

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **235473**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **418685**

(22) Data zgłoszenia: **13.09.2016**

(51) Int. Cl.
C07D 471/04 (2006.01)
A61K 31/475 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **1-Podstawiona pochodna pirydokarbazolu o właściwościach przeciwnowotworowych
i sposób jej wytwarzania, jej zastosowanie oraz kompozycja farmaceutyczna
ją zawierająca**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
26.03.2018 BUP 07/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
24.08.2020 WUP 12/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny im. Piastów
Śląskich we Wrocławiu, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

BEATA TYLIŃSKA, Wysoka, PL
STANISŁAW RYNG, Wrocław, PL
KAZIMIERZ GAŚSIOROWSKI, Wrocław, PL
TOMASZ GĘBAROWSKI, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Gdula

PL 235473 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest pochodna pirydokarbazolu i sposób wytwarzania nowej pochodnej pirydokarbazolu o nazwie chemicznej 5,6-dimetylo-9-metoksy-1-(1-metylo-4-nitropirazol-5-ilo)-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazol.

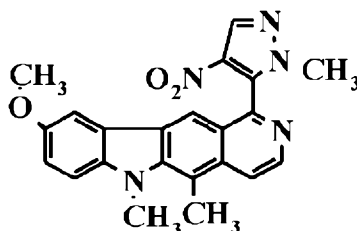
Nowa pochodna wykazuje aktywność cytostatyczną, cytotoksyczną i jest przeznaczona do leczenia chorób nowotworowych.

Poszukiwanie nowych, skutecznych terapii przeciwnowotworowych jest jednym z kluczowych wyzwań współczesnej medycyny. Chemioterapia to leczenie naturalnymi i syntetycznymi środkami cytostatycznymi. Naturalnymi cytostatykami są między innymi oliwacyna i eliptycyna. Jednak, te alkaloidy nie znalazły zastosowania w lecznictwie z uwagi na różne ograniczenia typu: mała rozpuszczalność w wodzie czy niepożądane efekty uboczne. Dlatego też, rozpoczęto poszukiwania pochodnych oliwacyny i eliptycyny, które będą miały małą toksyczność, ale również większą selektywność w stosunku do komórek nowotworowych.

W ciągu ostatnich 20 lat odnotowano znaczący postęp w rozwoju proleków przeciwnowotworowych posiadających zdolność do ulegania procesom bioredukcji, których skutkiem jest otrzymanie innego związku, mającego odmienne właściwości biologiczne. Taki proces bioredukcji zachodzi w środowisku słabo ukrwionym, a co za tym idzie – ubogim w tlen. Jedną z najbardziej charakterystycznych cech guza nowotworowego jest panująca w nim hipoksja, związana właśnie z niedokrwieniem, spowodowanym niedostatkami naczyń włosowatych obecnych w szybko rosnącej tkance nowotworowej.

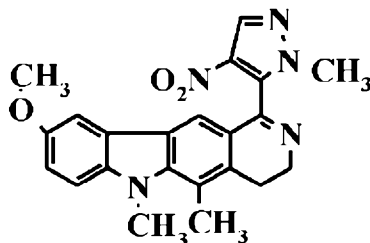
Celem wynalazku jest zapewnienie nowego, skutecznego związku o właściwościach przeciwnowotworowych, który pozwoliłby na przezwycięzenie istniejących niedogodności w leczeniu i zapobieganiu nowotworom poprzez zwiększenie aktywności cytostatycznej i cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych w warunkach hipoksji, z jednoczesnym znaczącym osłabieniem działania cytostatycznego i cytotoksycznego wobec komórek znajdujących się w warunkach normalnej prężności tlenu.

