 cm³. Warstwę organiczną trzykrotnie ekstrahuje się 30 cm³ wody destylowanej, a następnie dwukrotnie 30 cm³ nasyconego roztworu chlorku sodu. Warstwę organiczną suszy się następnie nad bezwodnym siarczanem magnezu, sączy i lotne składniki usuwa się na wyparce rotacyjnej. Pozostały olej rozpuszcza się w mieszaninie heksan : octan etylu, 3:1(v/v) i przeprowadza się chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym z użyciem eluentu heksan : octan etylu, 3:1(v/v) w efekcie uzyskuje się 792 mg estru di-(4-metylotio)fenyloвого kwasu 1-izotiocyjano-(propylo)metanofosfonowego z wydajnością 86% w postaci klarownego oleju. Wzór sumaryczny C₁₉H₂₂NO₃PS₃. Masa cząsteczkowa 439,05 g/mol.

R_f (heksan; octan etylu, 3:1(v/v)) 0,57

Widmo ³¹P NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): 12,49 (s)

Widmo ¹H NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm], J[Hz]); 7.26 - 6.74 (m, 8H, Ar-H), 4.13 (ddd, J = 17.0, 9.1, 5.4 Hz, 1H, CHP), 2.46 (s, 6H, 2xSCH₃), 2.08 - 1.94 (m, 2H, CH₃CH₂), 1.81 - 1.66 (m, 1H, CH_A), 1.61 - 1.43 (m, 1H, CH_B), 0.99 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

Widmo masowe (ESI, m/z): teoretyczna/znaleziona 462,0397/462,0397 [M+H]⁺

P r z y k ł a d 2

Sposób wytwarzania estru di-(4-metylotio)fenyloвого kwasu 1-izotiocyjano-(izo-propylo)metanofosfonowego związek o **wzorze 3**.

Etap 1. Otrzymywanie fosforynu trój-4-metylotiofenyloвого.

Etap ten przebiega jak w przykładzie 1.

Etap 2. Otrzymywanie estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonylo)-1-amino-(izo-propylo)metanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforyn trój-4-metylotiofenylovery powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się 1,82 g (12 mmola) karbaminianu benzylu i 1,36 ml (15 mmola) aldehydu izomasłowego. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 30 ml acetonitrylu mieszaninę reakcyjną schładza się w łaźni lodowej do temperatury około 5°C i dodaje się 0,05 ekwiwalenta molowego kwasu tetrafluoroborowego. Po 40 – 50 minutach powstały produkt odsącza się, a pozostały roztwór odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce rotacyjnej i pozostałość rozpuszcza się w 100 – 150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Uzyskuje się 5,1 g surowego produktu (M=531,13 g/mol, wzór sumaryczny C₂₆H₃₀NO₅PS₂, wydajność 80%).

Widmo masowe (ESI, m/z): teoretyczna/znaleziona 532,1381/532,1396 [M+H]⁺

Etap 3. Otrzymywanie bromowodoru estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu 1-amino-(izo-propylo)-metanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2 g estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonylo)-1-amino-(propylo)metanofosfonowego (3,76 mmol) i dodaje się 10 ml 33% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny reakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietylowego do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 1,6 g (M = 477,02 g/mol, wzór sumaryczny C₁₈H₂₅BrNO₃PS₂, wydajność 90%) bromowodoru estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu 1-amino-(izo-propylo)metanofosfonowego.

Etap 4. Otrzymywanie estru di-(4-metylotio)fenyloвого kwasu 1-izotiocyjano-(izo-propylo)metanofosfonowego.

Do kolby gruszkowej o pojemności 100 cm³ odważa się 954 mg (2 mmole, M=477,02 g/mol) bromowodoru estru di-(4-metylotio)fenyloвого kwasu 1-amino-(izo-propylo)metanofosfonowego i rozpuszcza się w 15 cm³ N,N-dimetyloformamidu (DMF). Następnie do kolby powoli dodaje się 1,81 ml (15eq, 30 mmoli, M = 76,14 g/mol, d = 1,26 g/ml) disiarczku węgla oraz 1,41 ml (4eq, 8 mmoli, M = 129,24 g/mol, d=0,742 g/ml) N,N-diizopropylouetyloaminy (DIPEA). Reakcję prowadzi się przez 35 minut w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym. Następnie do kolby dodaje się 1140 mg (1,5eq, 3 mmole, M = 379,3 g/mol) heksafluorofosforanu 2-(1H-benzotriazolo-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowego (HBTU) i reakcję prowadzi się przez kolejne 40 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 20 cm³ toluenu i odparowuje na wyparce rotacyjnej. Odparowanie z 20 cm³ toluenu powtarza się dwukrotnie, a następnie pozostały w kolbie olej

