

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 438355 A1

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **438355**(22) Data zgłoszenia: **2021.07.05**(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.01.09 BUP 02/2023**

(51) MKP:

C07J 43/00 (2006.01)**C07J 9/00** (2006.01)**C07D 233/60** (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)

(71) Zgłaszający:

**UNIwersytet Medyczny
w Białymstoku, Białystok, PL
UNIwersytet w Białymstoku,
Białystok, PL**

(72) Twórca(-y):

**DIANA SAWICKA, Grabówka, PL
AGNIESZKA HRYNIEWICKA, Kleosin, PL
HALINA CAR, Białystok, PL
JACEK MORZYCKI, Białystok, PL**

(74) Pełnomocnik:

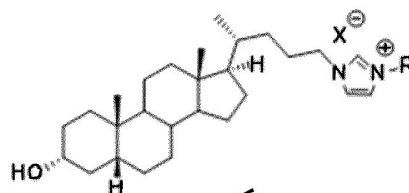
Adam Trawczyński, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

Sól imidazoliowa, będąca pochodną kwasu litocholowego, sposób jej wytwarzania oraz jej zastosowania

(57) Skróć opisu:

Przedmiotem wynalazku jest sól imidazoliowa, będąca pochodną kwasu litocholowego, o wzorze strukturalnym 1: przy czym X jest wybrany z grupy obejmującej: I, Br, Cl, oraz R jest wybrany z grupy obejmującej nierozgałęzione i rozgałęzione grupy alkilowe: -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₈, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃, -C₇H₁₅, -C₈H₁₇, -C₁₂H₂₅, -C₁₆H₃₃, do zastosowania w leczeniu nowotworu. Kolejnymi przedmiotami wynalazku są sól imidazoliowa, będąca pochodną kwasu litocholowego, o wzorze strukturalnym, przy czym X jest wybrany z grupy obejmującej: I, Br, Cl, oraz R jest wybrany z grupy obejmującej nierozgałęzione i rozgałęzione grupy alkilowe: -C₃H₈, -C₄H₉, -C₇H₁₅, -C₈H₁₇, -C₁₂H₂₅, -C₁₆H₃₃, sposób wytwarzania soli imidazoliowej według wynalazku oraz jej zastosowanie jako lek.



WZÓR 1

**Sól imidazoliowa, będąca pochodną kwasu litocholowego, sposób jej
wytwarzania oraz jej zastosowania**

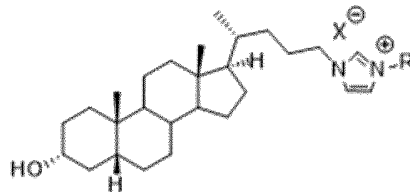
Przedmiotem wynalazku jest sól imidazoliowa, będąca pochodną kwasu litocholowego, sposób jej wytwarzania oraz jej zastosowanie jako lek, zwłaszcza zastosowanie w leczeniu nowotworu.

W opisie patentowym PL 237764 B1 ujawniono steroidowe sole imidazoliowe, sposoby ich wytwarzania oraz ich zastosowanie jako środek bakteriobójczy oraz jako środek przeciwgrzybiczy.

W publikacji Agnieszka Hryniewicka et al.: „Synthesis and antimicrobial properties of steroid-based imidazolium salts”; Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 189 (2019) 65–72 ujawniono steroidowe sole imidazoliowe, sposoby ich wytwarzania oraz ich działanie przeciwbakteryjne oraz przeciwgrzybicze.

Celem wynalazku było opracowanie nowych soli imidazoliowych, będących pochodnymi kwasu litocholowego (LA), które wykazują skuteczne działanie przeciwnowotworowe. Przedstawiono również działanie przeciwnowotworowe soli imidazoliowych, będących pochodną kwasu litocholowego, ujawnionych w publikacji Agnieszka Hryniewicka et al.: „Synthesis and antimicrobial properties of steroid-based imidazolium salts”; Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 189 (2019) 65–72.

Przedmiotem wynalazku jest sól imidazoliowa, będąca pochodną kwasu litocholowego, o wzorze strukturalnym:



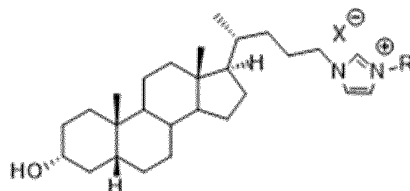
przy czym X jest wybrany z grupy obejmującej: I, Br, Cl, oraz

R jest wybrany z grupy obejmującej nierozgałęzione i rozgałęzione grupy alkilowe: $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}_3\text{H}_8$, $-\text{C}_4\text{H}_9$, $-\text{C}_5\text{H}_{11}$, $-\text{C}_6\text{H}_{13}$, $-\text{C}_7\text{H}_{15}$, $-\text{C}_8\text{H}_{17}$, $-\text{C}_{12}\text{H}_{25}$, $-\text{C}_{16}\text{H}_{33}$,

do zastosowania w leczeniu nowotworu.

Korzystnie nowotwór jest wybrany z grupy obejmującej raka sutka i raka jelita grubego.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sól imidazoliowa, będąca pochodną kwasu litocholowego, o wzorze strukturalnym:

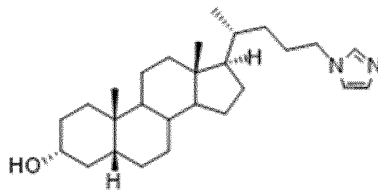


przy czym X jest wybrany z grupy obejmującej: I, Br, Cl, oraz

R jest wybrany z grupy obejmującej nierozgałęzione i rozgałęzione grupy alkilowe: $-\text{C}_3\text{H}_8$, $-\text{C}_4\text{H}_9$, $-\text{C}_7\text{H}_{15}$, $-\text{C}_8\text{H}_{17}$, $-\text{C}_{12}\text{H}_{25}$, $-\text{C}_{16}\text{H}_{33}$.

Korzystnie X oznacza I.

Jeszcze kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania soli imidazoliowej, będącej pochodną kwasu litocholowego, według wynalazku charakteryzujący się tym, że imidazolową pochodną kwasu litocholowego o wzorze strukturalnym:



poddaje się reakcji z R-X w temperaturze od 20 do 100°C przez 2 do 48 h w atmosferze gazu obojętnego,

przy czym X jest wybrany z grupy obejmującej: I, Br, Cl, oraz

R jest wybrany z grupy obejmującej nierozgałęzione i rozgałęzione grupy alkilowe: -C₃H₈, -C₄H₉, -C₇H₁₅, -C₈H₁₇, -C₁₂H₂₅, -C₁₆H₃₃.

Korzystnie reakcję prowadzi się w temperaturze 80°C.

Korzystnie reakcję prowadzi się przez 2 h.

Korzystnie gazem obojętnym jest argon.

Korzystnie stosunek molowy R-X do imidazolowej pochodnej kwasu litocholowego wynosi od 13:1 do 42:1.

Korzystnie X oznacza I.

Jeszcze kolejnym przedmiotem wynalazku jest sól imidazoliowa, będąca pochodną kwasu litocholowego według wynalazku do zastosowania jako lek.

Zaletą nowych soli według wynalazku prosty sposób ich produkcji, wysoka wydajność poszczególnych etapów syntezy oraz łatwość oczyszczania produktów. Ponadto proponowane sole są substancjami wykazującymi znaczną aktywność biologiczną. Sole imidazoliowe, będące pochodnymi kwasu litocholowego charakteryzują się wysoką biokompatybilnością, znaczną aktywnością przeciwnowotworową i niską toksycznością dla organizmu.

Krótki opis figur

Na figurach od Fig. 1 do Fig. 6 zastosowano następujące skróty:

Skrót	Nazwa soli	R=
S1	LA_Me	CH ₃
S2	LA_Et	C ₂ H ₅
S3	LA_Pr	C ₃ H ₇
S4	LA_Bu	C ₄ H ₉
S5	LA_Pen	C ₅ H ₁₁
S6	LA_Hex	C ₆ H ₁₃
S7	LA_Hep	C ₇ H ₁₅
S8	LA_Okt	C ₈ H ₁₇
S9	LA_DoD	C ₁₂ H ₂₅
S10	LA_HexD	C ₁₆ H ₃₃

Fig. 1 przedstawia żywotność fibroblastów skóry linii CRL1475 w obecności badanych soli (S1-S10).

Wyniki przedstawione jako wartości średnie z grupy $\pm$ SD * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ w porównaniu do kontroli.

