

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **233179**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **419317**

(22) Data zgłoszenia: **31.10.2016**

(51) Int.Cl.

**C09B 23/04 (2006.01)**

**C07D 215/12 (2006.01)**

**C07D 215/14 (2006.01)**

**A61K 31/47 (2006.01)**

**G01N 33/52 (2006.01)**

(54)

**Nowe zastosowanie pochodnych para-iminostyrylocholinoliny**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**07.05.2018 BUP 10/18**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**30.09.2019 WUP 09/19**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET ŚLĄSKI W KATOWICACH,  
Katowice, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**BARBARA CZAPLIŃSKA, Grybów, PL  
KATARZYNA MALARZ, Bielsko-Biała, PL  
ANNA MROZEK-WILCZKIEWICZ, Katowice, PL  
ROBERT MUSIOŁ, Będzin, PL**

**PL 233179 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowe zastosowanie pochodnych para-iminostyrylochinoliny.

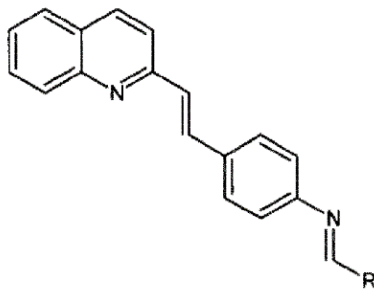
Barwniki fluorescencyjne są często wykorzystywane w badaniach naukowych, medycynie i diagnostyce do obrazowania komórek lub narządów, elementów układów biologicznych takich jak: organelle, antyciała DNA i RNA. Wykorzystuje się je jako sondy molekularne czy wskaźniki do oznaczania obecności lub stężenia jonów lub małych związków organicznych. Szczególne znaczenie zyskuje obrazowanie struktur biologicznych w diagnostyce nowotworów, na przykład w technice fotodynamicznej polegającej na wzbudzeniu światłoczułych związków wiązką światła o odpowiedniej długości. Wykorzystując zjawisko fluorescencji można określić rozmiar guza oraz jego umiejscowienie a więc parametry kluczowe dla chirurgii. Jako fotouczulacze stosuje się pochodne lub analogi protoporfiryny, takie jak fotofrin, porfimer lub ich prekursorzy (proleki) takie jak kwas aminolewulinowy, co zostało ujawnione w opisie patentowym WO84/04665.

Barwniki stosowane w układach biologicznych w warunkach *in vitro* lub *in vivo* powinny być możliwie nietoksyczne i fotostabilne. Toksyczność i brak fotostabilności powodują bowiem, że wykorzystanie takich związków staje się kłopotliwe lub wręcz niemożliwe w tak specyficznych zastosowaniach jak monitorowaniu zachowania komórek, badania przeżyciowe oraz testy toksyczności. Z punktu widzenia barwników fluorescencyjnych stosowanych jako sondy do wykrywania jonów lub związków organicznych ważna jest niska reaktywność substancji. Obojętność chemiczna pozwala na stosowanie barwnika w relatywnie szerokim zakresie warunków takich jak temperatura, pH czy obecność szczególnych reagentów. Bez względu jednak na konkretny zakres zastosowania substancje takie powinny mieć wysoką wartość przesunięcia Stockesa oraz intensywność fluorescencji. Parametry te muszą być odpowiednio wysokie dla uzyskania odpowiedniej czułości metody czy jakości obrazu. Uważa się, że odpowiednia charakterystyka substancji stosowanych do barwienia w układach komórkowych lub detekcji jonów powinna obejmować fluorescencje w zakresie 500–900 nm oraz przesunięcie Stokesa większe niż 20 nm. Związki takie powinny się odpowiednio dobrze wiązać z docelowymi strukturami oraz pozwalać łatwo usuwać ze środowiska pomiaru, gdy pozostają w postaci niezwiązanej.

