

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **232269**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **412315**

(22) Data zgłoszenia: **13.05.2015**

(51) Int.Cl.

C07C 333/16 (2006.01)

C07C 271/64 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Pochodne merkapturowe diizotiocyanianów sposób ich wytwarzania
oraz ich zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
24.10.2016 BUP 22/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.05.2019 WUP 05/19

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ŁUKASZ WINIARSKI, Zielona Góra, PL

MATEUSZ PSURSKI, Kutno, PL

AGATA RUDNICKA, Namysłów, PL

RENATA GRZYWA, Wrocław, PL

JÓZEF OLEKSYSZYN, Siechnice, PL

JOANNA WIETRZYK, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 232269 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są pochodne merkapturowe diizotiocyjanianów, sposób ich wytwarzania oraz zastosowanie przeciwnowotworowe, jak również zastosowanie ich jako inhibitorów deacetylazy histonowej.

Naturalne izotiocyjaniany charakteryzują się *in vivo*, niezwykle małą toksycznością, co jest rzadko spotykaną cechą związków przeciwnowotworowych (Dinkova-Kostova, A.T.; Rostov, R.V. *Trends Mol. Med.* **2012**, 18, 33. oraz Singh, S.V.; Singh, K. *Carcinogenesis*. **2012**, 33, 1833.). Ze stanu techniki wiadomo, iż grupa izotiocyjanianowa odpowiedzialna jest za szybką akumulację związków w komórkach eukariotycznych na drodze dyfuzji biernej (Zhang Y. *Carcinogenesis*. **2001**; 22(3): 425–31) i szereg aktywności biologicznych (Zhang Y. *Carcinogenesis*. **2012**; 33(1): 2–9.). Izotiocyjaniany tworzą *in vivo* addukty (kwasy merkapturowe), głównie z glutationem i są wydalone z organizmu (Holst, B.; Williamson, G. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 21, 425.).

W literaturze przedmiotu opisano merkapturowe pochodne izotiocyjanianów otrzymane przez połączenie N-acetylocysteiny z izotiocyjanianem (Bruggeman, I.M.; Temmink, J.H.; van Bladeren, P.J. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1986**, 83, 349. oraz Hecht, S.S. In *Cancer Chemoprevention*; Kelloff, G. J., Hawk, E.T., Sigman C. C., Eds.; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2004; Vol. 1, pp 21.). Wykazano również, że związki te posiadają podobną aktywność przeciwnowotworową jak izotiocyjaniany wykorzystane do ich syntezy. Ponadto pochodne merkapturowe izotiocyjanianów w przeciwieństwie do wyjściowych izotiocyjanianów są bezzapachowe co może być zaletą przy ewentualnych formulacjach farmaceutycznych leków podawanych doustnie.

Istotą wynalazku są pochodne merkapturowe diizotiocyjanianów o wzorze ogólnym I, w którym R oznacza łańcuch 1,2-dietoksyetanu, 2-metylopentanu, 1,3-dimetylocykloheksanu, cykloheksanu, 4,7,10-trioksytridekanu, 1,4-dimetylobenzenu, 1-metylobenzenu, butanu, propylenu oraz benzenu.

Sposób wytwarzania pochodnych merkapturowych diizotiocyjanianów o wzorze ogólnym I w którym R oznacza łańcuch 1,2-dietoksyetanu, 2-metylopentanu, 1,3-dimetylocykloheksanu, cykloheksanu, 4,7,10-trioksytridekanu, 1-metylobenzenu butanu, propylenu, benzenu oraz 1,4-dimetylobenzenu polega na tym, że diaminę poddaje się reakcji z disiarczkiem węgla w obecności trietyloaminy w *N,N*-dimetyloformamidzie w temperaturze 0°C, a następnie po 15 minutach powstały produkt pośredni rozkłada się do diizotiocyjanianu za pomocą heksafluorofosforanu 2-(1*H*-benzotriazolo-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowego. Tak otrzymany diizotiocyjanian rozpuszczony w izopropanolu poddaje się reakcji z N-acetylocysteiną rozpuszczoną w wodzie z dodatkiem wodorowęglanu sodu.

Wynalazek dotyczy również zastosowania pochodnych merkapturowych diizotiocyjanianów o wzorze ogólnym I w którym R oznacza łańcuch 1,2-dietoksyetanu, 2-metylopentanu, 1,3-dimetylocykloheksanu, cykloheksanu, 4,7,10-trioksytridekanu, 1,4-dimetylobenzenu, 1-metylobenzenu, butanu, propylenu oraz benzenu jako środka farmaceutycznego przeznaczonego w szczególności do leczenia nowotworów opornych na dokсорubicynę oraz jako inhibitorów deacetylazy histonowej.

Wynalazek został bliżej przedstawiony we wzorach strukturalnych oznaczonych nr od 2 do 12 oraz w przykładach jego realizacji.