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest nowa pochodna pirydokarbazolu o nazwie chemicznej 5,6-dimetylo-9-metoksy-1-(1-metylo-4-nitropirazol-5-ilo)-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazol i o wzorze 1



Wzór 1

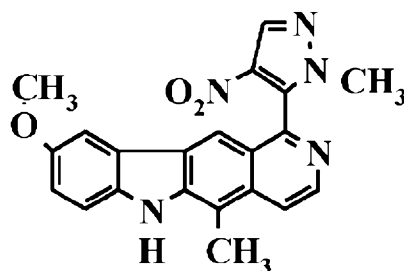
Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowej pochodnej pirydokarbazolu określonej powyżej o wzorze 1, charakteryzujący się tym, że 5,6-dimetylo-9-metoksy-1-(1-metylo-4-nitropirazol-5-ilo)-3,4-dihydro-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazol o wzorze 3



Wzór 3

rozpuszcza się w eterze difenylowym i dodaje się 10% pallad na węglu aktywnym, całość ogrzewa się w temperaturze wrzenia, następnie katalizator przesącza się, przesącz chłodzi do temperatury otoczenia i dodaje się heksan, powstały osad sączy się, zaś przesącz ekstrahuje 5% HCl, do oddzielonej wodnej części dodaje się NaHCO_3 i ekstrahuje chloroformem, po czym organiczne warstwy osusza się z użyciem MgSO_4 , po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu chloroformu na wyparce rotacyjnej powstały osad oczyszcza się przy pomocy chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym i wmywa produkt mieszaniną chloroform-metanol.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowej pochodnej pirydokarbazolu określonej powyżej wzorem 1, charakteryzujący się tym, że 9-metoksy-5-metylo-1-(1-metylo-4-nitropirazol-5-ilo)-6*H*-pirydo[4,3-*b*]karbazol o wzorze 2



Wzór 2

węglan potasu, węglan dimetylu, dimetyloformamid i 18-crown-6 miesza i ogrzewa się do temperatury wrzenia, następnie odparowuje się rozpuszczalnik, dodaje wodę i przeprowadza ekstrakcję chloroformem a uzyskany ekstrakt suszy się przy użyciu bezwodnego siarczanu magnezu, po czym odparowuje się chloroform, pozostałość oczyszcza się przy pomocy chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym i wmywa produkt chloroformem.

Innym przedmiotem wynalazku jest nowa pochodna pirydokarbazolu o wzorze 1, jak określono powyżej, do stosowania w leczeniu i profilaktyce przeciwnowotworowej.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna do zapobiegania lub leczenia nowotworu, charakteryzująca się tym, że zawiera jako substancję aktywną pochodną pirydokarbazolu o wzorze 1, jak określono powyżej i farmaceutycznie dopuszczalny nośnik.

Substancje pomocnicze lub dodatki do kompozycji farmaceutycznej według niniejszego wynalazku wybierać można spośród dopuszczonych farmaceutycznie nośników, substancji pomocniczych, substancji podtrzymujących, środków poślizgowych, wypełniaczy, rozpuszczalników, rozcieńczalników, barwników, substancji słodzących i zapachowych takich jak cukry, środków przeciwutleniających, środków wiążących, klejów, środków rozsadzających, środków antyadhezyjnych, środków poślizgowych i/lub zlepiających. W przypadku czopków, może to oznaczać woski lub estry kwasu tłuszczowego lub środki konserwujące, emulgatory i/lub nośniki do podawania pozajelitowego. Dobór tych substancji pomocniczych i/lub dodatków oraz ilości do stosowania zależą będzie od postaci zastosowania kompozycji farmaceutycznej. Kompozycja farmaceutyczna według niniejszego wynalazku może być w dowolnej postaci odpowiedniej do zastosowania u ludzi i/lub zwierząt, korzystnie ludzi, w tym niemowląt, dzieci i dorosłych i można je wytwarzać typowymi procedurami znanymi specjalistom w dziedzinie. A zatem, kompozycję według wynalazku można przystosować do podawania miejscowego lub ogólnoustrojowego, zwłaszcza do podawania dośkórnego, przezskórnego, podskórnego, domięśniowego, dostawowego, dootrzewnowego, dożylnego, dotętniczego, dopęcherzowego, dokostnego, dojamowego, dopłucznego, podpoliczkowego, podjęzykowego, dogałkowego, do ciała szklatego, donosowego, przezskórnego, doodbytniczego, dopochwowego, doustnego, nadtwardówkowego, dooponowego, dokomorowego, domózgowego, do komór mózgu, do przestrzeni podpajęczynówkowej, dordzeniowego, przykręgosłupowego, doczaszkowego, dostarczanego przez igły lub cewniki z urządzeniami pompującymi lub bez lub innymi drogami podawania. Wymienione preparaty będzie się wytwarzać z zastosowaniem typowych sposobów, takich jak te opisane w farmakopei oraz podobnych tekstach referencyjnych znanych w dziedzinie. W jednej realizacji według wynalazku, korzystnie związek według wynalazku stosuje się w terapeutycznie skutecznych ilościach. Lekarz określi dawkowanie niniejszego środka terapeutycz-