Fig. 2 przedstawia żywotność komórek nowotworowych jelita grubego linii DLD-1 w obecności badanych soli (S1-S10).

Wyniki przedstawione jako wartości średnie z grupy $\pm$ SD * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ w porównaniu do kontroli.

Fig. 3 przedstawia żywotność komórek nowotworowych jelita grubego linii HT-29 w obecności badanych soli (S1-S10).

Wyniki przedstawione jako wartości średnie z grupy $\pm$ SD * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ w porównaniu do kontroli.

Fig. 4 przedstawia żywotność komórek nowotworowych jelita grubego linii Caco-2 w obecności badanych soli (S1-S10).

Wyniki przedstawione jako wartości średnie z grupy $\pm$ SD * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ w porównaniu do kontroli.

Fig. 5 przedstawia żywotność komórek nowotworowych sutka linii MCF-7 w obecności badanych soli (S1-S10).

Wyniki przedstawione jako wartości średnie z grupy $\pm$ SD * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ w porównaniu do kontroli.

Fig. 6 przedstawia żywotność komórek nowotworowych sutka linii MDA-231 w obecności badanych soli (S1-S10).

Wyniki przedstawione jako wartości średnie z grupy $\pm$ SD * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ w porównaniu do kontroli.

Fig. 7 przedstawia pomiar wielkości wyindukowanych guzów jelita grubego linii DLD-1.

Fig. 8 przedstawia masy wyidukowanych guzów jelita grubego linii DLD-1.

Wyniki przedstawione jako wartości średnie z grupy $\pm$ SD. * $p < 0.05$ w porównaniu do kontroli (DLD-1), • $p < 0.05$ w porównaniu do grupy DLD-1 + 100 mg/kg.

Fig. 9 przedstawia pomiar wielkości wyindukowanych guzów sutka linii MCF-7.

Fig. 10 przedstawia masy wyidukowanych guzów sutka linii MCF-7.

Wyniki przedstawione jako wartości średnie z grupy $\pm$ SD.

Fig. 11 przedstawia schemat syntezy soli imidazoliowych, będących pochodnymi kwasu litocholowego.

Wynalazek został dokładniej wyjaśniony na przykładach, które jednak nie ograniczają jego zakresu.

Przykłady wykonania

Przykład 1

Synteza soli imidazoliowych, będących pochodnymi kwasu litocholowego

Synteza soli imidazoliowych na bazie kwasu litocholowego z podstawnikami metylowym (**LA_Me**), etylowym (**LA_Et**), pentylowym (**LA_Pen**) i heksylowym (**LA_Hex**) została ujawniona w publikacji Hryniewicka, A.; Malinowska, M.; Hauschild, T.; Pieczul, K.; Morzycki, J. W. Synthesis and Antimicrobial Properties of Steroid-Based Imidazolium Salts. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2019**, 189, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.02.006>.

Sole te okazały się skutecznymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi. Ze względu na ich wysoką aktywność biologiczną zostały poddane badaniom w kierunku działania przeciwnowotworowego. Dwie sole o najkrótszej długości łańcucha (**LA_Me** i **LA_Et**) otrzymane zostały z imidazolu podstawionego *N*-steroidem (**LA_steroid**) zgodnie z procedurą opisaną we wspomnianej publikacji Hryniewicka, A. et al. Procedurę zmodyfikowano pod kątem syntezy soli o dłuższych łańcuchach bocznych (Fig. 11). Stosując wysokowrzące jodki alkilowe (jodek propylu, butylu, pentylu, heksylu, heptylu, oktylu, dodecyłu i heksadecylu) reakcję można przeprowadzić w temperaturze 80 °C. Pozwala to na skrócenie czasu reakcji z 24 do 2 godzin. Ponadto wydajność tych reakcji przekraczała 70%, z wyjątkiem soli z 12- i 16-węglowymi łańcuchami bocznymi. Nowa metoda umożliwiła otrzymanie dwóch znanych soli (**LA_Pen** i **LA_Hex**) z dwukrotnie wyższą wydajnością niż dotychczas. W rezultacie otrzymano 10 soli o różnej długości łańcucha, w zależności od użytego jodku alkilowego. Należy podkreślić, że 6 soli (**LA_Pr**, **LA_Bu**, **LA_Hept**, **LA_Oct**, **LA_Dod** i **LA_HexD**) to nowe związki, których syntezę opisano tutaj po raz pierwszy.

Uwagi ogólne

Widma ^1H i ^{13}C NMR zostały rejestrowane na spektrometrze Bruker Avance II (odpowiednio 400 i 100 MHz). Widma masowe zostały wykonane na spektrometrze Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 6530. Widma IR zostały zarejestrowane na spektrometrze Nicolet series II Magna-IR 550 FT-IR. Związki steroidowe 3 α -hydroksy-24-(*N*-imidazolilo)-5 β -cholan (**LA_steroid**) i sole

imidazoliowe: **LA_Me**, **LA_Et** zsyntetyzowano zgodnie z procedurą opisaną w wspomnianej publikacji Hryniewicka, A. et al. Pozostałe odczynniki były handlowo dostępne i zastosowane w takiej postaci, w jakiej zostały zakupione.

Ogólna procedura syntezy soli imidazoliowych

Jodek alkilowy (nadmiar) dodano do steroidu *N*-imidazoliowego (**LA_steroid**) w atmosferze argonu. Jodek alkilowy służy w tej syntezie jako reagent oraz jako rozpuszczalnik. Stosowane jodki alkilowe różnią się masą molową oraz gęstością, w związku z tym nadmiar oznacza, że stosunek molowy jodku alkilowego do **LA_steroidu** wynosi od 13:1 do 42:1. W reakcji tej na każde 50 mg **LA_steroidu** zastosowano 0,5 ml jodku alkilowego. Reakcję prowadzono w 80 °C przez 2 godz. Następnie nadmiar jodku alkilowego usunięto przez przemycie pentanem. Pozostałość rozpuszczono w CH₂Cl₂ (2 ml), produkt wytrącono Et₂O (10 ml) i przesączono. Krystalizację z CH₂Cl₂/Et₂O powtórzono jeszcze dwa razy.

*Jodek *N*-(3 α -hydroksy-5 β -cholan-24-ylo)-*N'*-propyloimidazolilu (**LA_Pr**)*

Postępowano zgodnie z procedurą ogólną stosując **LA_steroid** (50 mg, 0,12 mmol) i jodek propylu (0,5 ml). Otrzymano białą sól z 74% wydajnością (52 mg). IR (ATR) ν = 3345, 2931, 2864, 1555, 1443, 1371, 1156, 1030 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.19 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 4.29 (s, 2H), 4.27 (s, 2H), 3.62 (m, 1H), 0.91 (s, 3H), 0.62 (s, 3H) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 137.2, 121.7, 121.5, 71.8, 56.4, 55.8, 51.7, 50.8, 42.7, 42.1, 40.4, 40.1, 36.4, 35.8, 35.3, 34.5, 32.3, 30.5, 29.7, 28.4, 27.2, 27.0, 26.4, 24.2, 23.7, 23.3, 20.8, 18.6, 12.1, 10.8 ppm; ESI-HRMS *m/z*: obliczono dla [M-I]⁺ C₃₀H₅₁N₂O⁺ 455.3996, znaleziono 455.4011.

*Jodek *N*-(3 α -hydroksy-5 β -cholan-24-ylo)-*N'*-butyloimidazolilu (**LA_Bu**)*

Postępowano zgodnie z procedurą ogólną stosując **LA_steroid** (50 mg, 0,12 mmol) i jodek butylu (0,5 ml). Otrzymano białą sól z 71% wydajnością (51 mg). IR (ATR) ν = 3349, 2927, 2861, 1556, 1444, 1371, 1155, 1031 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.05 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 4.34 (m, 2H),

4.28 (m, 2H), 3.58 (m, 1H), 0.86 (s, 3H), 0.58 (s, 3H) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 136.1, 122.3, 122.1, 71.4, 56.3, 55.7, 50.4, 49.7, 42.5, 41.8, 40.2, 40.0, 36.2, 35.6, 35.2, 34.4, 32.1, 32.0, 30.4, 29.7, 28.2, 27.0, 26.9, 26.2, 24.0, 23.2, 20.6, 19.3, 18.5, 13.4, 11.9 ppm; ESI-HRMS m/z : obliczono dla $[\text{M-I}]^+$ $\text{C}_{31}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}^+$ 469.4152, znaleziono 469.4167.