Często wykorzystywanym barwnikiem jest izotiocyjanian fluoresceiny (FITC). Nie jest on jednak pozbawiony wad, a najważniejsze z nich to niewielka wartość przesunięcia Stokesa i podatność na fotobłaknięcie. Inne barwniki oparte na strukturze fluoresceiny lub ryboflawiny są również wykorzystywane do obrazowania w mikroangiografii krążeniowej, przez co znajdują zastosowanie w medycynie, co opisano w dokumencie patentowym US4945239. Interesujące barwniki cyjaninowe o niesymetrycznej strukturze opisane zostały w dokumencie patentowym US5321130. W cząsteczkach tych barwników można wyróżnić układ chinoliny modyfikowanej w pozycjach 1 i 4 długimi łańcuchami alkiłowymi. Znane są również barwniki oparte na strukturze winylobenzenu (styrylowe), takie jak opisane między innymi w dokumentach patentowych: US5486616, US6794509 oraz US7781187. Nie uwzględniają one jednak chinoliny jako głównego rdzenia cząsteczki. Pojawiają się też w literaturze fachowej doniesienia o możliwości wykorzystania fluorescencyjnych własności styrylochinoliny (modyfikowanej grupą metylową w pozycji Q, chinoliny i grupą aminową w pozycji C<sub>4</sub> pierścienia fenyłowego) do diagnozowania choroby Alzheimera (M, Staderini, ACS Med. Chem. Lett, 2012). Brak jest jednak doniesień o innych styrylochinolinach, zwłaszcza połączonych z ugrupowaniem iminowym. Tymczasem okazuje się, że takie związki mogą posiadać korzystne parametry fluorescencyjne.

Celem wynalazku stało się zatem opracowanie nowych pochodnych styrylochinoliny o korzystnych parametrach fizykochemicznych.

Istotą wynalazku jest nowe zastosowanie pochodnych para-iminostyrylochinoliny o wzorze 1



gdzie: R oznacza pierścień fenylowy również podstawiony jednym lub więcej podstawnikami wybranymi spośród: grupa hydroksylowa, grupa alkoksylova zawierająca do trzech atomów węgla, grupa nitrowa, grupa N,N-dimetyloaminowa lub grupę styrylową, jako barwnik fluoroscencyjny do obrazowania struktur biologicznych.

Istotą wynalazku jest zastosowanie pochodnych para-iminostyrylochinoliny według wzoru 1 jako barwnika fluoroscencyjnego do barwienia, organelli komórkowych. Również pochodna według wzoru 1 wykorzystana jest do diagnostyki chorób nowotworowych, zwłaszcza do diagnostyki nowotworów jelita grubego.

Poniżej przedstawiono przykłady związków opisanych wynalazkiem oraz sposoby obrazowania struktur biologicznych z wykorzystaniem wybranych związków.

#### Przykład 1

Synteza substratu wyjściowego.

Etap 1: 2-[(E)-2-(4-nitrofenylo)-etyleno]-chinolina

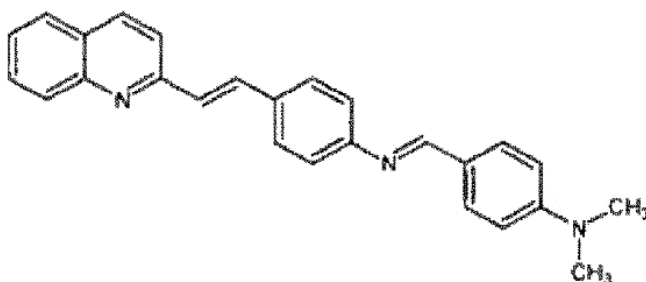
2-metylochinolinę (10 mmoli) rozpuszczono w bezwodniku octowym (40 cm<sup>3</sup>) i dodano p-nitrobenzaldehyd (10 mmoli); Mieszaninę ogrzewano na mieszadle magnetycznym przez 17 h w temperaturze 130°C. Następnie bezwodnik octowy odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt krystalizowano z etanolu. Otrzymano jasnożółty osad o temperaturze topnienia 167°C z wydajnością 73%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.41 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.27 (d, J = 8.6-Hz, 2H), 8.02 (dd, J = 8.2, 4.2 Hz, 3H), 8.00 – 7.90 (m, 3H), 7.78 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 7.60 (t, J = 7.4 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO) δ 155.27, 148.11, 147.36, 143.49, 137.24, 133.63, 132.22, 130.52, 129.30, 128.67, 128.35, 127.77, 127.17, 124.53, 120.82.