Przykład 1

Sposób wytwarzania 1,2-diaminoetoksy[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo)etanu przedstawionego na wzorze 2

Etap 1 Otrzymywanie 1,2-di(2-izotiocyjanianoetoksy)etanu

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.74 g 1,2-di(2-aminoetoksy)etan (5 mmol, 1 eq) do roztworu 6.06 ml disiarczku węgla (100 mmol, 20 eq) i 1.39 ml trietyloaminy (10 mmol, 2 eq) w 15 ml DMF. Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Następnie dodaje się 2.84 g heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego (7.5 mmol, 1.5 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 90 ml wody destylowanej i trzykrotnie ekstrahuje się 15 ml porcjami heksanu. Połączone warstwy organiczne przemyto 50 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio, bez oczyszczania do reakcji syntezy.

Etap 2 Otrzymywanie 1,2-diaminoetoksy[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo)etanu

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.29 g 1,2-di(2-izotiocyjanianoetoksy)etanu (1.25 mmol, 1 eq) rozpuszczonego w 3 ml izopropanolu do

2 ml wodnego roztworu 0.43 g N-acetylo-L-cysteiny (2.625 mmol, 2.1 eq) i 0.22 g wodorowęglanu sodu (2.625 mmol, 2.1 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 72 godziny do prawie całkowitego przereagowania substratów. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 20 ml wody destylowanej i przemywa trzykrotnie 10 ml porcjami heksanu i dwukrotnie 10 ml porcjami octanu etylu. Następnie warstwę wodną zakwasza się 1M kwasem solnym do wytrącenia osadu i ekstrahuje się 3 krotnie 20 ml porcjami octanu etylu. Połączone warstwy organiczne przemyto 20 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymuje się 0.18 g (wydajność 26%) oczekiwanego produktu.

¹H NMR (601 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.16 - 10.03 (m, 2H), 8.32 (d, *J* = 8.1, 3.2 Hz, 2H), 4.45 - 4.35 (m, 2H), 3.80 - 3.68 (m, 4H), 3.67 - 3.62 (m, 2H), 3.59 - 3.49 (m, 4H), 3.41-3.24 (m, 2H), 1.89 (s, 3H), 1.84 (s, 3H).

HRMS: teoretyczna (C₁₈H₃₀N₄O₈S₄)H⁺, 559.10247; wyznaczona 559.10156

Przykład 2

Sposób wytwarzania 1,5-diamino[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]-2-metylopentanu przedstawionego na wzorze 3

Etap 1 Otrzymywanie 1,5-diizotiocyjaniano-2-metylopentanu

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.58 g 1,5-diamino-2-metylopentanu (5 mmol, 1 eq) do roztworu 6.06 ml disiarczku węgla (100 mmol, 20 eq) i 1.39 ml trietyloaminy (10 mmol, 2 eq) w 15 ml DMF. Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Następnie dodaje się 2.84 g heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N''*-tetrametylouroniowego (7.5 mmol, 1.5 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 90 ml wody destylowanej i trzykrotnie ekstrahuje się 15 ml porcjami heksanu. Połączone warstwy organiczne przemyto 50 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio, bez oczyszczania do reakcji syntezy.

Etap 2 Otrzymywanie 1,5-diamino[N,N-ditioester(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]-2-metylopentanu.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.25 g 1,5-diizotiocyjaniano-2-metylopentanu (1.25 mmol, 1 eq) rozpuszczonego w 3 ml izopropanolu do 2 ml wodnego roztworu 0.43 g N-acetylo-L-cysteiny (2.625 mmol, 2.1 eq) i 0.22 g wodorowęglanu sodu (2.625 mmol, 2.1 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 72 godziny do prawie całkowitego przereagowania substratów. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 20 ml wody destylowanej i przemywa trzykrotnie 10 ml porcjami heksanu i dwukrotnie 10 ml porcjami octanu etylu. Następnie warstwę wodną zakwasza się 1M kwasem solnym do wytrącenia osadu i ekstrahuje się 3 krotnie 20 ml porcjami octanu etylu. Połączone warstwy organiczne przemyto 20 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymuje się 0,16 g (wydajność 24%) oczekiwanego produktu.

¹H NMR (601 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.06 - 10.00 (m, 2H), 8.32 (d, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 2H), 4.40 - 4.38 (m, 1H), 3.79 - 3.76 (m, 2H), 3.66 - 3.64 (m, 4H), 3.58 - 3.56 (m, 2H), 2.98 (s, 1H), 1.87 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 1.85 (s, 6H), 1.61-1.54 (m, 2H), 0.86 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H).