nego, które będzie najodpowiedniejsze i będzie się zmieniać wraz z postacią podawania i poszczególnym wybranym związkiem a ponadto, będzie się zmieniać w zależności od pacjenta poddanego leczeniu, wieku pacjenta, typu leczonej choroby lub leczonego stanu chorobowego. Gdy kompozycję podaje się doustnie, wówczas większe ilości substancji czynnej będą wymagane w celu wytworzenia takiego samego efektu jak mniejsza ilość podawana pozajelitowo. Związek jest przydatny w taki sam sposób, jak porównywalne środki terapeutyczne i poziom dawkowania jest takiego samego rzędu wielkości, jak jest ogólnie stosowany z tymi innymi środkami terapeutycznymi. Tę substancję czynną będzie się typowo podawać raz lub częściej na dobę np. 1, 2, 3 lub 4 razy na dobę, z typowymi całkowitymi dawkami dobowymi w zakresie od 0,1 do 1000 mg/kg/dobę.

Przedmiot wynalazku przedstawiono w przykładach wykonania i uwidoczniono na następujących figurach rysunku:

Figura 1. Test SRB. Zahamowanie wzrostu trzech linii komórek nowotworowych A549 (2A), CCRF/CEM (2B), MCF7 (2C) w hodowlach z nową pochodną pirydokarbazolu, eliptycyną i doksorubicyną. Stężenie hamujące (IC50) związków testowanych w normalnej zawartości tlenu (E0 pO₂=20%) i w hipoksji (E, pO₂ = 5%, pO₂ = 2%, pO₂ = 1%) [średnia ±SD; powtórzenia n = 5].

Figura 2. Ocena żywotności komórek trzech linii nowotworowych A549 (3A), CCRF/CEM (3B), MCF7 (3C) w hodowlach z nową pochodną pirydokarbazolu w teście redukcji MTT. Stężenie toksyczne (TD50) związków testowanych w normalnej zawartości tlenu E0 pO₂ = 20%) i w hipoksji (E, pO₂ = 5%, pO₂ = 2%, pO₂ = 1%) [średnia ±SD; powtórzenia n = 5].

Figura 3. Ocena żywotności komórek linii NHDF w teście redukcji MTT (żywotność w stosunku do kontroli [%], kontrola K = 100). Na wykresie przedstawiono stężenia nowej pochodnej.

Figura 4. Porównanie aktywności (zahamowanie wzrostu linii nowotworowych) nowej pochodnej pirydokarbazolu (E) w stosunku do doksorubicyny (E0) – 1/(E/E0). Doksorubicyną = 1.

Figura 5. Porównanie aktywności (toksyczność dla linii nowotworowych) nowej pochodnej pirydokarbazolu (E) w stosunku do doksorubicyny (E0) – 1/(E/E0). Doksorubicyną = 1.

Przedmiot wynalazku wytwarza się według podanego poniżej przykładu:

Metoda 1. 0,80 g (2 mmol) 5,6-dimetylo-9-metoksy-1-(1-metylo-4-nitropirazol-5-ilo)-3,4-dihydro-6H-pirydo[4,3-b]karbazolu o wzorze 3 rozpuszcza się w 80 ml eteru difenyłowego i dodaje się 0,10 g 10% palladu na węglu aktywnym. Całość ogrzewa się w temperaturze wrzenia przez 2 godziny. Po tym czasie katalizator przesącza się, przesącz chłodzi do temperatury otoczenia i dodaje 100 ml heksanu. Powstały osad sączy się, zaś przesącz ekstrahuje 40 ml 5% HCl. Do oddzielonej wodnej części dodaje się NaHCO₃ i ekstrahuje 200 ml chloroformu. Warstwy organiczne osusza się MgSO₄. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu chloroformu na wyparce rotacyjnej, powstały osad oczyszcza się na kolumnie chromatograficznej z użyciem żelu krzemionkowego i wymywa mieszaniną chloroform-metanol (98:2). Otrzymuje się nowy związek o nazwie chemicznej 5,6-dimetylo-9-metoksy-1-(1-metylo-4-nitropirazol-5-ilo)-6H-pirydo[4,3-b]karbazol o wzorze 1 i temperaturze topnienia 286–288°C.