Etap 2: 2-[(E)-2-(4-aminofenylo)-etyleno]-chinolina

W kolbie okrągłodennej umieszczono [(E)-2-(4-nitrofenylo)-etyleno]-chinolinę oraz bezwodny chlorek cyny (II) SnCl<sub>2</sub> w etanolu w stosunku molowym 1 : 5. Tak powstałą mieszaninę ogrzewano przez 2 h w temperaturze 90°C w atmosferze gazu obojętnego. Po zakończonej reakcji, mieszaninę ochłodzono, przeniesiono do zlewki z lodem i za pomocą 5% roztworu NaHCO<sub>3</sub> doprowadzono pH = 7–8. Przeprowadzono ekstrakcję z octanem etylu, warstwę organiczną przemyto solanką, a następnie wysuszono za pomocą bezwodnego Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano czerwony osad o temperaturze topnienia 174°C z wydajnością 61%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8,26 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.91 (dd, J = 14.2, 8.3 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.6 Hz, 1H); 7.69 (dd, J = 17.8, 11.8 Hz, 2H), 7.50 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.13 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 5.54 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO) δ 157.03, 150.39, 148.22, 136.54, 135.54, 130.07, 129.21, 128.81, 128.18, 127.10, 125.95, 124.22, 123.28, 120.06, 114.33.

Synteza pochodnych iminowych: W probówce o pojemności 15 ml umieszczono 2-[(E)-2-(4-aminofenylo)-etyleno]-chinolinę wraz z odpowiednim aldehydem. Następnie dodano 5 ml etanolu oraz 3 krople kwasu octowego. Tak przygotowaną mieszaninę poddano działaniu pola mikrofalowego o mocy 50 W, w temperaturze 83°C, w czasie 20 min.

BC11:(NE)-N-[4-(dimetyloamino)fenylo]metylideno]-4-[(E)-2-(chinolin-2-yl)etyleno]anilina

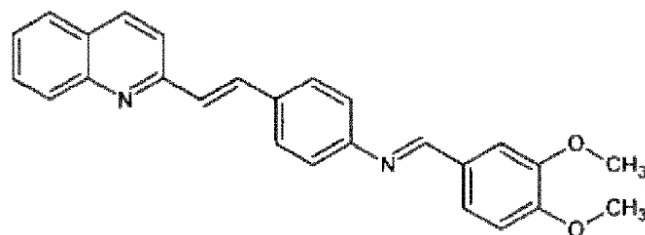


Otrzymano żółty osad o temperaturze topnienia 202°C z wydajnością 62%;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.49 (s, 1H), 8.35 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.97 (dd, J = 19.3, 8.2 Hz, 2H), 7.91–7.81 (m, 2H), 7.81–7.70 (m, 5H), 7.56 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.80 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 3.03 (s, 6H), <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO) δ 160.44, 156.27, 153.05, 152.95, 148.17, 136.90, 134.29, 133.57, 130.91, 130.28, 129.08, 128.74, 328.27, 128.06, 127.44, 126.49, 124.26, 122.00, 120.43, 111.94,

## Przykład 2

BCI2: (NE)-N-[(3,4-dimetoksyfenylo)metylideno]-4-[(E)-2-(chinolin-2-yl)etyleno]anilina

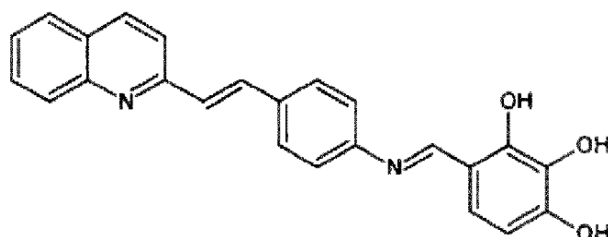


Otrzymano żółty osad o temperaturze topnienia 172 °C z wydajnością 70%;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.59 (s, 1H), 8.36 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 8.00 (d,  $J = 19.3, 8.4$  Hz, 1H), 7.95 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.86 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 7.8 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.75 (dd,  $J = 11.9; 4.8$  Hz, 1H), 7.60–7.45 (m, 4H), 7.32 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.12 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 3.86 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  159.64, 155.95, 152.46, 152.41, 149.65, 148.34, 136.20, 134.11, 133.63, 129.62, 129.51, 129.10, 128.19, 127.53, 127.35, 126.02, 124.36, 121.42, 119.58, 110.70, 109.18, 55.86, 55.85.