rozpuszcza się w 30 cm³ toluenu i przenosi się do rozdzielacza o objętości 100 cm³. Warstwę organiczną trzykrotnie ekstrahuje się 30 cm³ wody destylowanej, a następnie dwukrotnie 30 cm³ nasyconego roztworu chlorku sodu. Warstwę organiczną suszy się następnie nad bezwodnym siarczanem magnezu, sączy i lotne składniki usuwa się na wyparce rotacyjnej. Pozostały olej rozpuszcza się w mieszaninie eter naftowy : octan etylu, 5:1(v/v) i przeprowadza się chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym z użyciem eluentu eter naftowy : octan etylu, 5:1(v/v) w efekcie uzyskuje się 498 mg estru di-(4-metylotio)fenyloвого kwasu 1-izotiocyjano-(izo-propylo)metanofosfonowego z wydajnością 78% w postaci żółtawego, klarownego oleju. Wzór sumaryczny C₁₉H₂₂NO₃PS. Masa cząsteczkowa 439,05 g/mol.

R_f (eter naftowy : octan etylu, 5:1(v/v)): 0,61

Widmo ³¹P NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): 11,73 (s)

Widmo ¹H NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): 7.35 - 7.04 (m, 8H, Av-H), 4.02 (dd, J = 15.4, 4.2 Hz, 1H, CHP), 2.58-2.43 (m, 1H, CH), 2.47 (s, 6H, 2xSCH₃), 1.25-1.14 (m, 6H, 2xCH₃).

Widmo masowe (ESI, m/z): teoretyczna/znaleziona 440,0578/440,0616 [M+H]⁺.

P r z y k ł a d 3

Sposób wytwarzania estru di-(4-metylotio)fenyloвого kwasu 1-izotiocyjano-(sec-butylo)-metanofosfonowego o **wzorze 4**.

Etap 1. Otrzymywanie fosforynu trój-4-metylotiofenyloвого.

Etap ten przebiega jak w przykładzie 1.

Etap 2. Otrzymywanie estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonylo)-1-amino-(sec-butylo)metanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforyn trój-4-metylotiofenylovery powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszkadło magnetyczne odważa się 1,82 g (12 mmola) karbaminianu benzylu i 1,6 ml (15 mmola) aldehydu 2-metylobutyloвого. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 30 ml acetonitrylu mieszaninę reakcyjną schładza się w łaźni lodowej do temperatury około 5°C i dodaje się 0,05 ekwiwalenta molowego kwasu tetrafluoroborowego. Po 40-50 minutach powstały produkt odsącza się, a pozostały roztwór odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce rotacyjnej i pozostałość rozpuszcza się w 100 – 150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Uzyskuje się 4,6 g surowego produktu (M= 545,1460 g/mol, wzór sumaryczny C₂₇H₃₂NO₅PS₂, wydajność 70%).

Widmo masowe (ESI, m/z): teoretyczna/znaleziona 546,1538/546,1539 [M+H]⁺

Etap 3. Otrzymywanie bromowodoru estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu 1-amino-(sec-butylo)-metanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2 g estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonylo)-1-amino-(sec-butylo)metanofosfonowego (3,66 mmol) i dodaje się 10 ml 33% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny reakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietyloвого do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 1,6 g (M=491,03 g/mol, wzór sumaryczny C₁₉H₂₇BrNO₃PS₂, wydajność 90%) bromowodoru estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu 1-amino-(sec-butylo)metanofosfonowego.

Etap 4. Otrzymywanie estru di-(4-metylotio)fenyloвого kwasu 1-izotiocyjano-(sec-butylo)metanofosfonowego.

Do kolby gruszkowej o pojemności 100 cm³ odważa się 1470 mg (3 mmole, M=491,03 g/mol) bromowodoru estru di-(4-metylotio)fenyloвого kwasu 1-amino-(sec-butylo)metanofosfonowego i rozpuszcza 20 cm³ dimetyloformamidu (DMF). Następnie do kolby powoli dodaje się 2,35 ml (13eq, 39 mmoli, M = 76,14 g/mol, d = 1,26 g/ml) disiarczku węgla oraz 3,10 ml (6eq, 18 mmoli, M = 129,24 g/mol, d=0,742 g/ml) N,N-diizopropyluetyloaminy (DIPEA). Reakcję prowadzi się przez 25 minut w temperaturze pokojowej na mieszkadle magnetycznym. Następnie do kolby dodaje się 1720 mg (1,5eq, 4,5 mmola, M=379,3 g/mol) heksafluorofosforanu 2-(1H-benzotriazolo-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowego (HBTU) i reakcję prowadzi się przez kolejne 30 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 30 cm³ toluenu i odparowuje na wyparce rotacyjnej. Odparowanie z 30 cm³ toluenu powtarza się dwukrotnie, a następnie pozostały w kolebie olej rozpuszcza się w 40 cm³ toluenu i przenosi się do rozdzielacza o objętości 100 cm³. Warstwę orga-