HRMS: teoretyczna (C₁₈H₃₀N₄O₆S₄)H⁺, 527.11264; wyznaczona 527,11188

Przykład 3

Sposób wytwarzania 1,3-diamino[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]cykloheksanu przedstawionego na wzorze 4

Etap 1 Otrzymywanie 1,3-di(izotiocyjanianometylo)cykloheksanu

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0,71 g 1,3-di(aminometylo)cykloheksanu (5 mmol, 1 eq) do roztworu 6,06 ml disiarczku węgla (100 mmol, 20 eq) i 1.39 ml trietyloaminy (10 mmol, 2 eq) w 15 ml DMF. Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Następnie dodaje się 2,84 g heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N''*-tetrametylouroniowego (7.5 mmol, 1.5 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 90 ml wody destylowanej i trzykrotnie ekstrahuje się 15 ml porcjami heksanu. Połączone warstwy organiczne przemyto 50 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio, bez oczyszczania do reakcji syntezy.

Etap 2 Otrzymywanie 1,3-diamino[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]cykloheksanu

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.28 g 1,3-di(izotiocyjanianometylo)cykloheksanu (1.25 mmol, 1 eq) rozpuszczonego w 3 ml izopropanolu do 2 ml wodnego roztworu 0.43 g N-acetylo-L-cysteiny (2.625 mmol, 2.1 eq) i 0.22 g wodorowęglanu sodu (2.625 mmol, 2.1 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 72 godziny do prawie całkowitego przereagowania substratów. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 20 ml wody destylowanej i przemywa trzykrotnie 10 ml porcjami heksanu i dwukrotnie 10 ml porcjami octanu etylu. Następnie warstwę wodną zakwasza się 1M kwasem solnym do wytrącenia osadu i ekstrahuje się 3 krotnie 20 ml porcjami octanu etylu. Połączone warstwy organiczne przemyto 20 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymuje się 0.2 g (wydajność 29%) oczekiwanego produktu.

¹H NMR (601 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.10 - 10.04 (m, 2H), 7.97 (d, *J* = 8.5, 0.9 Hz, 2H), 3.79 - 3.77 (m, 2H), 3.77 - 3.74 (m, 2H), 3.47 - 3.45 (m, 2H), 3.34 - 3.31 (m, 2H), 3.31 - 3.28 (m, 2H), 1.84 (s, 6H), 1.70 - 1.68 (m, 5H), 1.52 - 1.34 (m, 1H), 1.25 - 1.12 (m, 2H), 0.88 - 0.81 (m, 2H).

HRMS: teoretyczna (C₂₀H₃₂N₄O₆S₄)H⁺, 553.12829; wyznaczona 553.12603

Przykład 4

Sposób wytwarzania *trans*-1,4-diamino[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]cykloheksanu przedstawionego na wzorze 5

Etap 1 Otrzymywanie trans-1,4-diizotiocyjanianocykloheksanu

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.57 g *trans*-1,4-diaminocykloheksanu (5 mmol, 1 eq) do roztworu 6.06 ml disiarczku węgla (100 mmol, 20 eq) i 1.39 ml trietyloaminy (10 mmol, 2 eq) w 15 ml DMF. Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Następnie dodaje się 2.84 g heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N''*-tetrametylouroniowego (7.5 mmol, 1.5 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 90 ml wody destylowanej i trzykrotnie ekstrahuje się 15 ml porcjami heksanu. Połączone warstwy organiczne przemyto 50 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio, bez oczyszczania do reakcji syntezy.

Etap 2 Otrzymywanie trans-1,4-diamino[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]cykloheksanu

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.25 g *trans*-1,4-diizotiocyjanianocykloheksanu (1.25 mmol, 1 eq) rozpuszczonego w 3 ml izopropanolu do 2 ml wodnego roztworu 0.43 g N-acetylo-L-cysteiny (2.625 mmol, 2.1 eq) i 0.22 g wodorowęglanu sodu (2.625 mmol, 2.1 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 72 godziny do prawie całkowitego przereagowania substratów. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 20 ml wody destylowanej i przemywa trzykrotnie 10 ml porcjami heksanu i dwukrotnie 10 ml porcjami octanu etylu. Następnie warstwę wodną zakwasza się 1M kwasem solnym do wytrącenia osadu i ekstrahuje się 3 krotnie 20 ml porcjami octanu etylu. Połączone warstwy organiczne przemyto 20 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymuje się 0.19 g (wydajność 29%) oczekiwanego produktu.

¹H NMR (601 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.99 - 9.91 (m, 1H), 8.34 - 8.31 (m, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.40 - 4.36 (m, 2H), 3.66 - 3.63 (m, 4H), 3.35 - 3.28 (m, 2H), 2.99 - 2.98 (m, 4H), 2.87 - 2.82 (m, 2H), 2.77 - 2.71 (m, 2H), 1.89 (s, 6H).