## Przykład 3

BCI3: 4-[(E)-N-{4-[(E)-2-(chinolin-2-yl)etyleno]fenylo}karboksylimidoilo]benzeno-1,2,3-triol

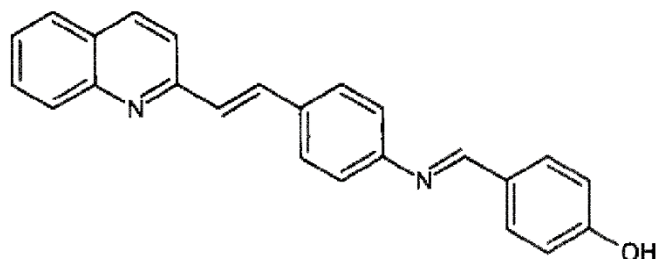


Otrzymano czerwony osad o temperaturze topnienia 239°C z wydajnością 67%;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  13.63 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.36 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 8.00 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.95 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.92–7.80 (m, 4H), 7.76 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.57 (t,  $J = 6.5$  Hz, 1H), 7.48 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H), 7.45 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.98 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.45 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  163.34, 156.12, 152.14, 151.02, 148.28, 148.16, 136.95, 134.81, 133.95, 132.90, 130.32, 128.11, 128.95, 128.87, 128.28, 127.48, 126.63, 124.74, 122.03, 120.45, 112.90, 108.42.

## Przykład 4.

BCI4: 4-[(E)-N-{4-[(E)-2-(chinolin-2-yl)etyleno]fenylo}karboksylimidoilo]fenol



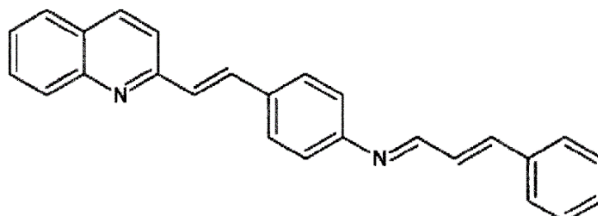
Otrzymano żółty osad o temperaturze topnienia 248°C z wydajnością 67%;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  10.17 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.35 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 8.35 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 8.00 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.95 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.86 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 7.83–7.72 (m, 5H), 7.60–7.52 (m, 1H), 7.47 (d,  $J = 16.3$  Hz, 1H), 7.29

(d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 6.91 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  161.27, 160.50., 156.22, 152.62, 148.17 136.90, 134.19, 134.02, 131.31, 130.28, 129.10, 128.74, 128.33, 128,27, 127.98, 127,45, 126.56, 122.03, 120.43, 116.18.

Przykład 5

BCI6: (NE)-N-[(2E)-3-fenylprop-2-en-1-ylideno]-4-[(E)-2-(chinolin-2-yl)etenyl]anilina

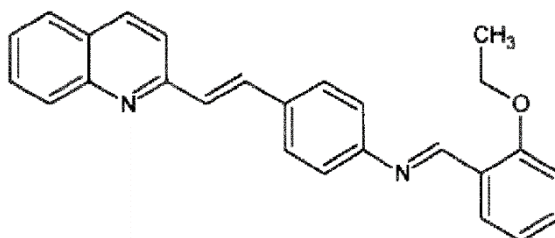


Otrzymano żółty osad o temperaturze topnienia  $195^{\circ}\text{C}$  z wydajnością 68%.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.49 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 8.36 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 8.00 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.95 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.86 (dd,  $J = 19.9, 9.9$  Hz, 2H), 7.84–7.66 (m, 5H), 7.51 (s, 1H), 7.49–7.38 (m, 5H), 7.30 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.20 (dd,  $J = 16.0, 8.9$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  161.47, 155.89, 152.07, 148.34, 144.13, 136.21, 135.69, 134.55, 133.53, 129.63, 129.61, 129.08, 128.90, 128.66, 128.43, 128.16, 127.53, 127.36, 126.05, 121.49, 119.60.