niczną trzykrotnie ekstrahuje się 40 cm³ wody destylowanej, a następnie dwukrotnie 30 cm³ nasyconym roztworem chlorku sodu. Warstwę organiczną suszy się następnie nad bezwodnym siarczanem magnezu, sączy i lotne składniki usuwa się na wyparce rotacyjnej. Pozostały olej rozpuszcza się w mieszaninie eter naftowy : octan etylu, 1:1(v/v) i przeprowadza się chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym z użyciem eluentu eter naftowy : octan etylu, 1:1(v/v) w efekcie uzyskuje się 1110 mg estru di-(4-metylotio)fenylowego kwasu 1-izotiocyjano-(sec-butylo)metanofosfonowego z wydajnością 82% w postaci żółtego, klarownego oleju. Wzór sumaryczny C₂₀H₂₄NO₃PS₃. Masa cząsteczkowa 453,06 g/mol

R_f (eter naftowy : octan etylu, 1:1(v/v)): 0,25

Widmo ³¹P NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): 12,28 (s, 1P, 62%), 11,83 (s, 1P, 38%)

Widmo ¹H NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): 7.31 - 7.08 (m, 8H, Ar-H), 4.25 - 3.96 (m, 1H, CHP), 2.46 (s, 6H, 2xSCH₃), 2.29 - 2.13 (m, 1H, CH_A), 1.65 - 1.36 (m, 2H, CH_B, CH), 1.20 (d, J = 6 Hz, 3H, CHCH₃), 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₂CH₃).

Widmo masowe (ESI, m/z): teoretyczna/znaleziona 454,0734/454,0751 [M+H]⁺.

P r z y k ł a d 4

Sposób wytwarzania estru estru di-(4-metylotio)fenylowego kwasu 1-izotiocyjano-(benzylo)metanofosfonowego o **wzorze 5**.

Etap 1 .Otrzymywanie fosforynu trój-4-metylotiofenylowego.

Etap ten przebiega jak w przykładzie 1.

Etap 2. Otrzymywanie estru di-4-metylotiofenylowego kwasu N-(benzyloksykarbonylo)-1-amino-(benzylo)metanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforyn trój-4-metylotiofenylowy powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się 1,82 g (12 mmola) karbaminianu benzylo i 1,4 ml (15 mmola) aldehydu fenyllooctowego. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 30 ml acetonitrylu mieszaninę reakcyjną schładza się w łaźni lodowej do temperatury około 5°C i dodaje się 0,05 ekwiwalenta molowego kwasu tetrafluoroborowego. Po 60 – 80 minutach powstały produkt odsącza się, a pozostały roztwór odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce rotacyjnej i pozostałość rozpuszcza się w 100-150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Uzyskuje się 4,51 g surowego produktu (M= 579,13 g/mol, wzór sumaryczny C₃₀H₃₀NO₅PS₂, wydajność 65%).

Widmo masowe (ESI, m/z): teoretyczna/znaleziona 580,1381/580,1411 [M+H]⁺.

Etap 3. Otrzymywanie bromowodorku estru di-4-metylotiofenylowego kwasu 1-amino-(benzylo)metanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2,5 g estru di-4-metylotiofenylowego kwasu N-(benzyloksykarbonylo)-1-amino-(benzylo)metanofosfonowego (4,31 mmol) i dodaje się 20 ml 33% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 3,5 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny reakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietylowego do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 2,1 g (M=525,01 g/mol, wzór sumaryczny C₂₂H₂₅BrNO₃PS₂, wydajność 95%) bromowodorku estru di-4-metylotiofenylowego kwasu 1-amino-(benzylo)metanofosfonowego.

Etap 4. Otrzymywanie estru di-(4-metylotio)fenylowego kwasu 1-izotiocyjano-(benzylo)-metanofosfonowego.