Jodek N-(3 α -hydroksy-5 β -cholan-24-ylo)-N'-pentyloimidazolilu (LA_Pen)

Postępowano zgodnie z procedurą ogólną stosując **LA_steroid** (50 mg, 0,12 mmol) i jodek pentyłu (0,5 ml). Otrzymano białą sól z 72% wydajnością (53 mg). Dane spektroskopowe zgodne z wartościami literaturowymi¹.

Jodek N-(3 α -hydroksy-5 β -cholan-24-ylo)-N'-heksyloimidazolilu (LA_Hex)

Postępowano zgodnie z procedurą ogólną stosując **LA_steroid** (50 mg, 0,12 mmol) i jodek heksylu (0,5 ml). Otrzymano białą sól z 72% wydajnością (54 mg). Dane spektroskopowe zgodne z wartościami literaturowymi¹.

Jodek N-(3 α -hydroksy-5 β -cholan-24-ylo)-N'-heptyloimidazolilu (LA_Hept)

Postępowano zgodnie z procedurą ogólną stosując **LA_steroid** (50 mg, 0,12 mmol) i jodek heptyłu (0,5 ml). Otrzymano białą sól z 70% wydajnością (54 mg). IR (ATR) ν = 3351, 2929, 2858, 1555, 1441, 1373, 1155, 1032 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.09 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 4.33 (m, 4H), 3.59 (m, 1H), 0.87 (s, 3H), 0.59 (s, 3H) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 136.2, 122.2, 122.1, 71.5, 56.3, 55.7, 50.4, 50.1, 42.6, 41.9, 40.2, 40.0, 36.3, 35.7, 34.4, 32.1, 31.4, 30.4, 30.2, 29.7, 29.6, 28.5, 28.3, 27.03, 27.0, 26.3, 26.0, 24.0, 23.2, 22.4, 20.7, 18.5, 13.9, 11.9 ppm; ESI-HRMS m/z : obliczono dla $[\text{M-I}]^+$ $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}^+$ 511.4622, znaleziono 511.4642.

Jodek N-(3 α -hydroksy-5 β -cholan-24-ylo)-N'-oktyloimidazolilu (LA_Oct)

Postępowano zgodnie z procedurą ogólną stosując **LA_steroid** (50 mg, 0,12 mmol) i jodek oktyłu (0,5 ml). Otrzymano białą sól z 74% wydajnością (58 mg). IR (ATR) ν = 3352, 2930, 2859, 1553, 1442, 1374, 1152, 1030 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.23 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 4.36 (m, 2H),

4.33 (m, 2H), 3.62 (m, 1H), 0.91 (s, 3H), 0.63 (s, 3H) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 136.3, 122.2, 121.9, 71.4, 56.5, 55.7, 50.3, 50.1, 42.6, 42.0, 40.3, 40.0, 36.3, 35.8, 34.3, 32.1, 31.6, 30.4, 30.2, 29.7, 29.6, 29.3, 28.6, 28.3, 27.1, 27.0, 26.4, 26.0, 24.2, 23.3, 22.4, 20.5, 18.4, 13.8, 11.7 ppm; ESI-HRMS m/z : obliczono dla $[\text{M-I}]^+ \text{C}_{35}\text{H}_{61}\text{N}_2\text{O}^+$ 525.4778, znaleziono 525.4802.

Jodek *N-(3 α -hydroksy-5 β -cholan-24-ylo)-N'-dodecyloimidazolilu*
(**LA_DoD**)

Postępowano zgodnie z procedurą ogólną stosując **LA_steroid** (50 mg, 0,12 mmol) i jodek dodecyłu (0,5 ml). Otrzymano białą sól z 64% wydajnością (54 mg). IR (ATR) ν = 3348, 2925, 2858, 1556, 1444, 1371, 1155, 1031 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.09 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 4.31 (m, 4H), 3.62 (m, 1H), 0.87 (s, 3H), 0.59 (s, 3H) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 136.5, 122.1, 121.6, 71.3, 56.7, 55.6, 50.5, 50.3, 42.6, 42.0, 40.4, 40.1, 36.5, 35.9, 35.4, 34.5, 32.3, 31.8, 30.5, 30.4, 30.2, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 28.1, 27.2, 27.0, 26.5, 26.3, 24.3, 23.5, 22.4, 20.4, 18.6, 13.9, 12.1 ppm; ESI-HRMS m/z : obliczono dla $[\text{M-I}]^+ \text{C}_{39}\text{H}_{69}\text{N}_2\text{O}^+$ 581.5404, znaleziono 581.5429.

Jodek *N-(3 α -hydroksy-5 β -cholan-24-ylo)-N'-heksadecyloimidazolilu*
(**LA_HexD**)

Postępowano zgodnie z procedurą ogólną stosując **LA_steroid** (50 mg, 0,12 mmol) i jodek heksadecyłu (0,5 ml). Otrzymano białą sól z 55% wydajnością (50 mg). IR (ATR) ν = 3351, 2932, 2861, 1556, 1443, 1371, 1152, 1031 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.27 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 4.36 (m, 4H), 3.63 (m, 1H), 0.91 (s, 3H), 0.63 (s, 3H) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 136.8, 121.8, 121.7, 71.7, 56.4, 55.8, 50.7, 50.3, 42.7, 42.0, 40.4, 40.1, 36.4, 35.8, 35.3, 34.5, 32.3, 31.9, 30.5, 30.4, 30.3, 30.25, 30.2, 29.7, 29.6, 29.59, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.0, 28.3, 27.1, 27.0, 26.4, 26.2, 24.1, 23.3, 22.6, 20.8, 18.6, 14.1, 12.0 ppm; ESI-HRMS m/z : obliczono dla $[\text{M-I}]^+ \text{C}_{43}\text{H}_{77}\text{N}_2\text{O}^+$ 637.6030, znaleziono 637.6051.

Przykład 2

Badania in vitro

Badanie wpływu soli imidazoliowych, będących pochodnymi kwasu litocholowego na żywotność komórek nowotworowych jelita grubego linii (DLD-1, HT-29, Caco-2), komórek nowotworowych sutka (linii MCF-7, MDA-231) oraz zdrowych komórek fibroblastów skóry linii CRL-1475.

Inkubacja komórek nowotworowych jelita grubego (DLD-1, HT-29, Caco-2) komórek nowotworowych sutka (linii MCF-7, MDA- 231) oraz zdrowych komórek fibroblastów skóry linii CRL-1475.

Cytotoksyczność soli imidazoliowych, będących pochodnymi kwasu litocholowego oceniano wobec komórek nowotworowych jelita grubego linii: DLD-1, HT-29, Caco-2, komórek nowotworowych sutka linii: MCF-7, MDA-231 oraz zdrowych fibroblastach skóry linii CRL-1475 pochodzących z American Type Culture Collection (USA). Komórki nowotworowe hodowano na podłożu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM,) z uzupełnionym 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS, fetal bovine serum), 50 U / ml penicyliny, 50 mg / ml streptomycyny w warunkach fizjologicznych, w 37 ° C z 5% CO₂ pasażowane co 2-3 dni. Komórki hodowano w butelkach do hodowli komórek w ilości 5-7 x 10³ komórek na dołek do pełnej konfluencji. Wykorzystane komórki pochodzą z 6-12 pasażu. W celu przeprowadzenia testu oceny żywotności, komórki zebrano z konfluentnych płytek za pomocą roztworu trypsyny-EDTA oraz PBS (phosphate buffered saline, buforowana fosforanem sól fizjologiczna) i zawieszono w standardowym medium hodowlanym DMEM z dodatkiem 10% PBS o gęstości 1 x 10⁵ komórek/ml. Następnie komórki przeniesiono na płytki 96-dołkowe w objętości 200 µl i gęstości 2 x 10⁴ komórek na dołek i inkubowano przez 22 godziny w temperaturze 37°C i obecności 5% CO₂ z zamiarem przytwierdzenia komórek do podłoża płytek. Po usunięciu medium wprowadzono świeże medium z badanymi substancjami zaś 0,1 % DMSO (dimethyl sulfoxide, dimetylosulfotlenek,) zastosowano jako kontrolę. W celu sprawdzenia cytotoksyczności wszystkie sole rozpuszczono w mieszaninie PBS z DMSO w proporcji 9/1 oraz rozcieńczono w świeżej pożywce do żądanych stężeń (10, 30,

50 i 100 $\mu\text{g/ml}$). Każde stężenie badanej substancji było reprezentowane przez 4 osobne próbki w podwójnym powtórzeniu.