HRMS: teoretyczna (C₁₈H₂₈N₄O₆S₄)H⁺, 525.09699; wyznaczona 525.09599

Przykład 5. Sposób wytwarzania 1,2-diamino[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]cykloheksanu przedstawionego na wzorze 6

Etap 1 Otrzymywanie 1,2-diizotiocyjanianocykloheksanu

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.57 g 1,2-diaminocykloheksanu (5 mmol, 1 eq) do roztworu 6.06 ml disiarczku węgla (100 mmol, 20 eq) i 1.39 ml trietyloaminy (10 mmol, 2 eq) w 15 ml DMF. Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Następnie dodaje się 2.84 g heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N''*-tetrametylouroniowego (7.5 mmol, 1.5 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 90 ml wody destylowanej i trzykrotnie ekstrahuje się 15 ml porcjami heksanu. Połączone warstwy organiczne przemyto 50 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej.

Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio, bez oczyszczania do reakcji syntezy.

Etap 2 Otrzymywanie 1,2-diamino[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo)cykloheksanu

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.25 g 1,2-diizotiocyanianocykloheksanu (1.25 mmol, 1 eq) rozpuszczonego w 3 ml izopropanolu do 2 ml wodnego roztworu 0.43 g N-acetylo-L-cysteiny (2.625 mmol, 2.1 eq) i 0.22 g wodorowęglanu sodu (2.625 mmol, 2.1 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 72 godziny do prawie całkowitego przereagowania substratów. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 20 ml wody destylowanej i przemywa trzykrotnie 10 ml porcjami heksanu i dwukrotnie 10 ml porcjami octanu etylu. Następnie warstwę wodną zakwasza się 1M kwasem solnym do wytrącenia osadu i ekstrahuje się 3 krotnie 20 ml porcjami octanu etylu. Połączone warstwy organiczne przemyto 20 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymuje się 0.11 g (wydajność 16%) oczekiwanego produktu.

¹H NMR (601 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.55 (dd, *J* = 8.3, 5.3 Hz, 1H), 4.49 - 4.44 (m, 2H), 4.40 - 4.34 (m, 1H), 3.67 - 3.62 (m, 2H), 3.59 - 3.55 (m, 2H), 2.92 - 2.87 (m, 2H), 2.77 - 2.72 (m, 2H), 2.55 (s, 2H), 1.89 (s, 3H), 1.87 - 1.86 (m, 2H), 1.86 (s, 3H).

HRMS: teoretyczna (C₁₈H₂₈N₄O₆S₄)H⁺ 525.09699; wyznaczona 525.10457

P r z y k ł a d 6. Sposób wytwarzania 1,13-diamino[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]-4,7,10-trioksytridekanu przedstawionego na wzorze 7

Etap 1 Otrzymywanie 4,7,10-trioksy-1,13-diizotiocjanianutridekanu

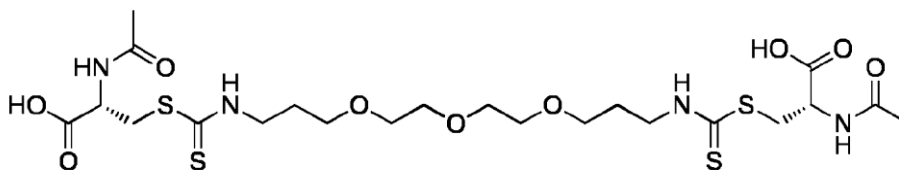
W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 1.10 g 4,7,10-trioksy-1,13-diaminotridekanu (5 mmol, 1 eq) do roztworu 6.06 ml disiarczku węgla (100 mmol, 20 eq) i 1.39 ml trietyloaminy (10 mmol, 2 eq) w 15 ml DMF. Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Następnie dodaje się 2.84 g heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylu-*N,N,N'*-tetrametylouroniowego (7.5 mmol, 1.5 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 90 ml wody destylowanej i trzykrotnie ekstrahuje się 15 ml porcjami heksanu. Połączone warstwy organiczne przemyto 50 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio, bez oczyszczania do reakcji syntezy.

Etap 2 Otrzymywanie 1,13-diamino[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]-4,7,10-trioksytridekanu.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.76 g 4,7,10-trioksy-1,13-diizotiocjanianutridekanu (2.5 mmol, 1 eq) rozpuszczonego w 4 ml izopropanolu do 3 ml wodnego roztworu 0.86 g N-acetylo-L-cysteiny (5.25 mmol, 2.1 eq) i 0.44 g wodorowęglanu sodu (5.25 mmol, 2.1 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 72 godziny do prawie całkowitego przereagowania substratów. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 20 ml wody destylowanej i przemywa trzykrotnie 10 ml porcjami heksanu i dwukrotnie 10 ml porcjami octanu etylu. Następnie warstwę wodną zakwasza się 1M kwasem solnym do wytrącenia osadu i ekstrahuje się 3 krotnie 20 ml porcjami octanu etylu. Połączone warstwy organiczne przemyto 20 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymuje się 0.22 g (wydajność 14%) oczekiwanego produktu.

¹H NMR (601 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.98 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 8.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.42 - 4.37 (m, 2H), 3.77 (dd, *J* = 13.6, 4.9 Hz, 2H), 3.62 - 3.59 (m, 4H), 3.54 - 3.47 (m, 14H), 3.31 (dd, *J* = 13.2, 4.0 Hz, 2H), 1.84 (s, 6H).