Przykład 6

BCI8: (NE)-N-[(2E)-2-(etoksyfenyl)metylideno]-4-[(E)-2-(chinolin-2-yl)etenyl]anilina

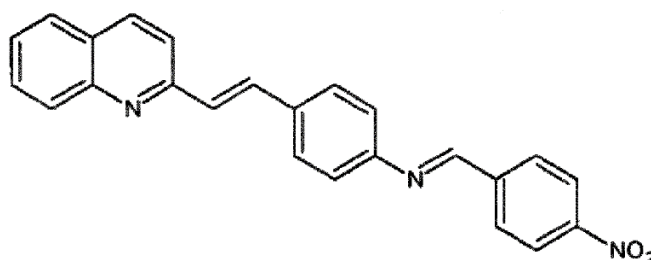


Otrzymano żółty osad o temperaturze topnienia  $167^{\circ}\text{C}$  z wydajnością 55%.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.91 (s, 1H), 8.36 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 8.04 (d,  $J = 87.5$  Hz, 1H), 8.00 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.96 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.92–7.66 (m, 2H), 7.81 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 7.76 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.53 (dt,  $J = 23.3, 12.0$  Hz, 3H), 7.29 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.17 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.07 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 4.18 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 1.40 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  159.21, 156.33, 155.97, 153.07, 148.35, 136.20, 134.15, 133.67, 132.83, 129.61, 129.11, 128,20, 128.12, 127.53, 127.35, 127.31, 126.01, 124.76, 121.60, 120.60, 119.59, 112.26, 64.21, 14.59.

Przykład 7

BCI11: (NE)-N-[(4-nitrofenyl)metylideno]-4-[(E)-2-(chinolin-2-yl)etenyl]anilina



Otrzymano żółty osad o temperaturze topnienia 195 °C z wydajnością 60%.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.91 (s, 1H), 8.38 (t,  $J = 8.4$  Hz, 3H), 8.23 (d;  $J = 8.7$  Hz, 2H), 8.00 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.96 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.93–7.82 (m, 4H), 7.77 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H); 7.56 (dd,  $J = 16.9, 12.0$  Hz, 2H); 7.46 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  157.36, 155.73, 150.97, 149.34, 148.33, 141.67; 136.28, 135.61, 133.26, 129.68, 129.44, 129.13, 129.03, 128.26, 127.55, 127.41, 126.15, 123.96, 121.66, 119.63.

#### Przykład 8

Właściwości spektroskopowe pochodnych styrylochinoliny opisanych wynalazkiem. Poniżej w tabeli zebrano najważniejsze parametry spektroskopowe wybranych związków, potwierdzające iż przedstawione pochodne nadają się do obrazowania, struktur biologicznych sposobem według wynalazku.

Przykładowy związek	Zakres absorpcji / nm	Położenie pasm absorpcji <sup>a</sup> $\lambda$ / nm ( $\epsilon / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )	Maksimum fluorescencji <sup>b</sup> $\lambda_{\text{max}}$ / nm	Intensywność fluorescencji
Przykład 1 (BC11)	250 - 500	400 ( $54,9 \cdot 10^3$ )	554	1175
Przykład 3 (BC13)	250 - 530	386 ( $61,4 \cdot 10^3$ )	508	610
Przykład 4 (BC14)	250 - 450	374 ( $60,4 \cdot 10^3$ )	518	345

Tabela 1. Właściwości spektroskopowe wybranych związków w DMSO.

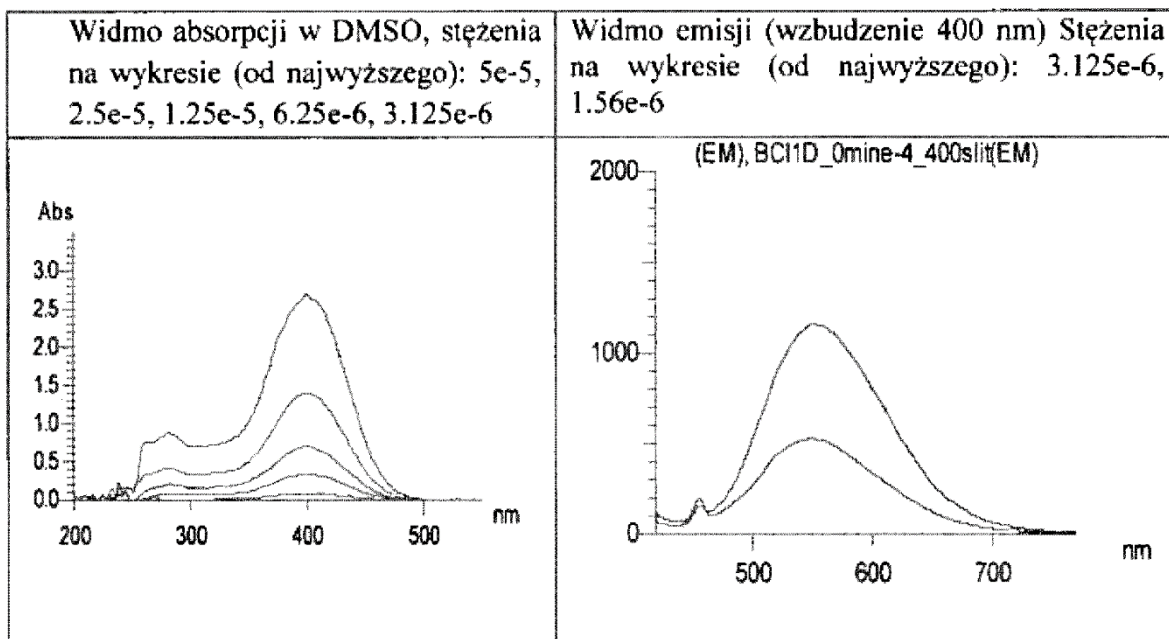
<sup>a</sup> dla stężenia  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol/L