Do kolby gruszkowej o pojemności 100 cm³ odważa się 1600 mg (4 mmole, M=525,01 g/mol) bromowodorku estru di-(4-metylotio)fenylowego kwasu 1-amino-(benzylo)metanofosfonowego i rozpuszcza w 15 cm³ dimetyloformamidu (DMF). Następnie do kolby powoli dodaje się 2,41 ml (10eq, 40 mmoli, M = 76,14 g/mol, d = 1,26 g/ml) disiarczku węgla oraz 2,76 ml (4eq, 16 mmoli, M = 129,24 g/mol, d=0,742 g/ml) N,N-diizopropyluetyloaminy (DIPEA). Reakcję prowadzi się przez 25 minut w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym. Następnie do kolby dodaje się 2290 mg (1,5eq. mmoli, M = 379,3 g/mol) heksafluorofosforanu 2-(1H-benzotriazolo-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametyluoniowego (HBTU) i reakcję prowadzi się przez kolejne 30 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 30 cm³ toluenu i odparowuje na wyparce rotacyjnej. Odparowanie z 30 cm³ toluenu powtarza się dwukrotnie, a następnie pozostały w kolebie olej rozpuszcza się w 40 cm³ toluenu i przenosi się do rozdzielacza o objętości 100 cm³. Warstwę organiczną

trzykrotnie ekstrahuje się 40 cm³ wody destylowanej, a następnie dwukrotnie 30 cm³ nasyconym roztworem chlorku sodu. Warstwę organiczną suszy się następnie nad bezwodnym siarczanem magnezu, sączy i lotne składniki usuwa się na wyparce rotacyjnej. Pozostały olej rozpuszcza się w mieszaninie eter naftowy : octan etylu, 3:1(v/v) i przeprowadza się chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym z użyciem eluentu eter naftowy : octan etylu, 3:1(v/v) w efekcie uzyskuje się 1520 mg estru di-(4-metylotio)fenyloвого kwasu 1-izotiocyjano-(benzylo)metanofosfonowego z wydajnością 78% w postaci żółtego, klarownego oleju. Wzór sumaryczny C₂₃H₂₂NO₃PS₃. Masa cząsteczkowa 487,59 g/mol.

R_f (eter naftowy : octan etylu, 3:1(v/v)): 0,54

Widmo ³¹P NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): 11,53 (s)

Widmo ¹H NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): 7.44 - 7.10 (m, 13H, Ar-H), 4.30 (ddd, J= 14.4, 11.2, 3.2 Hz, 1H, CHP), 3.44 (ddd, J=14.1, 7.2, 3.3 Hz, 1H, CH_A), 3.16 (ddd, J= 13.9, 11.1, 7.8 Hz, 1H, CH_B), 2.47 (s, 6H, 2xSCH₃).

Widmo masowe (ESI, m/z): teoretyczne/znalezione 488,0578/488,0620 [M+H]⁺.

Przykład 5

Sposób wytwarzania estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu 1-izotiocyjano-(4-metoksyfenylo)-metanofosfonowego o wzorze 6.

Etap 1. Otrzymywanie fosforynu trój-4-metylotiofenyloвого.

Etap ten przebiega jak w przykładzie 1.

Etap 2. Otrzymywanie estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonylo)-1-amino-(4-metoksyfenylo)metanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforyn trój-4-metylotiofenylovery powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszkadło magnetyczne odważa się 1,82 g (12 mmola) karbaminianu benzylu i 1,82 ml (15 mmola) 4-metoksybenzaldehydu. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 30 ml acetonitrylu mieszaninę reakcyjną schładza się w łaźni lodowej do temperatury około 5°C i dodaje się 0,05 ekwiwalenta molowego kwasu tetrafluoroborowego. Po 40 – 50 minutach powstały produkt odsącza się, a pozostały roztwór odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce rotacyjnej i pozostałość rozpuszcza się w 100 – 150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Uzyskuje się 6,1 g surowego produktu (M= 595,66 g/mol, wzór sumaryczny C₃₀H₃₀NO₆PS₂, wydajność 85%).

Widmo masowe (ESI, m/z): teoretyczna/znaleziona 596,1330/596,1397 [M+H]⁺

Etap 3. Otrzymywanie bromowodorku estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu 1-amino-(4-metoksyfenylo)metanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 4 g estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonylo)-1-amino-(4-metoksyfenylo)metanofosfonowego (6,72 mmol) i dodaje się 25 ml 33% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny reakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietylowego do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze - 20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 3,3 g (M=541,45 g/mol, wzór sumaryczny C₂₂H₂₅BrNO₄PS₂, wydajność 90%) bromowodorku estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu 1-amino-(4-metoksyfenylo)metanofosfonowego.

Etap 4. Otrzymywanie estru di-(4-metylotio)fenyloвого kwasu 1-izotiocyjano-(4-metoksyfenylo)-metanofosfonowego.