HRMS: teoretyczna (C₂₂H₃₈N₄O₉S₄)H⁺, 631.15999; wyznaczona 631.16574



Przykład 7 Sposób wytwarzania 1,4-diaminometylo[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]benzenu przedstawionego na wzorze **8**

Etap 1 Otrzymywanie 1,4-di(izotiocyjanianometylo)benzenu

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.68 g 1,4-di(aminometylo)benzenu (5 mmol, 1 eq) do roztworu 6.06 ml disiarczku węgla (100 mmol, 20 eq) i 1.39 ml trietyloaminy (10 mmol, 2 eq) w 15 ml DMF. Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Następnie dodaje się 2.84 g heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo-N,N,N',N''-tetrametylouroniowego (7.5 mmol, 1.5 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze 0°C przez 15 minut. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 90 ml wody destylowanej i trzykrotnie ekstrahuje się 15 ml porcjami heksanu. Połączone warstwy organiczne przemyto 50 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio, bez oczyszczania do reakcji syntezy.

Etap 2 Otrzymywanie 1,4-diaminometylo[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]benzenu

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.55 g 1,4-di(izotiocyjanianometylo)benzenu (2.5 mmol, 1 eq) rozpuszczonego w 4 ml izopropanolu do 3 ml wodnego roztworu 0.86 g N-acetylo-L-cysteiny (5.25 mmol, 2,1 eq) i 0.44 g wodorowęglanu sodu (5.25 mmol, 2,1 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 72 godziny do prawie całkowitego przereagowania substratów. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 20 ml wody destylowanej i przemywa trzykrotnie 10 ml porcjami heksanu i dwukrotnie 10 ml porcjami octanu etylu. Następnie warstwę wodną zakwasza się 1M kwasem solnym do wytrącenia osadu i ekstrahuje się 3 krotnie 20 ml porcjami octanu etylu. Połączone warstwy organiczne przemyto 20 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymuje się 0.22 g (wydajność 14%) oczekiwanego produktu.

HRMS: teoretyczna (C₂₀H₂₆N₄O₆S₄)H⁺, 547.08134; wyznaczona 547.08120

Przykład 8

Sposób wytwarzania 2,4-diamino[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]-1-metylobenzenu przedstawionego na wzorze **9**.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.2 g 2,4-diizotiocyjaniano-1-metylobenzen (0.97 mmol, 1 eq) rozpuszczonego w 5 ml izopropanolu do 2 ml wodnego roztworu 0.28 g N-acetylo-L-cysteiny (1.74 mmol, 1.8 eq) i 0.15 g wodorowęglanu sodu (1.84 mmol, 1.9 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny do prawie całkowitego przereagowania substratów. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 20 ml wody destylowanej i przemywa trzykrotnie 10 ml porcjami heksanu i dwukrotnie 10 ml porcjami octanu etylu. Następnie warstwę wodną zakwasza się 1M kwasem solnym do wytrącenia osadu i ekstrahuje się 3 krotnie 20 ml porcjami octanu etylu. Połączone warstwy organiczne przemyto 20 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymuje się 0.21 g (wydajność 45%) oczekiwanego produktu.

¹H NMR (601 MHz, MeOD) δ 11.27 (s, 2H), 8.41 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.59 (s, 2H), 7.31 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.80 - 4.74 (m, 2H), 4.06 (dd, J = 14.1, 4.7 Hz, 2H), 3.56 (dd, J = 14.0, 8.7 Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.00 (s, 6H).

HRMS: teoretyczna (C₁₉H₂₄N₄O₆S₄)Na⁺, 555.04764; wyznaczona 555.05055

Przykład 9

Sposób wytwarzania 1,4-diamino[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]butanu przedstawionego na wzorze **10**.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 1 g 1,4-diizotiocyjanianobutanu (5.8 mmol, 1 eq) rozpuszczonego w 20 ml izopropanolu do 15 ml wodnego roztworu 1.7 g N-acetylo-L-cysteiny (10.4 mmol, 1.8 eq) i 0.93 g wodorowęglanu sodu (11 mmol, 1.9 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny do prawie całkowitego przereagowania substratów. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 100 ml wody destylowanej i przemywa trzykrotnie 50 ml porcjami heksanu i dwukrotnie 50 ml porcjami octanu etylu. Następnie warstwę wodną zakwasza się 1M kwasem solnym do wytrącenia osadu i ekstrahuje się 3 krotnie 50 ml porcjami octanu etylu. Połączone warstwy organiczne przemyto 30 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymuje się 1.75 g (wydajność 60%) oczekiwanego produktu.