Ocena żywotności komórek – test MTT

Test cytotoksyczności badanych soli wobec komórek nowotworowych jelita grubego komórek nowotworowych jelita grubego linii: DLD-1, HT-29, Caco-2, komórek nowotworowych sutka linii: MCF-7, MDA-231 oraz zdrowych fibroblastach skóry linii CRL-1475 określono metodą testu MTT. Zasada testu opiera się na reakcji, która zachodzi w żywych komórkach i polega na redukcji żółtego rozpuszczalnego bromku 3-(4,5-dimetylo-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium MTT do błękitnego formazanu.

Po 24-godzinnej inkubacji komórek, usunięto medium z badanymi substancjami i każde wgłębienie płytki przepłukano za pomocą 200 μl PBS. Następnie dodano po 180 μl PBS i 20 μl MTT w stężeniu 5 mg/ml (końcowe stężenie MTT we wgłębieniu wynosiło 0,5 mg/ml) i inkubowano w ciemności przez 4 h w temperaturze 37°C i obecności 5% CO_2 . Po upływie wymaganego czasu usunięto PBS i MTT a dodano DMSO w objętości 180 μl /wgłębienie i inkubowano przez 10 minut. Następnie do każdego wgłębienia wprowadzono po 20 μl buforu Sorensens'a (0,1 M glicyna + 0,1 M NaCl, $\text{pH}=10,5$) i zmierzono absorbancję za pomocą spektrofotometru z czytnikiem płytek BioTek Epoch przy długości fali 570 nm. Wyniki absorbancji uzyskane w hodowlach kontrolnych komórek przyjęto za 100%. Żywotność komórek inkubowanych w obecności badanych substancji przedstawiono jako procent wartości kontrolnych.

Wyniki

Badania z zastosowaniem dziesięciu soli imidazoliowych, będących pochodnymi LA o różnej liczbie atomów węgla w łańcuchu kwasu litocholowego (C1-C10) wobec trzech linii komórek nowotworowych jelita grubego (linii: DLD-1, HT-29 oraz Caco-2) oraz dwóch linii (estrogeno- i nieestrogenozależnych) komórek nowotworu sutka (linii: MCF-7 oraz MDA-231) wykazały, iż zastosowanie badanych soli znacząco zahamowało wzrost komórek

nowotworowych jelita grubego linii Caco-2 (od 90% do 50%) (Fig. 4), DLD-1 (od 80% do 40%) (Fig. 2) oraz HT-29 (od 90% do 35%) (Fig. 3). W zakresie komórek raka sutka stwierdzono zahamowanie wzrostu komórek linii MCF-7 (od 85% do 35%) (Fig. 5) natomiast linii MDA-231 (od 95% do 65%) (Fig. 6). Ponadto przeprowadzono badanie cytotoksyczności z wyżej wymienionymi solami na zdrowych komórkach ludzkich fibroblastów linii CRL-1475, uzyskując zahamowanie wzrostu komórek (od 93% do 50%) (Fig. 1).

Przykład 3

Badania in vivo

Model przeszczepu ksenogenicznego z DLD-1 i MCF-7

Wszystkie procedury przeprowadzono zgodnie z Dyrektywą Europejską (2010/63/UE). Badanie wykonano na podstawie uzyskanej wydanej przez Lokalną Komisję Etyczną w Olsztynie nr 74/2019.

Myszy szczepu (Cby.Cg.Foxn1 ^{nu} / cmdb), w wieku 5-6 tygodni, trzymano w monitorowanych warunkach (21 ± 2 ° C, 12 h światło / 12 h cykl ciemności) z nieograniczonym dostępem do wody. Myszom wszczepiono podskórnie komórki nowotworu jelita grubego linii: DLD-1 (1×10^7) lub komórki nowotworu sutka linii: MCF-7 (1×10^6) w mieszaninie Matrigel /PBS w objętości 0,1 ml. Po 7 dniach myszy losowo podzielono na sześć grup (n = 6), którym podawano dożołądkowo raz dziennie przez 28 dni PBS (grupa kontrolna), LA_Hex (100, 300 i 500 mg / kg masy ciała). Objętość guza mierzono dwa razy w tygodniu (co 3-4 dni) za pomocą suwmiarki cyfrowej i obliczano według wzoru: $(0,52 \times \text{szerokość}^2 \times \text{długość})$.

Badanie toksyczności

W celu wstępnej oceny wpływu potencjalnych działań niepożądanych LA_Hex, dodatkowej grupie myszy (n=6) podawano dożołądkowo jeden raz dziennie przez 28 dni LA_Hex w najwyższej dawce (500 mg/kg m.c.). Po 28 dniach myszy uśmiercono, pobrano krew i narządy do dalszych analiz.

Analiza morfologiczna

Badanie morfologiczne krwi pobranej od zwierząt przeprowadzono przy użyciu systemu ABCvet.

Badanie *in vivo* z zastosowaniem soli imidazoliowej LA-Hex u myszy z wszczepionymi komórkami nowotworowymi jelita grubego linii DLD-1

Badanie przeprowadzono w kilku równoległych grupach z wykorzystaniem różnych stężeń soli (100, 300 oraz 500 mg/kg m.c.). Założeniem projektu było określenie efektywnej dawki badanej soli w hamowaniu wzrostu wyindukowanych guzów. Po 28 dniu dożołądkowego podawania soli LA_Hex w dawce 500 mg/kg m.c. zaobserwowano istotne w porównaniu do kontroli (DLD-1) oraz grupy otrzymującej badaną sól w dawce 100 mg/kg ($p < 0.05$) zmniejszenie (do 44%) wzrostu guza nowotworu jelita grubego (Fig. 7 i Fig. 8).

Ponadto, przeprowadzono ocenę toksyczności podawanej soli w dawce 500 mg/kg m.c. u zdrowych zwierząt. Otrzymane wyniki morfologii krwi zwierząt nie wykazały toksycznego działania podawanej soli LA_Hex. Wyniki przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wyniki badania morfologii zwierząt

Parametry	Kontrola	500 mg/kg	DLD-1	DLD-1 + 100 mg/kg	DLD-1 + 300 mg/kg	DLD-1 + 500 mg/kg
WBC [$10^3/\text{mm}^3$]	2,33 ± 0,31	1,83 ± 0,55	2,53 ± 0,45	2,60 ± 0,57	1,53 ± 0,59	0,65 ± 0,31 ^a
RBC [$10^6/\text{mm}^3$]	10,01 ± 0,03	9,91 ± 0,45	8,0 ± 2,40	9,95 ± 0,20	10,38 ± 0,38	10,07 ± 0,69
HGB [g/dl]	14,53 ± 0,12	15,05 ± 0,65	13,63 ± 2,16	14,60 ± 0,42	15,36 ± 0,57	14,53 ± 1,08
HCT [%]	53,43 ± 0,67	53,72 ± 2,38	50,43 ± 9,24	54,55 ± 1,77	52,29 ± 9,42	53,98 ± 4,97
MCV [μm^3]	53,33 ± 0,58	54,17 ± 0,75	54,25 ± 0,50	54,50 ± 0,71	53,82 ± 1,74	53,75 ± 1,50

MCH [pg]	14,50 ± 0,17	15,20 ± 0,25	14,80 ± 0,43	14,65 ± 0,07	14,81 ± 0,24	14,40 ± 0,14
MCHC [g/dl]	27,37 ± 0,12	28,02 ± 0,25	27,18 ± 0,92	26,75 ± 0,21	26,35 ± 4,12	26,88 ± 0,55
PLT [10³/mm³]	731,33 ± 98,43	598,83 ± 201,32	668,50 ± 346,91	497,50 ± 89,80	674,67 ± 123,57	275,25 ± 77,62 b, c

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie + SD ^a p < 0,05 w porównaniu do kontroli, ^b p < 0,05 w porównaniu do grupy DLD-1, ^c p < 0,05 w porównaniu do grupy DLD-1 + 300 mg/kg. Skróty: WBC - białe krwinki krwi, RBC - czerwone krwinki krwi, HGB - hemoglobin, HCT - hematokryt, MCV - średnia objętość erytrocytów, MCH - średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej, MCHC - średnie stężenie hemoglobiny w krwince, PLT - płytki krwi.