<sup>b</sup> dla stężenia  $6,25 \cdot 10^{-6}$  mol/L

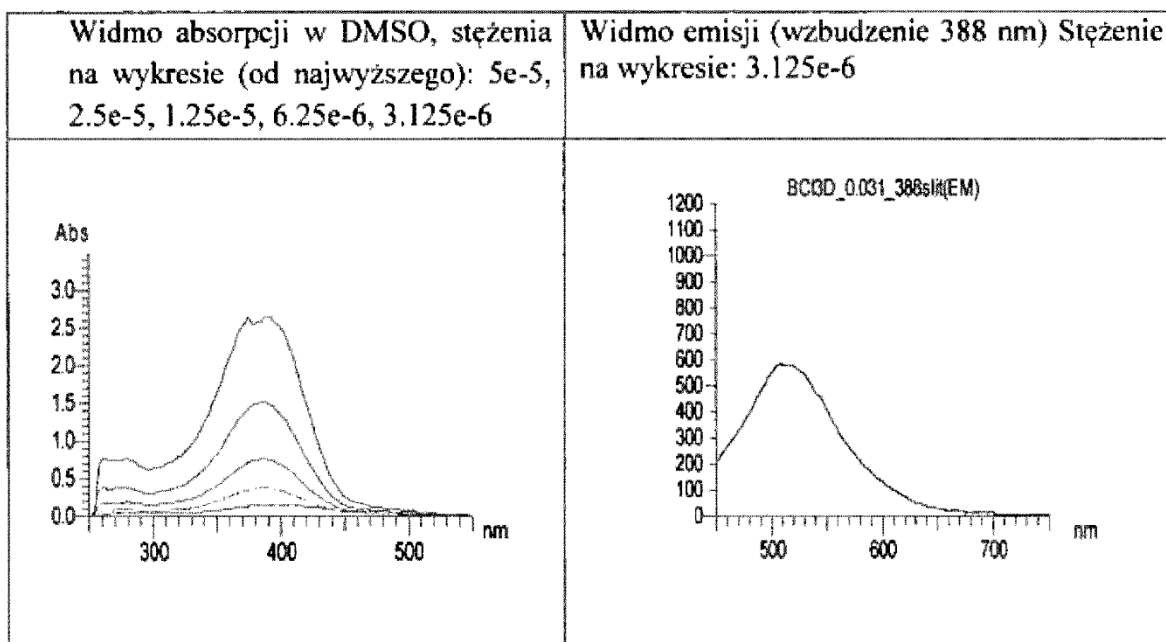
#### Przykład 9

Przykładowe widma absorpcji i emisji związków opisanych wynalazkiem.