Do kolby gruszkowej o pojemności 100 cm³ odważa się 1900 mg (3,5 mmole, M=541,45 g/mol) bromowodorku estru di-4-metylotiofenyloвого kwasu 1-amino-(4-metoksyfenylo)metanofosfonowego i rozpuszcza w 15 cm³ dimetyloformamidu (DMF). Następnie do kolby powoli dodaje się 2,11 ml (10eq, 35 mmola, M=76,14 g/mol, d=1,26 g/ml) disiarczku węgla oraz 2,44 ml (4eq, 14 mmola, M=129,24 g/mol, d=0,742 g/ml) diizopropyluetyloaminy (DIPEA). Reakcję prowadzi się przez 30 minut w temperaturze pokojowej na mieszkadle magnetycznym. Następnie do kolby dodaje się 1990 mg (1,5eq, 5,25 mmoli, M = 379,3 g/mol) heksafluorofosforanu 2-(1H-benzotriazolo-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowego (HBTU) i reakcję prowadzi się przez kolejne 30 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 30 cm³ toluenu i odparowuje na wyparce rotacyjnej. Odparowanie z 30 cm³ toluenu powtarza się dwukrotnie, a następnie pozostały w kolebie olej rozpuszcza się w 40 cm³ toluenu i przenosi się do rozdzielacza o objętości 100 cm³. Warstwę orga-

niczną trzykrotnie ekstrahuje się 40 cm³ wody destylowanej, a następnie dwukrotnie 30 cm³ nasyconym roztworem chlorku sodu. Warstwę organiczną suszy się następnie nad bezwodnym siarczanem magnezu, sączy i lotne składniki usuwa się na wyparce rotacyjnej. Pozostały olej rozpuszcza się w mieszaninie heksan : octan etylu, 3:1(v/v) i przeprowadza się chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym z użyciem eluentu heksan ; octan etylu, 3:1(v/v) w efekcie uzyskuje się 1250 mg estru di-4-metylotiofenylowego kwasu 1-izotiocyjano-(4-metoksyfenylo)metanofosfonowego z wydajnością 71% w żółtawego ciała stałego. Wzór sumaryczny C₂₃H₂₂NO₄PS₃. Masa cząsteczkowa 503,59 g/mol.

R_f (heksan : octan etylu, 3:1(v/v)) 0,37

Widmo ³¹P NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): 9,22 (s)

Widmo ¹H NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): 7.24 - 7.08 (m, 6H, Ar-H), 6.95 - 6.84 (m, 4H, Ar-H), 4.74 (d, J= 18,3 Hz, 1H, CHP), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 2.48 (s, 6H, 2XSCH₃)

Widmo masowe (ESI, m/z): teoretyczna/znaleziona 504,0527/504,0510 [M+H]⁺.

Przykład 6

Sposób wytwarzania estru di-4-metylotiofenylowego kwasu 1-izotiocyjano-(3,5-dimetoksyfenylo)-metanofosfonowego o **wzorze 7**.

Etap 1. Otrzymywanie fosforynu trój-4-metylotiofenylowego.

Etap ten przebiega jak w przykładzie 1.

Etap 2. Otrzymywanie estru di-4-metylotiofenylowego kwasu N-(benzyloksykarbonylo)-1-amino-(3,5-dimetoksyfenylo)metanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforyn trój-4-metylotiofenylowy powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się 1,82 g (12 mmola) karbaminianu benzylu i 2,49 g (15 mmola) 3,5-dimetoksybenzaldehydu. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 30 ml acetonitrylu mieszaninę reakcyjną schładza się w łaźni lodowej do temperatury około 5°C i dodaje się 0,05 ekwiwalenta molowego kwasu tetrafluoroborowego. Po 40 – 50 minutach powstały produkt odsącza się, a pozostały roztwór odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce rotacyjnej i pozostałość rozpuszcza się w 100-150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Uzyskuje się 5,62 g surowego produktu (M=625,69/mol, wzór sumaryczny C₃₁H₃₂NO₇PS₂, wydajność 75%).

Widmo masowe (ESI, m/z): teoretyczna/znaleziona 626,1436/626,1594 [M+H]⁺.

Etap 3. Otrzymywanie bromowodorku estru di-4-metylotiofenylowego kwasu 1-amino-(3,5-dimetoksyfenylo)metanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 3,5 g estru di-4-metylotiofenylowego kwasu N-(benzyloksykarbonylo)-1-amino-(3,5-dimetoksyfenylo)-metanofosfonowego (5,6 mmol) i dodaje się 25 ml 33% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny reakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietylowego do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 2,7 g (M=572,47 g/mol, wzór sumaryczny C₂₃H₂₇BrNO₅PS₂, wydajność 85%) bromowodorku estru di-4-metylotiofenylowego kwasu 1-amino-(3,5-dimetoksyfenylo)metanofosfonowego.