Badanie in vivo z zastosowaniem soli imidazoliowej LA-Hex u myszy z wszczepionymi komórkami nowotworowymi sutka linii MCF-7

Badania in vivo przeprowadzono na myszach szczepu CBy.Cg-Fox1/cmdb z wszczepionymi komórkami nowotworu sutka. Badanie przeprowadzono w kilku równoległych grupach z wykorzystaniem różnych stężeń soli (100, 300 oraz 500 mg/kg m.c.). Założeniem projektu było określenie efektywnej dawki badanej soli w hamowaniu wzrostu wyindukowanych guzów. Po 28 dniu dozołdkowego podawania soli LA_Hex w dawce 500 mg/kg m.c. zaobserwowano zmniejszenie wzrostu guza sutka (do 52%) (Fig. 9 i Fig. 10).

Ponadto, przeprowadzono ocenę toksyczności podawanej soli w dawce 500 mg/kg m.c. u zdrowych zwierząt. Otrzymane wyniki morfologii krwi badanych zwierząt nie wykazały toksycznego działania podawanej soli LA_Hex. Wyniki przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Wyniki badania morfologii zwierząt

Parametry	Kontrola	500 mg/kg	MCF-7	MCF-7 + 100 mg/kg	MCF + 300 mg/kg	MCF-7 + 500 mg/kg
WBC [10³/mm³]	2,33 ± 0,31	1,83 ± 0,55	2,25 ± 0,93	2,25 ± 1,74	3,11 ± 1,61	2,53 ± 0,64

RBC [10 ⁶ /mm ³]	10,01 ± 0,03	9,91 ± 0,45	8,42 ± 1,37	9,35 ± 1,09	9,33 ± 1,39	10,04 ± 0,40
HGB [g/dl]	14,53 ± 0,12	15,05 ± 0,65	12,40 ± 2,13	14,38 ± 1,71	14,28 ± 2,17	15,20 ± 0,75
HCT [%]	53,43 ± 0,67	53,72 ± 2,38	47,32 ± 8,02	53,13 ± 6,62	51,87 ± 7,79	55,40 ± 1,20
MCV [μm ³]	53,33 ± 0,58	54,17 ± 0,75	56,25 ± 0,50	56,67 ± 0,52	55,00 ± 0,63	55,00 ± 1,00
MCH [pg]	14,50 ± 0,17	15,20 ± 0,25	14,67 ± 0,17	15,38 ± 0,19	15,30 ± 0,33	15,13 ± 0,15
MCHC [g/dl]	27,37 ± 0,12	28,02 ± 0,25	26,17 ± 0,17	27,13 ± 0,50	27,67 ± 0,28	27,40 ± 0,72
PLT [10 ³ /mm ³]	731,33 ± 98,43	598,83 ± 201,32	213, 25± 90,29	552 ± 272,51	363,33± 169,61	603,67± 218,98

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie + SD. Skróty: WBC - białe krwinki krwi, RBC - czerwone krwinki krwi, HGB - hemoglobina, HCT - hematokryt, MCV - średnia objętość erytrocytów, MCH - średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej, MCHC - średnie stężenie hemoglobiny w krwince, PLT - płytki krwi.

Analiza statystyczna

Wszystkie wyniki wyrażono jako średnią ± odchylenie standardowe (SD). Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu wersji Statistica 13.3 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Do porównania wyników uzyskanych z testu MTT zastosowano międzygrupową analizę dla prób niezależnych (t–studenta). W przypadku badań na zwierzętach analizę wyników przeprowadzono za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie testu porównawczego post hoc Duncana lub Tykeya. Różnice uznawano za istotne statystycznie dla $p < 0,05$.

Wnioski

Na podstawie wykonanych badań i uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

- Nowosyntetyzowane sole imidazoliowe, będące pochodnymi kwasu litocholowego istotnie zmniejszają liczbę komórek

nowotworowych jelita grubego linii DLD-1, HT-29, Caco-2 oraz komórek nowotworowych sutka linii MCF-7 i MDA-231.

- Zastosowanie soli imidazoliowej, będącej pochodną kwasu litocholowego LA_Hex nie jest toksyczne, co wykazały przeprowadzone badania in vivo.
- Zastosowanie soli imidazoliowej LA_Hex powoduje zahamowanie wzrostu oraz zmniejszenie objętości wyindukowanego guza nowotworu jelita grubego linii DLD-1 oraz nowotworu sutka linii MCF-7 na modelu zwierzęcym.

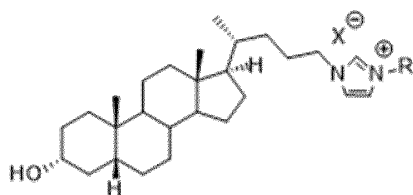
Sole imidazoliowe według wynalazku mają zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych, zwłaszcza w leczeniu raka jelita grubego oraz raka sutka.

Literatura

(1) Hryniewicka, A.; Malinowska, M.; Hauschild, T.; Pieczul, K.; Morzycki, J. W. Synthesis and Antimicrobial Properties of Steroid-Based Imidazolium Salts. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2019**, *189*, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.02.006>.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sól imidazoliowa, będąca pochodną kwasu litocholowego, o wzorze strukturalnym:



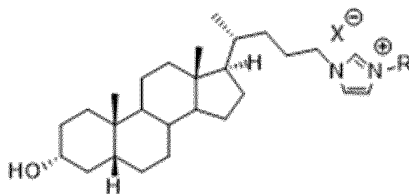
przy czym X jest wybrany z grupy obejmującej: I, Br, Cl, oraz

R jest wybrany z grupy obejmującej nierozgałęzione i rozgałęzione grupy alkilowe: -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₈, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃, -C₇H₁₅, -C₈H₁₇, -C₁₂H₂₅, -C₁₆H₃₃,

do zastosowania w leczeniu nowotworu.

2. Sól imidazoliowa, będąca pochodną kwasu litocholowego, do zastosowania według zastrz. 1 z tym, że nowotwór jest wybrany z grupy obejmującej raka sutka i raka jelita grubego.

3. Sól imidazoliowa, będąca pochodną kwasu litocholowego, o wzorze strukturalnym:

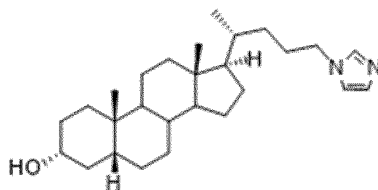


przy czym X jest wybrany z grupy obejmującej: I, Br, Cl, oraz

R jest wybrany z grupy obejmującej nierozgałęzione i rozgałęzione grupy alkilowe: -C₃H₈, -C₄H₉, -C₇H₁₅, -C₈H₁₇, -C₁₂H₂₅, -C₁₆H₃₃.

4. Sól imidazoliowa, będąca pochodną kwasu litocholowego, według zastrz. 3 znamienna tym, że X oznacza I.

5. Sposób wytwarzania soli imidazoliowej, będącej pochodną kwasu litocholowego, określonej w zastrzeżeniach 3-4 znamienny tym, że imidazolową pochodną kwasu litocholowego o wzorze strukturalnym:



poddaje się reakcji z R-X w temperaturze od 20 do 100°C przez 2 do 48 h w atmosferze gazu obojętnego,

przy czym X jest wybrany z grupy obejmującej: I, Br, Cl, oraz

R jest wybrany z grupy obejmującej nierozgałęzione i rozgałęzione grupy alkilowe: -C₃H₈, -C₄H₉, -C₇H₁₅, -C₈H₁₇, -C₁₂H₂₅, -C₁₆H₃₃.

6. Sposób według zastrz. 5 znamienny tym, że reakcję prowadzi się w temperaturze 80°C.

7. Sposób według zastrz. 5 albo 6 znamienny tym, że reakcję prowadzi się przez 2 h.

8. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. 5-7 znamienny tym, że gazem obojętnym jest argon.

9. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. 5-8 znamienny tym, że stosunek molowy R-X do imidazolowej pochodnej kwasu litocholowego wynosi od 13:1 do 42:1.

10. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. 5-9 znamienny tym, że X oznacza I.