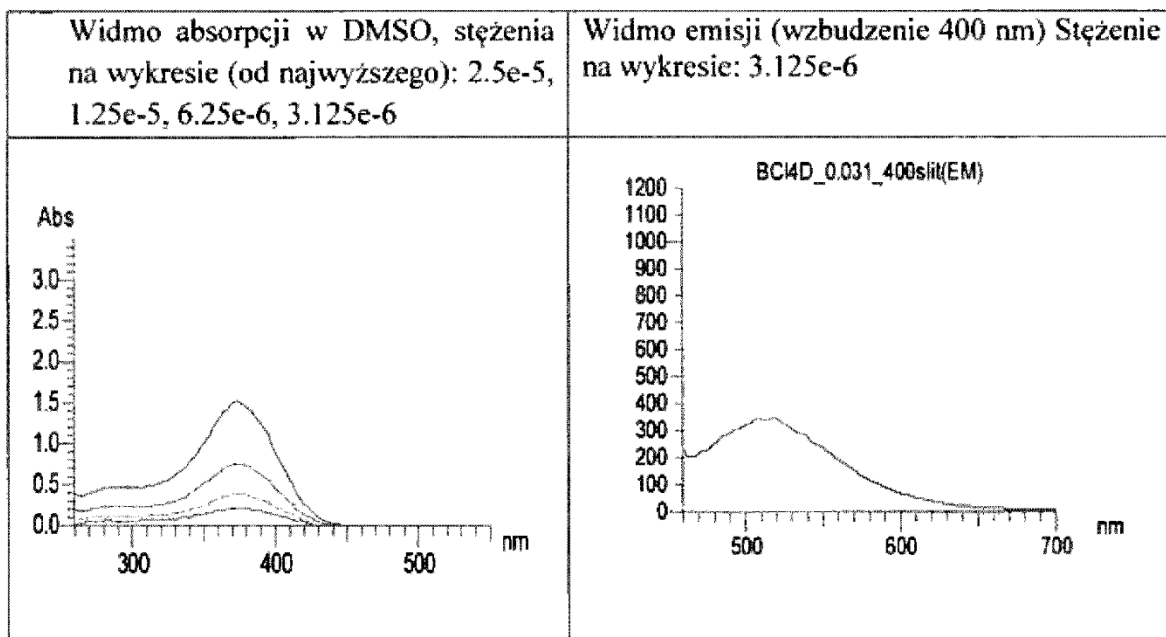
Związek z przykładu 1: (BC11)



## Związek z przykładu 3 (BCI3)



## Związek z przykładu 4 (BCI4)

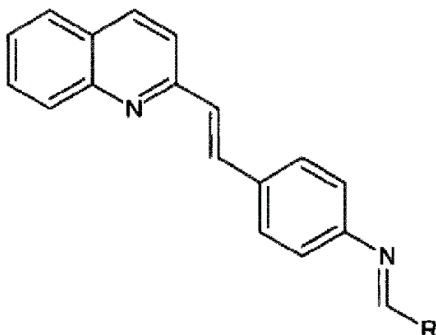


## Przykład 10

Przykładowa procedura barwienia komórek ludzkiego nowotworu jelita grubego linii HCT116 +/- . Komórki wysiano w ilości 120 tys. (wraz z 0,8 mL DMEM) na wcześniej przygotowane szkiełka podstawowe pokryte poly-L-lysiną i obrysowane markerem hydrofobowym, a następnie inkubowano przez 24 h w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Po tym czasie przygotowano roztwór BCI15 (rozpuszczalnik DMSO) o stężeniu 25  $\mu$ M w pożywce hodowlanej DMEM, końcowa objętość na szkiełku wynosiła 0,8 mL. Następnie roztwór został podany komórkom i inkubowany przez 2 h w 37°C, celem wnikięcia związków przez błonę komórkową. Po inkubacji komórki przemywano dwukrotnie DMEM (bez FBS i czerwieni fenolowej), a następnie obserwowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego po wzbudzeniu filtrem DAPI.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Nowe zastosowanie pochodnych para-iminostyrylochinoliny według wzoru



- gdzie R oznacza pierścień fenyłowy korzystnie podstawiony jednym lub więcej podstawnikami, które stanowią: grupa hydroksylowa, grupa alkoksylowa zawierająca do trzech atomów węgla, grupa nitrowa, grupa N,N-dimetyloaminowa lub grupa styrylowa, jako barwników fluoroscencyjnych do obrazowania struktur biologicznych.
2. Nowe zastosowanie pochodnych para-iminostyrylochinoliny według wzoru 1 jako barwnika fluoroscencyjnego do barwienia organelli komórkowych.
  3. Nowe zastosowanie pochodnych para-iminostyrylochinoliny według wzoru 1 do diagnostyki chorób nowotworowych, zwłaszcza do diagnostyki nowotworów jelita grubego.