Metoda 2. 0,77 g (2 mmol) 9-metoksy-5-metylo-1-(1-metylo-4-nitropirazol-5-ilo)-6H-pirydo[4,3-b]-karbazolu o wzorze 2, 0,6 g węglanu potasu, 40 ml węglanu dimetylu, 2 ml dimetyloformamidu i 0,02 g 18-crown-6 miesza się i ogrzewa do temperatury wrzenia. Reakcję prowadzi się przez 24 godziny. Następnie, odparowuje się rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej, dodaje 50 ml wody i przeprowadza ekstrakcję chloroformem. Ekstrakt suszy się z użyciem bezwodnego siarczanu magnezu. Po odsączeniu środka suszącego odparowuje się chloroform, a pozostałość oczyszcza się przy pomocy chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, wymywając produkt chloroformem. Otrzymuje się nowy związek o nazwie chemicznej 5,6-dimetylo-9-metoksy-1-(1-metylo-4-nitropirazol-5-ilo)-6H-pirydo[4,3-b]karbazol o wzorze 1 i temperaturze topnienia 286–288°C.

Charakterystyka związku o wzorze 1 jest następująca:

Wyniki analizy elementarnej dla wzoru sumarycznego C₂₂H₁₉N₅O₃: (m.cz. 401,43) mieszczą się w granicach ± 0,3% w porównaniu z wartościami obliczonymi. Temperatura topnienia 286–288°C.

Spektroskopia: ¹H NMR (CDCl₃-d₆) δ = ppm: 3,15 (s, 3H, 5-CH₃), 3,74 (s, 3H, 1'-CH₃), 3,94 (s, 3H, 9-OCH₃), 4,15 (s, 3H, 6-CH₃), 7,19 (d, J₈₋₇ = 8,8 Hz, 1H, 8-H), 7,30 (d, J₇₋₈ = 8,8 Hz, 1H, 7-H), 7,52 (s, 1H, 10-H), 8,04 (s, 1H, pirazol), 8,14 (d, J₄₋₃ = 6,2 Hz, 1H, 4-H), 8,39 (s, 1H, 11-H), 8,63 (d, J₃₋₄ = 6,2 Hz, 1H, 3-H).

Charakterystyka związku o wzorze 2 jest następująca:

Wyniki analizy elementarnej dla wzoru sumarycznego C₂₁H₁₇N₅O₃: (m.cz. 387,40) mieszczą się w granicach ± 0,3% w porównaniu z wartościami obliczonymi. Temperatura topnienia 279–281°C.

Spektroskopia: ^1H NMR (DMSO-d_6) δ = ppm: 2,89 (s, 3H, 5- CH_3), 3,69 (s, 3H, 1'- CH_3), 3,83 (m, 3H, 9- OCH_3), 7,13 (m, 1H, 8-H), 7,45 (d, J_{7-8} = 8,7 Hz, 1H, 7-H), 7,91 (s, 1H, 10-H), 8,17 (d, J_{4-3} = 6,1 Hz, 1H, 4-H), 8,56 (d, J_{3-4} = 6,1 Hz, 1H, 3-H), 8,44 (s, 1H, pirazol), 8,61 (s, 1H, 11-H), 11,35 (s, 1H, 6-NH).

Charakterystyka związku o wzorze 3 jest następująca:

Wyniki analizy elementarnej dla wzoru sumarycznego $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3$: (m.cz. 403,44) mieszczą się w granicach $\pm 0,3\%$ w porównaniu z wartościami obliczonymi. Temperatura topnienia 237–239°C.

Spektroskopia: ^1H NMR (DMSO-d_6) δ = ppm: 2,71 (s, 3H, 5- CH_3), 3,20 (m, 2H, 4- CH_2), 3,79 (s, 3H, 1'- CH_3), 3,83 (s, 3H, 9- OCH_3), 3,91 (m, 2H, 3- CH_2), 4,11 (s, 3H, 6- CH_3), 7,07 (m, 1H, 8-H), 7,48 (m, 1H, 7-H), 7,63 (s, 1H, 10-H), 8,44 (s, 1H, pirazol), 8,59 (s, 1H, 11-H).