Etap 4. Otrzymywanie estru di-(4-metylotio)fenylowego kwasu 1-izotiocyjano-(3,5-dimetoksyfenylo)metanofosfonowego.

Do kolby gruszkowej o pojemności 100 cm³ odważa się 2000 mg (3,5 mmola, M=572,47g /mol) bromowodorku estru di-(4-metylotio)fenylowego kwasu 1-amino-(3,5-dimetoksyfenylo)metanofosfonowego i rozpuszcza w 10 cm³ dimetyloformamidu (DMF). Następnie do kolby powoli dodaje się 2,12 ml (10eq, 35 mmoli, M = 76,14 g/mol, d = 1,26 g/ml) disiarczku węgla oraz 2,42 ml (4eq, 14 mmoli, M=129,24 g/mol, d=0,742 g/ml) N,N-diizopropylouetyloaminy (DIPEA). Reakcję prowadzi się przez 25 minut w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym. Następnie do kolby dodaje się 2980 mg (1,5eq, 7,8 mmola, M=379,3 g/mol) heksafluorofosforanu 2-(1H-benzotriazolo-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowego (HBTU) i reakcję prowadzi się przez kolejne 30 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 30 cm³ toluenu i odparowuje na wyparce rotacyjnej. Odparowanie z 30 cm³ toluenu powtarza się dwukrotnie, a następnie pozostały w kolbie olej rozpuszcza się w 40 cm³ toluenu i przenosi się do rozdzielacza o objętości 100 cm³. Warstwę organiczną trzykrotnie ekstrahuje się 40 cm³ wody destylowanej, a następnie dwukrotnie 30 cm³ nasyconym roztworem chlorku sodu. Warstwę organiczną suszy się następnie nad bezwod-

nym siarczanem magnezu, sączy i lotne składniki usuwa się na wyparce rotacyjnej. Pozostały olej rozpuszcza się w mieszaninie eter naftowy : octan etylu, 1:1(v/v) i przeprowadza się chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym z użyciem eluentu eter naftowy : octan etylu, 1:1(v/v) w efekcie uzyskuje się 1470 mg estru di-(4-metylotio)fenyowego kwasu 1-izotiocyjano-(3,5-dimetoksyfenylo)-metanofosfonowego z wydajnością 79% w postaci żółtego osadu. Wzór sumaryczny $C_{24}H_{24}NO_5PS_3$. Masa cząsteczkowa 533,62 g/mol

R_f (Eter naftowy : octan etylu, 1:1(v/v)) 0,13

Widmo ^{31}P NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]); 8,59 (s)

Widmo 1H NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]); 7.43 - 6.36 (m, 11H, Ar-H), 5.25 (d, J = 18.5 Hz, 1H, CHP), 3.77 (s, 6H, 2xOCH₃), 2.45 (s, 6H, 2xSCH₃)

Widmo masowe (ESI, m/z): teoretyczna/znaleziona 556,0452/556,0435 [M+Na]⁺.

Przykład 7

Badanie aktywności antyproliferacyjnej estrów difenylowych kwasów 1-izotiocyjano-metanofosfonowych z wykorzystaniem linii nowotworowych ludzkiego raka płuc A549, gruczołu sutkowego MCF-7, jelita grubego LoVo oraz jelita grubego odpornej na dokсорubicynę LoVo/DX.