¹H NMR (601 MHz, DMSO) δ 10.22 (s, 2H), 8.21 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 4.39 - 4.31 (m, 2H), 3.71 (dd, J = 13.7, 4.9 Hz, 2H), 3.63 - 3.51 (m, 4H), 3.32 (dd, J = 13.7, 8.4 Hz, 2H), 1.85 (s, 6H), 1.63 - 1.56 (m, 4H).

HRMS: teoretyczna (C₁₆H₂₆N₄O₆S₄)Na⁺, 521.06329; wyznaczona 521.06496

Przykład 10

Sposób wytwarzania 1,3-diamino[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]propylenu przedstawionego na wzorze **11**

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.2 g 1,3-diizotiocyanianopropylenu (1.33 mmol, 1 eq) rozpuszczonego w 3 ml izopropanolu do 2 ml wodnego roztworu 0.39 g N-acetylo-L-cysteiny (2.4 mmol, 1.8 eq) i 0.21 g wodorowęglanu sodu (2.53 mmol, 1.9 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny do prawie całkowitego przereagowania substratów. Po tym czasie mieszalinę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 20 ml wody destylowanej i przemywa trzykrotnie 10 ml porcjami heksanu i dwukrotnie 10 ml porcjami octanu etylu. Następnie warstwę wodną zakwasza się 1M kwasem solnym do wytrącenia osadu i ekstrahuje się 3 krotnie 20 ml porcjami octanu etylu. Połączone warstwy organiczne przemyto 20 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymuje się 0.25 g (wydajność 43%) oczekiwanego produktu.

¹H NMR (601 MHz, DMSO) δ 10.07 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 10.03 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 8.47 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.33 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.50 - 4.44 (m, 1H), 4.43 - 4.37 (m, 1H), 3.79 - 3.74 (m, 2H), 3.63 - 3.52 (m, 4H), 3.40 - 3.29 (m, 2H), 1.92-1.86 (m, 2H), 1.85 (d, J = 3.5 Hz, 6H).

HRMS: teoretyczna (C₁₅H₂₄N₄O₆S₄)Na⁺, 507.04764; wyznaczona 507.05189

Przykład 11

Sposób wytwarzania 1,3-diamino[N,N-ditioestero(S-(2-aminoacetylo-2-karboksy)etylo]benzenu przedstawionego na wzorze **12**.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się porcjami 0.2 g 1,3-diizotiocyanianobenzenu (1.04 mmol, 1 eq) rozpuszczonego w 3 ml izopropanolu do 2 ml wodnego roztworu 0.30 g N-acetylo-L-cysteiny (1.87 mmol, 1.8 eq) i 0.17 g wodorowęglanu sodu (1.97 mmol, 1.9 eq). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny do prawie całkowitego przereagowania substratów. Po tym czasie mieszalinę reakcyjną przenosi się do rozdzielacza z 20 ml wody destylowanej i przemywa trzykrotnie 10 ml porcjami heksanu i dwukrotnie 10 ml porcjami octanu etylu. Następnie warstwę wodną zakwasza się 1M kwasem solnym do wytrącenia osadu i ekstrahuje się 3 krotnie 20 ml porcjami octanu etylu. Połączone warstwy organiczne przemyto 20 ml solanki, wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymuje się 0.20 g (wydajność 41%) oczekiwanego produktu.

¹H NMR (601 MHz, MeOD) δ 11.32 (s, 2H), 8.31 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 8.10 (s, 1H), 7.57 - 7.36 (m, 3H), 4.77 - 4.70 (m, 2H), 4.05 (dd, J = 14.0, 4.7 Hz, 2H), 3.59 (dd, J = 14.0, 8.5 Hz, 2H), 2.01 - 1.98 (m, 6H).

HRMS: teoretyczna (C₁₈H₂₂N₄O₆S₄)Na⁺, 541.03199; wyznaczona 541.03560

Przykład 12

Badanie aktywności antyproliferacyjnej merkapturowych pochodnych diizotiocyanianów z wykorzystaniem linii nowotworowych jelita grubego LoVo oraz jelita grubego odpornej na doksorubicynę 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 medium Opti-MEM + RPMI 1640 suplementowane 2 mM roztworem L-glutaminy, 1,5 g/L roztworem wodorowęglanu 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 LoVo/DX). Ponadto wszystkie media hodowlane zawierały 100 jednostek/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny. Do odklejenia komórek od płytek hodowlanych używano 0,25% roztworu Trypsyna-EDTA. Następnie policzone komórki posiano na płytce 96-dołkowej w ilości 10⁴ komórek/dołek (100 µL zawiesiny komórkowej 10⁵ komórek/mL na dołek). 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 dołkach 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 dołków dodano po 50 µM 50% roztworu kwasu trichlorooctowego i płytki inkubowano przez 1 godzinę