11. Sól imidazoliowa, będąca pochodną kwasu litocholowego określona w zastrzeżeniach 3-4 do zastosowania jako lek.

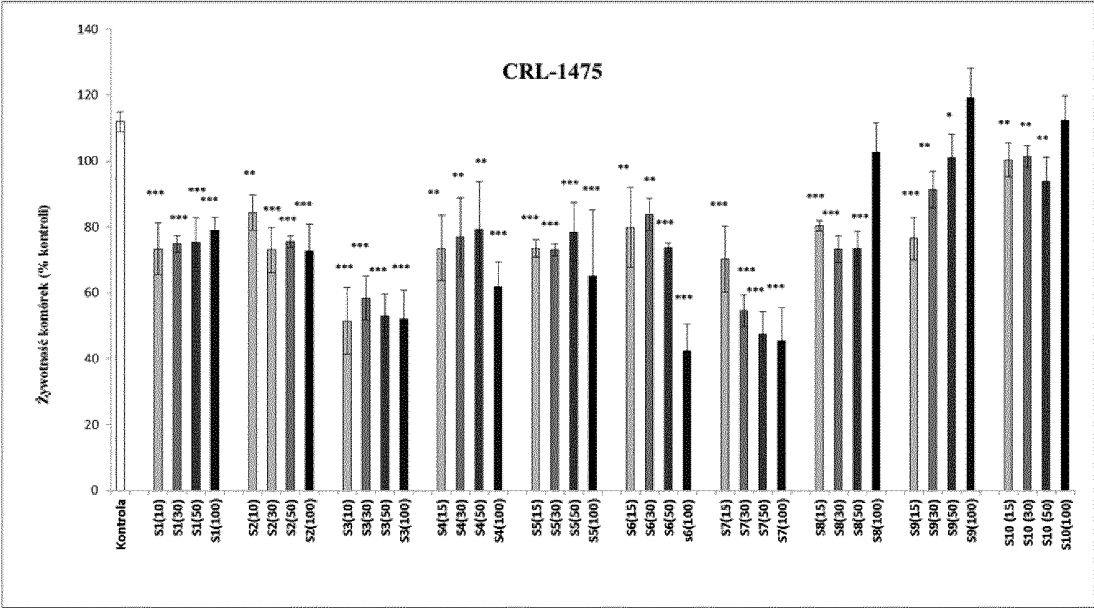


Fig. 1

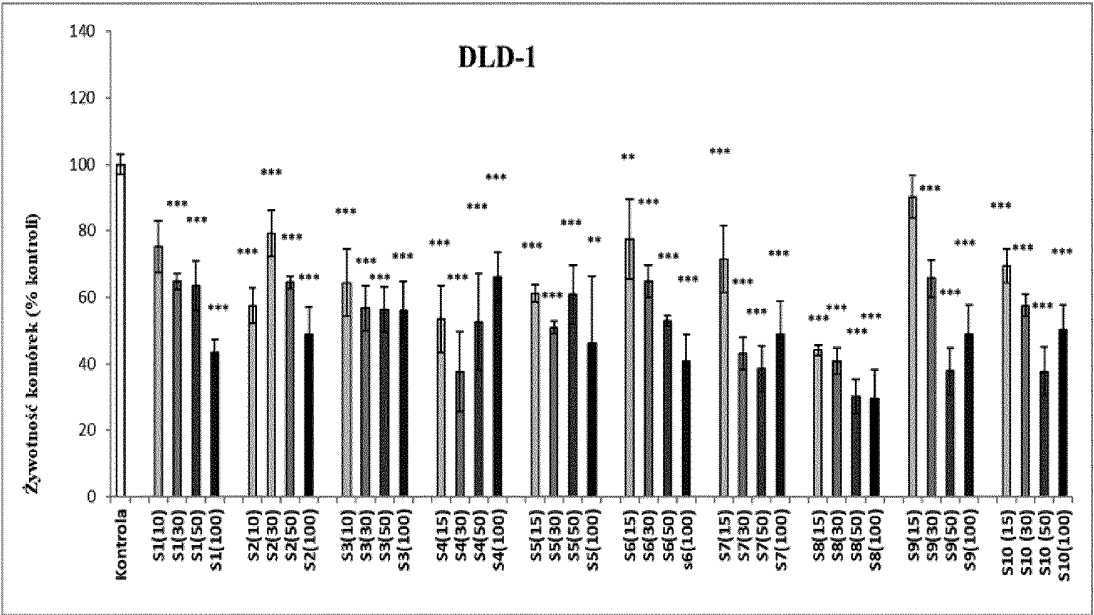


Fig. 2

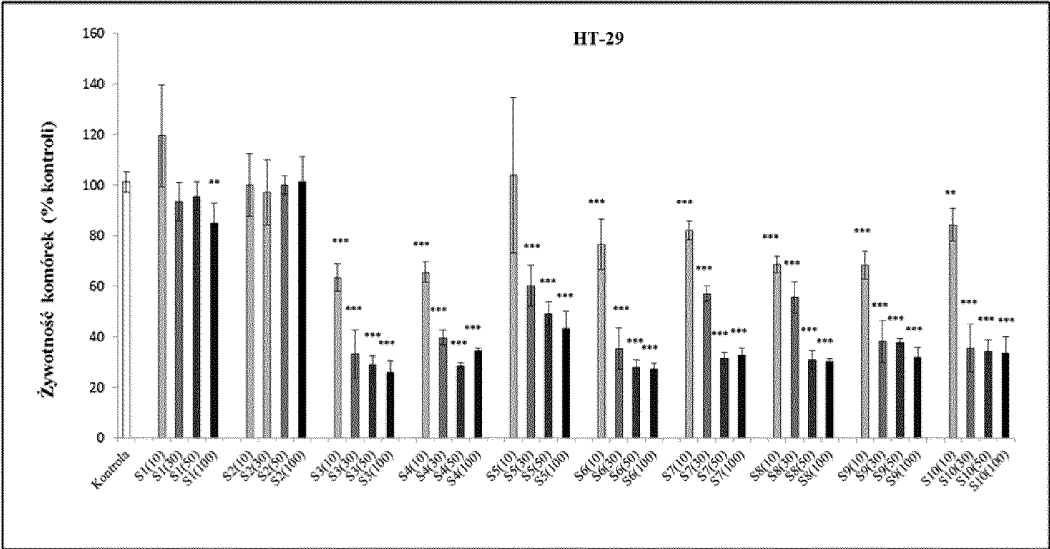


Fig. 3

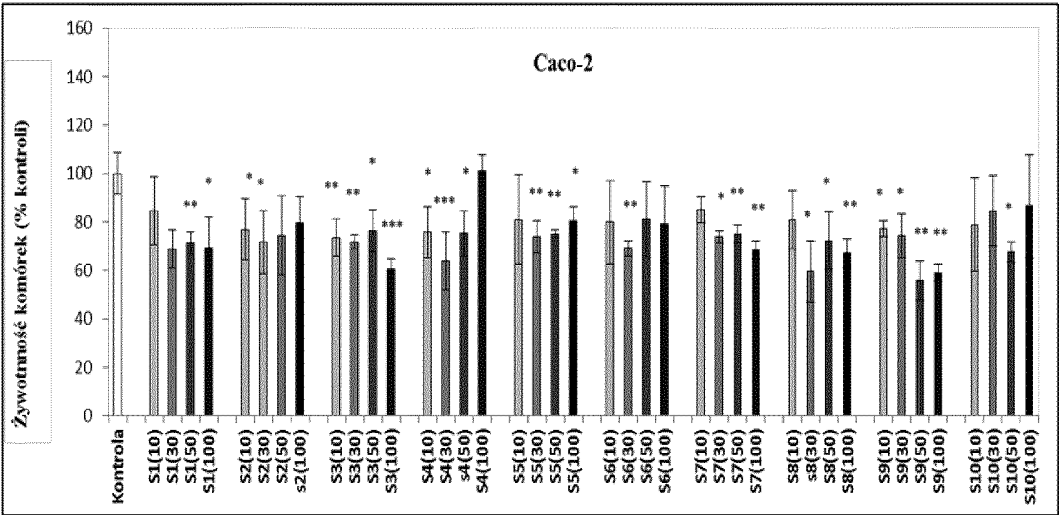


Fig. 4

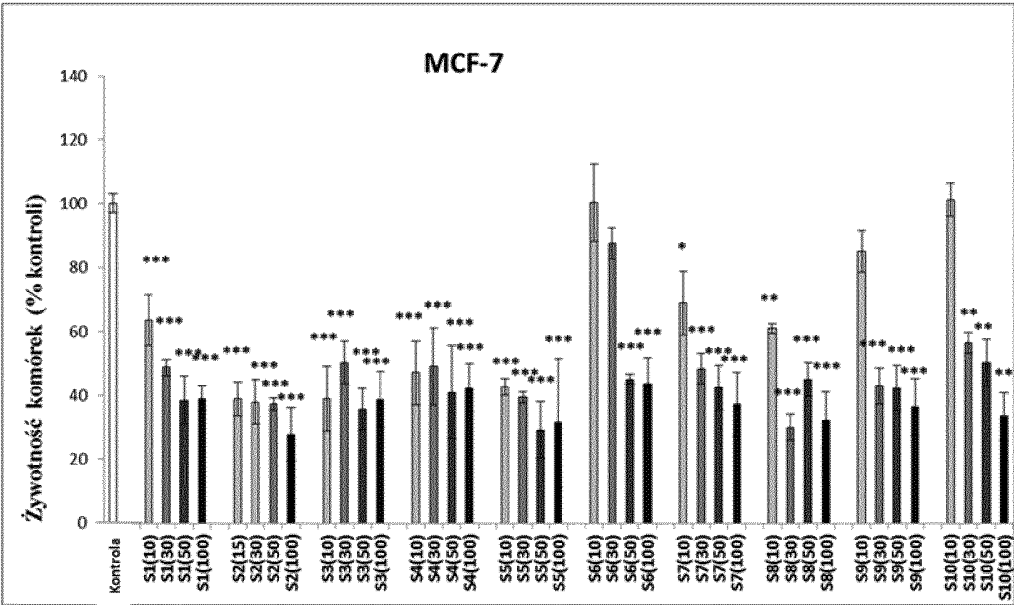


Fig. 5

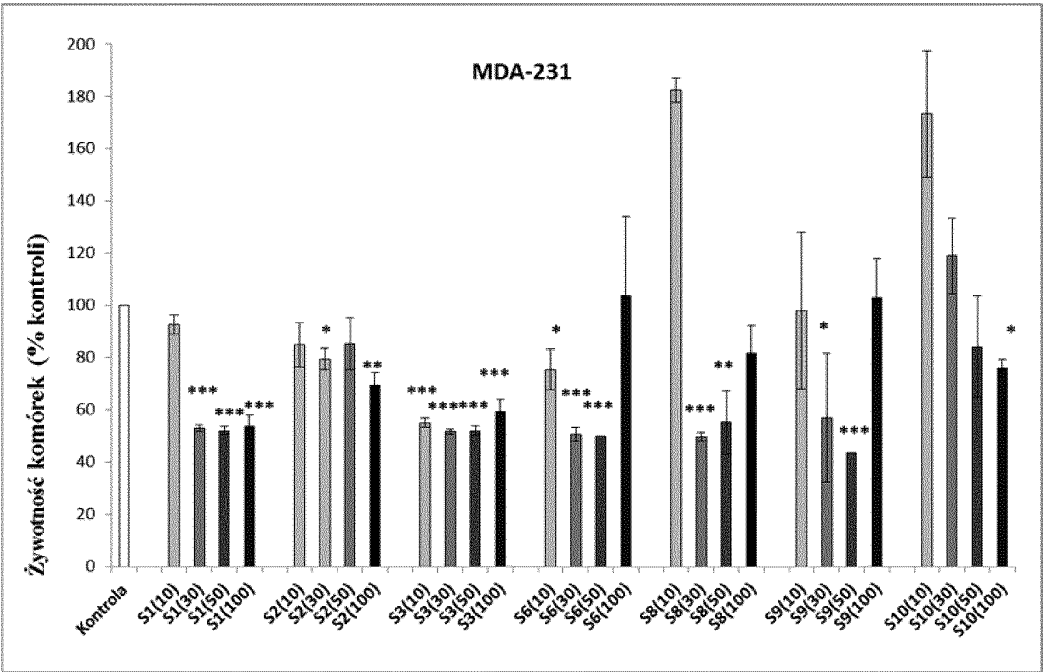


Fig. 6

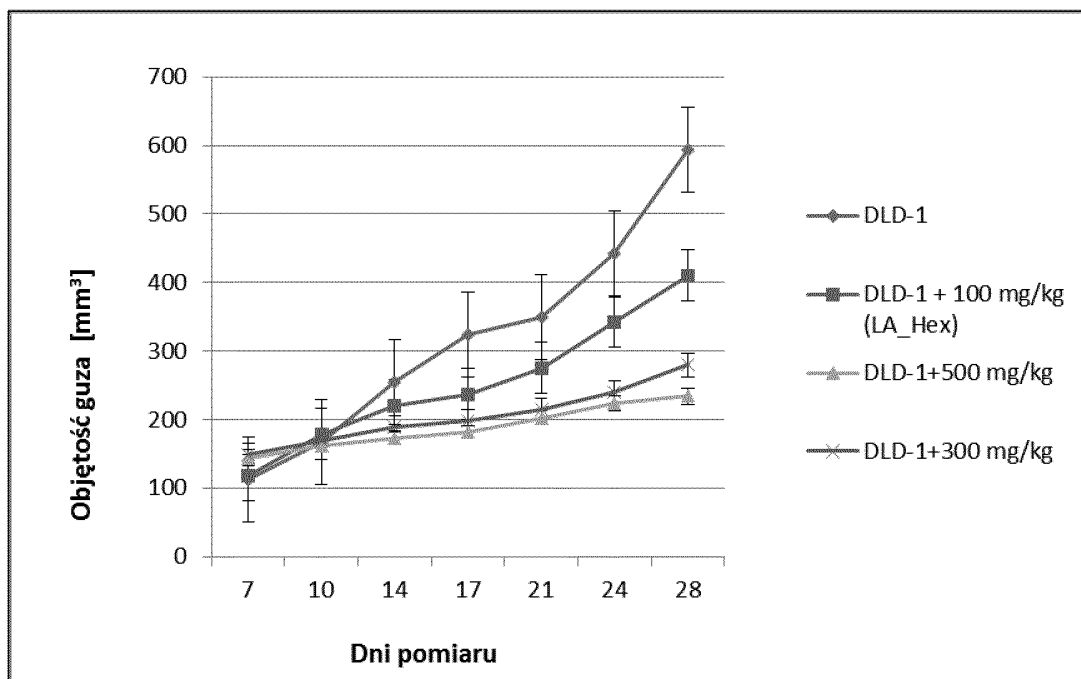


Fig. 7

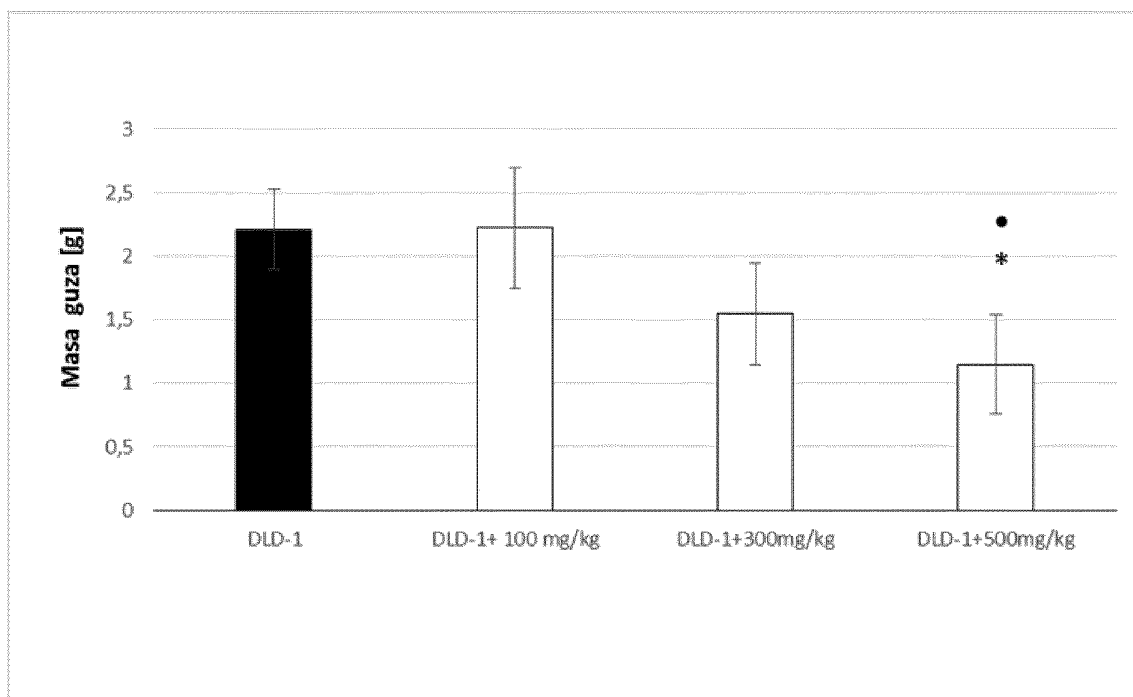


Fig. 8

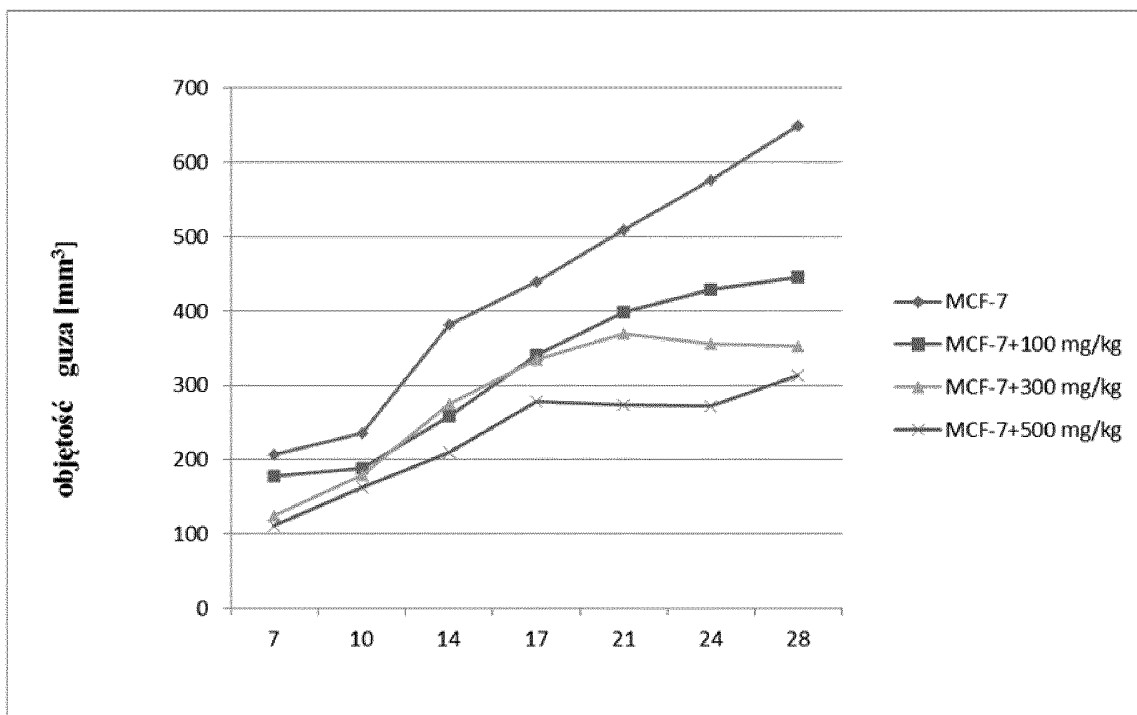


Fig. 9

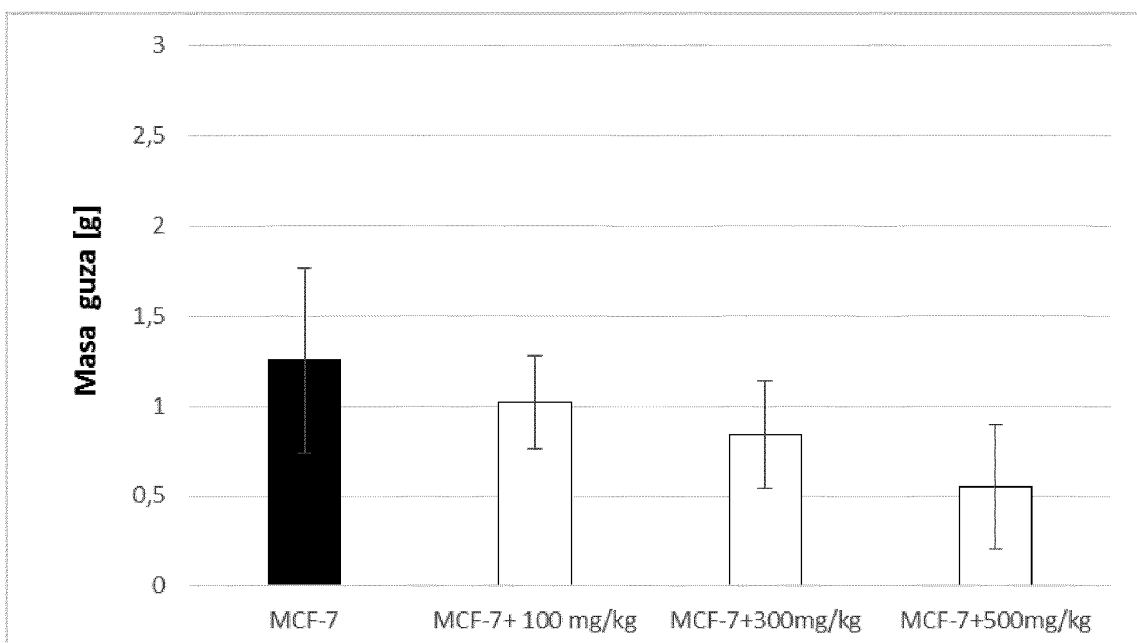


Fig. 10

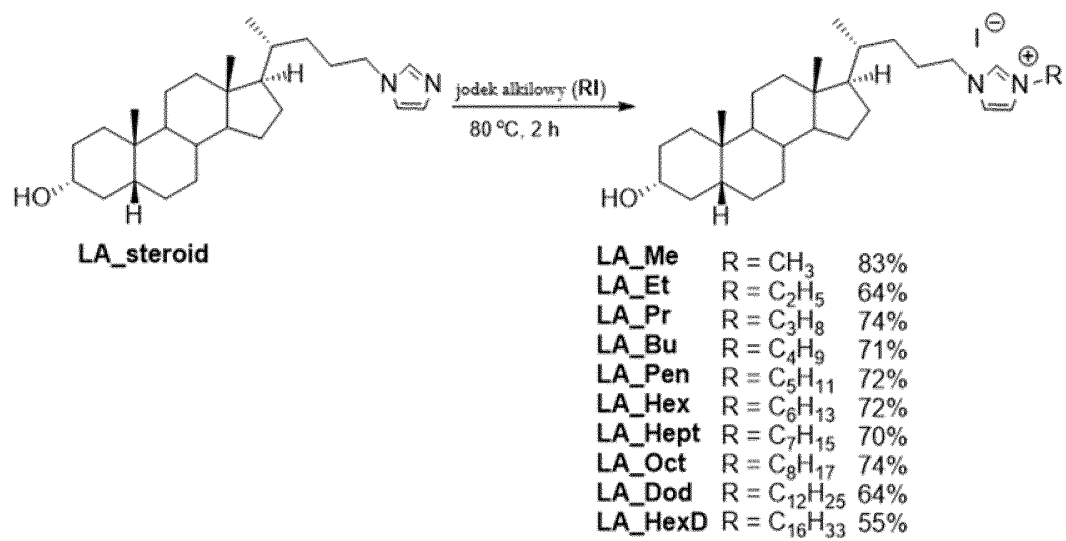


Fig. 11


SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI ZGŁOSZENIA NR P.438355

Klasyfikacja zgłoszenia: C07J 43/00 (2006.01) C07J 9/00 (2006.01) C07D 233/60 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)		