Roztwory wyjściowe testowanych związków przygotowane zostały jako 50 mM roztwory w dime-tylosulfotlenku (DMSO). Linie komórkowe hodowane były w warunkach *in vitro* w odpowiednich dla danej linii medium hodowlanym: A549 – medium OptiMEM + RPMI 1640 + GlutaMAX medium suplementowane 5% surowicy wołowej, MCF-7 – medium Eagle z dodatkiem 2 mM roztworem L-glutaminy, 1,0 mM roztworem pirogronianu sodu, 10% surowicy wołowej i 0,8 mg/L insuliny, LoVo i LoVo/DX – Opti-MEM + RPMI 1640 suplementowane 2 mM roztworem L-glutaminy, 1,5 g/L roztworem wodorowęgla sodu, 4,5 g/L glukozy, 1,0 mM pirogronianu sodu oraz 5% surowicą wołową i 100 µg/L doxorubicyny (tylko w medium dla linii LoVoDX). Ponadto wszystkie media hodowlane zawierały 100 jednostek/ml penicyliny 100 µg/ml streptomycyny. Do odklejenia komórek od płytek hodowlanych używano 0,25% roztworu Trypsyna-EDTA. Następnie policzone komórki posiano na płytce 96-dółkowej w ilości 10⁴ komórek/dółek (100 µL zawiesiny komórkowej 10⁵ komórek/mL na dółek). Po 24 godzinnej inkubacji na płytce nanoszono roztwory testowanych związków przygotowywane poprzez rozcieńczanie wyjściowego roztworu w medium hodowlanym OR. Robocze stężenia wynosiły 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM dając ostatecznie stężenia 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM w dółkach testowych. Każde stężenie naniesiono w trzech powtórzeniach. Płytki były następnie inkubowane przez kolejne 72 godziny w inkubatorze (wilgotność >90%, temperatura 37°C, 5% stężenie CO₂). Po tym czasie wykonano test SRB; do każdego z dółków dodano po 50 µL 50% roztworu kwasu trichlorooctowego i płytki inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 4°C. Następnie płytki wypłukano pod bieżącą wodą, osuszono i do każdego z dółków dodano po 50 µL 0,4% roztworu sulforodaminy B w 1% kwasie octowym i inkubowano w ciemności przez 30 minut. Po tym czasie płytki wypłukano w 1% kwasie octowym, osuszono i do każdego z dółków dodano po 150 µL 10 mM roztworu Tris w wodzie dejonizowanej. Po 30 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej odczytano absorbancję przy długości fali 540 nm. Analizę wyników wykonano poprzez porównanie absorbancji dółków traktowanych związkami w odpowiednich stężeniach do dółków kontrolnych (nie traktowanych związkami). Następnie określono krzywą zależności procenta zahamowania proliferacji od stężenia i na jego podstawie określono wartość IC₅₀ (stężenie powodujące zahamowanie wzrostu komórek w 50%). Test dla każdego ze związków powtórzony został co najmniej trzykrotnie.

Wzór	IC ₅₀ (µM)			
	A549	MCF-7	LoVo	LoVoDX
2	33,6	31,1	22,4	26,1
3	20,6	17,3	12,5	13,0
4	31,1	16,7	10,6	11,4
5	32,5	11,7	9,6	11,3
6	26,5	23,7	15	19,3
7	41,9	24,5	15,3	22,6

Przykład 8

Aktywność inhibitorowa otrzymanych w przykładach 1 – 6 pochodnych wobec ludzkiej elastazy neutrofilowej.

Aktywność biologiczną przebadano pod kątem zdolności do hamowania proteolitycznej aktywności ludzkiej elastazy neutrofilowej. Wszystkie pomiary kinetyki enzymatycznej wykonano przy użyciu czytnika mikroplatek. Badania rozpoczęto od wyznaczenia K_m dla substratu w warunkach prowadzonych testów (temperatura 37°C, długość fali wzbudzenia 400 nm i emisji 505 nm, czas pomiaru 15 minut). Pomiaru dokonano przy różnych stężeniach substratu w zakresie stężeń od 10 μM do 500 μM przy stałym stężeniu enzymu 0,0025 U/ml ($\sim 4,5$ nM). Wartość K_m wynosiła 125 μM w podanych warunkach. Pomiary aktywności inhibitorowej wykonano przy różnych stężeniach inhibitorów w zakresie stężeń od 100 μM do 8,8 μM . W badaniach wykorzystano zsyntetyzowany przez autorów patentu substrat MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-AFC. Końcowe stężenie substratu wynosiło 40 μM . Wszystkie pomiary przeprowadzono w buforze o składzie: 0.1 M HEPES, 0.5 M NaCl, 0.03% Triton X-100 (pH 7.5). Do seryjnie rozcieńczonego badanego związku, w ilości 50 μl w każdym dołku, dodano 50 μl substratu i inkubowano tak przygotowaną płytkę w 37°C przez 30 minut. Po inkubacji reakcja została zainicjowana przez dodanie 100 μl enzymu. Płytkę umieszczono w spektrofлуorymetrze i przeprowadzono pomiar. Na podstawie uzyskanych danych wyznaczono dla każdego rozcieńczenia badanego związku stałą pseudo pierwszego rzędu k_{obs} .

$$[P] = v_s t + \frac{v_i - v_s}{k_{obs}} [1 - e^{(-k_{obs} t)}]$$

v_i - prędkość początkowa

v_s - prędkość w stanie ustalonym

k_{obs} - stała pseudo pierwszego rzędu

$[P]$ - stężenie produktów

t - czas

Następnie wyznaczono stałą drugiego rzędu k_{inact}/K_i

$$\frac{k_{obs}}{[I]} = \frac{k_{inact}}{K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right)}$$

k_{inact}/K_i - stała drugiego rzędu

$[S]$ - stężenie substratów

K_M - stała Michaelis-Menten

Uzyskane wyniki przedstawiono w poniższej tabeli (wartości k_2/K_i [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$])