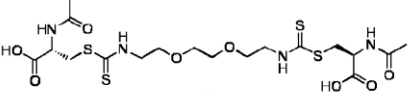
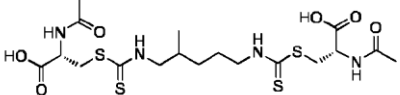
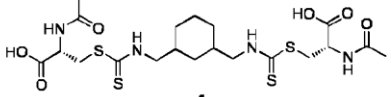
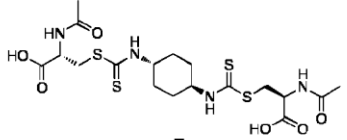
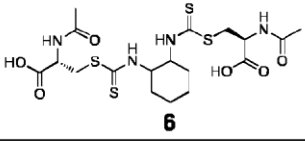
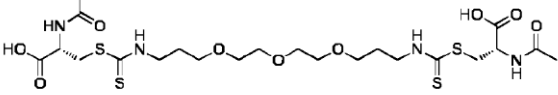
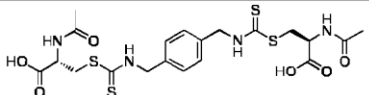
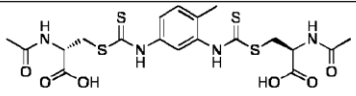
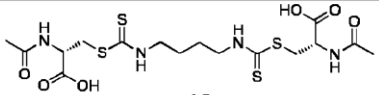
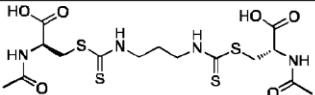
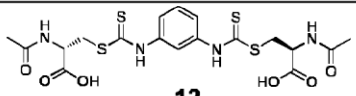
w temperaturze 4°C. Następnie płytki wypłukano pod bieżącą wodą, osuszono i do każdego z dołków dodano po 50 µL 0,4% roztworu sulforodaminy B w 1% kwasie octowym i inkubowano w ciemności przez 30 minut. Po tym czasie płytki wypłukano w 1% kwasie octowym, osuszono i do każdego z dołków dodano po 150 µL 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 dołków traktowanych związkami w odpowiednich stężeniach do dołków 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. Uzyskane rezultaty przedstawiono w Tabeli 1.

Przykład 13

Badanie aktywności inhibitorowej otrzymanych w przykładach 1–11 merkapturowych pochodnych diizotiocyanianów wobec deacetylazy histonowej (HDAC).

Wszystkie pomiary kinetyki enzymatycznej sporządzono przy użyciu czytnika mikropłytek Molecular Devices Spectramax Gemini XP. Źródłem HDAC był lizat komórkowy linii LoVo/DX. Pomiary aktywności inhibitorowej wykonano przy różnych stężeniach inhibitorów w zakresie stężeń od 90 µM do 5 mM. W badaniach wykorzystano komercyjnie dostępny substrat Boc-Lys(Ac)-AMC (Sigma Aldrich) oraz bufor (15 mM Tris/HCl, 250 µM EDTA, 250 µM NaCl i pH 8,1). W pierwszym etapie eksperymentu do studzienki na płytce mikrotitracyjnej odmierzono 50 µl inhibitora oraz 20 µl lizatu komórkowego (komórki LoVo/DX o stężeniu $2,5 \cdot 10^6$ komórek/ml). Po 15 minutach inkubacji w 37°C dodano 30 µl substratu (150 µM). Następnie po 3 godzinach inkubacji w 37°C dodano 80 µl roztworu przerywającego (75 µM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1.5 mg/ml trypsyna, 2 µM trichostatyna A, pH 8,1). Następnie przez 30 minut prowadzono pomiar (Ex 355 nm, Em 460 nm). Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono IC₅₀ dla każdego z badanych związków. Test dla każdego ze związków powtórzony został co najmniej trzykrotnie. Uzyskane rezultaty przedstawiono w Tabeli 1.

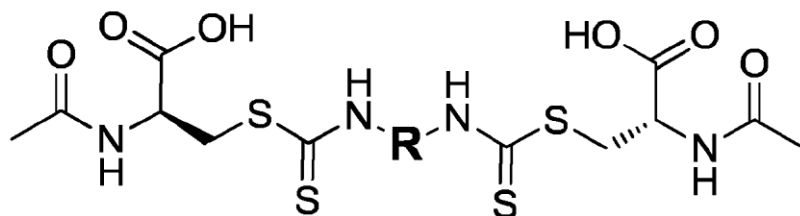
T a b e l a 1. Aktywność antyproliferacyjna merkapturowych pochodnych diizotiocyanianów z wykorzystaniem linii nowotworowych jelita grubego LoVo oraz jelita grubego odpornej na doksorubicynę LoVo/DX oraz aktywności inhibitorowa wobec deacetylazy histonowej (HDAC).