Poszukiwania prowadzone w klasach: C07J, C07D, A61P		
Bazy komputerowe, w których prowadzono poszukiwania: EPODOC, WPI (via EPOQUENET), bazy UPRP, zasoby Internetu (via google.com)		
Kategoria dokumentu	Dokumenty – z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
X A	Hryniewicka A. et al. "Synthesis and antimicrobial properties of steroid-based imidazolium salts." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2019, 189, pp. 65-72 doi: 0.1016/j.jsbmb.2019.02.006 [Scheme 1; związki 5a, 5b, 5c i 5d]	3-4, 5-10, 11 1-2
X A	PL 237764 B1 (UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU) 2021-05-31 [zastrzeżenia; związki LA_Me, LA_Et, LA_Pen, LA_Hex]	3-4, 5-10, 11 1-2
A	Vallejo M. et al. "Novel bile acid derivatives (BANBs) with cytostatic activity obtained by conjugation of their side chain with nitrogenated bases." Biochemical Pharmacology 2007, 73, pp. 1394 – 1404 doi: 0.1016/j.bcp.2006.12.027	1-2, 3-4, 5-10, 11
☐ Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie		
A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie, E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia, L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu, O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób, P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa, T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku, X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie, Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy, & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.		

Sprawozdanie wykonał/-a: mgr inż. Jolanta Gajewska

data 09.03.2022r.

 /-podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym-/
 Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o wersję zastrzeżeń patentowych z dnia 5 lipca 2021 roku.