Wzór	K_2/K_i [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
2	1670
3	602
4	430
5	1010
6	1348
7	60

Zastrzeżenia patentowe

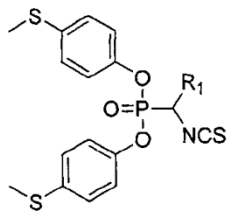
1. Estry di-(4-metylotio)fenylowe pochodne kwasów 1-izotiocyanometanofosfonowych o wzorze ogólnym 1, w których R_1 oznacza podstawniki: propylowy, izopropylowy, sec-butyłowy, benzyłowy, 4-metoksyfenylowy, 3,5-dimetoksyfenylowy.

2. Sposób wytwarzania estrów di-(4-metylotio)fenylowych pochodnych kwasów 1-izotiocyanometanofosfonowych o wzorze ogólnym 1, w którym R_1 oznacza podstawniki: propylowy, izopropylowy,

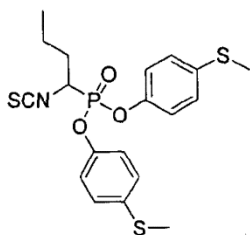
sec-butyłowy, benzylowy, 4-metoksyfenylowy, 3,5-dimetoksyfenylowy, **znamienny tym**, że otrzymuje się w reakcji tróchlorku fosforu z 4-metylotiofenolem w acetonitrylu w temperaturze wrzenia przez 2 – 4 godzin fosforyn tri-(4-metylotio)fenylowy, który następnie poddaje się reakcji z odpowiednim aldehydem wybranym spośród aldehydu butylowego, *izo*-masłowego, 2-metylobutyłowego, fenyllooctowego, 4-metoksybenzaldehydu, 3,5-dimetoksybenzaldehydu oraz karbaminianem benzylu i otrzymuje się N-(benzyloksykarbonylo) zablokowaną pochodną estru di-(4-metylotio)fenylowego pochodną kwasu 1-amino-metanofosfonowego, którą poddaje się standardowej deprotekcji z użyciem 3 – 5 ekwiwalentów molowych 33% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym i otrzymuje się bromowoderek estru di-(4-metylotio)fenylowego pochodną kwasu 1-amino-metanofosfonowego, po czym poddaje się go reakcji z 10 – 15 ekwiwalentami molowymi disiarczku węgla w obecności 4 – 6 ekwiwalentów molowych diizopropylaoetyloaminy w *N,N*-dimetyloformamidzie w temperaturze pokojowej, a następnie po 20 – 30 minutach i powstały produkt pośredni rozkłada się do izotiocyanianu, przy czym w reakcji wykorzystuje się 1,5 równoważnika molowego heksafluorofosforanu 2-(1*H*-benzotriazolo-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowego.

3. Estry di-(4-metylotio)fenylowych pochodnych kwasów 1-izotiocyanometanofosfonowych o wzorze ogólnym 1, w których R_1 oznacza podstawniki; propylowy, izopropylowy, sec-butyłowy, benzylowy, 4-metoksyfenylowy, 3,5-dimetoksyfenylowy do stosowania w preparacie farmaceutycznym przeznaczonym do leczenia nowotworów płuc, piersi, jelita grubego ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów opornych na doksorubicynę.

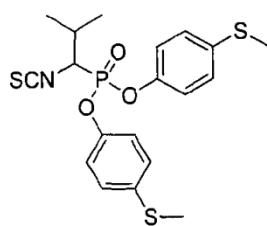
Rysunki



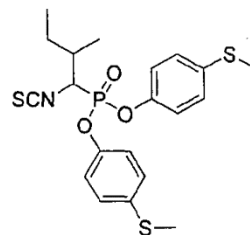
Wzór 1



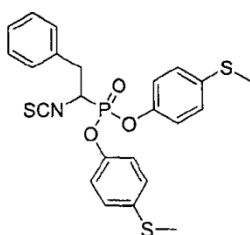
Wzór 2



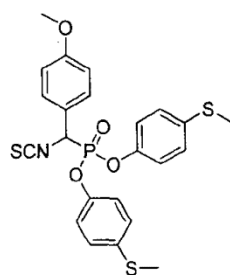
Wzór 3



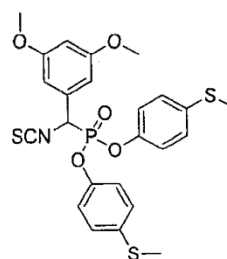
Wzór 4



Wzór 5



Wzór 6



Wzór 7