Wzór	IC ₅₀		
	LoVo [μM]	LoVo/DX [μM]	HDAC [mM]
 2	4.62±1.2	14.18±2.9	4.37 ± 0.11
 3	7.15±2.7	6.60±1.5	2.19 ± 0.04
 4	11.66±1.1	12.85±2.1	2.68 ± 0.14
 5	5.21±2.4	3.45±1.9	3.74 ± 0.09
 6	NI	473.41±87	1.66 ± 0.05
 7	2.59±0.7	7.93±2.6	4.26 ± 0.03
 8	8.49±2.2	50.97±11.8	2.80 ± 0.04
 9	20.49±10.84	22.35±9.56	0.45 ± 0.01
 10	2.02 ± 0.8	4.84 ± 2.5	2.33 ± 0.03
 11	4.22 ± 1.5	9.55 ± 0.6	5.96 ± 0.07
 12	>25	>25	0.97 ± 0.02

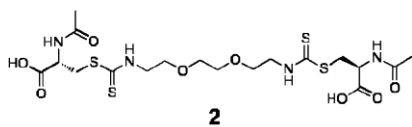
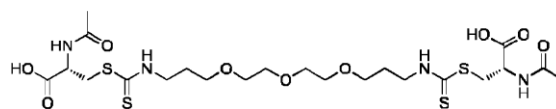
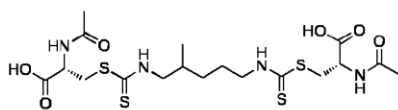
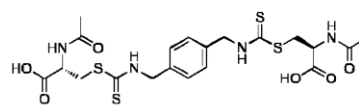
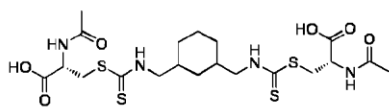
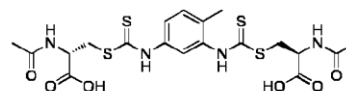
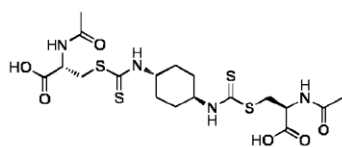
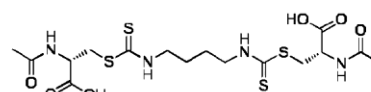
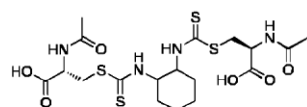
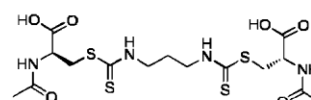
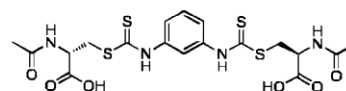
Zastrzeżenia patentowe

1. Pochodne merkapturowe diizotiocyanianów o wzorze ogólnym I w którym R oznacza łańcuch 1,2-dietoksy etanu, 2-metylopentanu, 1,3-dimetylocykloheksanu, cykloheksanu, 4,7,10-trioksytridekanu, 1,4-dimetylobenzenu, 1-metylobenzenu, butanu, propylenu oraz benzenu.
2. Sposób wytwarzania pochodnych merkapturowych diizotiocyanianów o wzorze ogólnym I, w którym R oznacza łańcuch 1,2-dietoksyetanu, 2-metylopentanu, 1,3-dimetylocykloheksanu, cykloheksanu, 4,7,10-trioksytridekanu oraz 1,4-dimetylobenzenu **znamienny tym**, że diaminę poddaje się reakcji z disiarczkiem węgla w obecności trietyloaminy w *N,N*-dimetyloformamidzie w temperaturze 0°C, a następnie po 15 minutach powstały produkt pośredni rozkłada się do diizotiocyanianu za pomocą heksafluorofosforanu 2-(1*H*-benzotriazolo-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowego.
3. Sposób wytwarzania pochodnych merkapturowych diizotiocyanianów o wzorze ogólnym I w którym R oznacza łańcuch 1-metylobenzenu, butanu, propylenu oraz benzenu **znamienny tym**, że diizotiocyanian rozpuszczony w izopropanolu poddaje się reakcji z *N*-acetylocysteiną rozpuszczoną w wodzie z dodatkiem wodorowęglanu sodu.
4. Zastosowanie pochodnych merkapturowych diizotiocyanianów o wzorze ogólnym I w którym R oznacza łańcuch 1,2-dietoksyetanu, 2-metylopentanu, 1,3-dimetylocykloheksanu, cykloheksanu, 4,7,10-trioksytridekanu, 1,4-dimetylobenzenu, 1-metylobenzenu, butanu, propylenu oraz benzenu jako środka farmaceutycznego przeznaczonego w szczególności do leczenia nowotworów opornych na doksorubicynę.
5. Zastosowanie pochodnych merkapturowych diizotiocyanianów o wzorze ogólnym I w którym R oznacza łańcuch 1,2-dietoksyetanu, 2-metylopentanu, 1,3-dimetylocykloheksanu, cykloheksanu, 4,7,10-trioksytridekanu, 1,4-dimetylobenzenu, 1-metylobenzenu, butanu, propylenu oraz benzenu jako inhibitorów deacetylazy histonowej.

Rysunki

**1**

Wzór I

**2****7****3****8****4****9****5****10****6****11****12**