Wykonano również ocenę działania cytostatycznego i cytotoksycznego pochodnej wobec komórek prawidłowych (fibroblasty skórne NHDF).

Otrzymana nowa, wyżej wymieniona pochodna, wykazuje aktywności: cytostatyczną, polegającą na hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych, oraz cytotoksyczną, polegającą na zmniejszeniu żywotności komórek nowotworowych w warunkach obniżonej zawartości O_2 . Wzrost komórek był mierzony w teście SRB, polegającym na pomiarze ilości białka komórkowego. Pomiar żywotności komórek wykonano z wykorzystaniem testu redukcji MTT. Wzrostu aktywności przeciwnowotworowej nie można było z góry przewidzieć. Działanie zostało potwierdzone *in vitro* na trzech nowotworowych liniach ciągłych: CCRF/CEM (białaczka T limfocytarna), A-549 (gruczolakorak płuc), MCF-7 (gruczolakorak piersi). Wyniki testu SRB przedstawiono w tabeli 1, wyniki testu MTT przedstawiono w tabeli 2. Otrzymane wyniki wykazały zwiększony wzrost komórek linii nowotworowych w warunkach hipoksji i spadek wzrostu w przypadku prawidłowych fibroblastów (NHDF).

Tabela 1. Test SRB. Zahamowanie wzrostu trzech linii komórek nowotworowych A549, CCRF/CEM, MCF7 w hodowlach z nową pochodną pirydokarbazolu, eliptycyną i doksorubicyną

Stężenie hamujące (IC50) związków testowanych w normalnej zawartości tlenu (E0 pO₂=20%) i w hipoksji (E, pO₂=5%, pO₂=2%, pO₂=1%) [średnia ±SD; powtórzenia n=5]. Przedstawiono dodatkowo stosunek E/E0

linie komórkowe	badane związki	E0 IC ₅₀ [μM]; (pO ₂ =20%)		E1 IC ₅₀ [μM]; (pO ₂ =5%)		E2 IC ₅₀ [μM]; (pO ₂ =2%)		E3 IC ₅₀ [μM]; (pO ₂ =1%)		E/E0		
		n=5	SD	n=5	SD	n=5	SD	n=5	SD	E1/E0	E2/E0	E3/E0
A549	Badana pochodna	30,5	5,05	1,27	0,23	0,65	0,019	0,69	0,01	0,04	0,02	0,02
	Eliptycyna	0,79	0,028	1,08	0,06	0,59	0,075	0,67	0,00	1,36	0,75	0,85
	Doksorubicyna	0,72	0,019	0,93	0,05	0,48	0,017	0,69	0,01	1,29	0,67	0,95
CCRF/CEM	Badana pochodna	3,75	0,934	1,45	0,23	2,01	0,396	0,61	0,05	0,39	0,54	0,16
	Eliptycyna	0,86	0,136	0,78	0,10	1,3	0,323	0,72	0,04	0,91	1,51	0,84
	Doksorubicyna	0,71	0,04	0,63	0,07	0,7	0,095	0,59	0,02	0,89	0,99	0,82
MCF7	Badana pochodna	11,25	3,429	1,49	0,14	0,81	0,045	0,81	0,06	0,13	0,07	0,07
	Eliptycyna	0,72	0,129	0,76	0,01	0,51	0,062	0,71	0,04	1,06	0,71	0,99
	Doksorubicyna	0,48	0,003	0,76	0,04	0,57	0,044	0,75	0,04	1,58	1,19	1,56

Dane przedstawione w Tabeli 1 i na Figurze 1 pokazują, że nowo syntetyzowana pochodna pirydokarbazolu wykazuje relatywnie słabe działanie cytostatyczne w stosunku do trzech linii komórek nowotworowych w hodowli z normalną zawartością tlenu – normoksja (20% O₂). Dla pochodnej, standardowego cytostatyku – doksorubicyny i modelowego pirydokarbazolu – eliptycyny, wyliczono dawkę IC₅₀

(dawka związku, przy której następuje 50% zahamowanie proliferacji). W porównaniu ze związkami kontrolnymi, wartość oznaczona dla pochodnej była istotnie wyższa, czyli aktywność pochodnej była niższa niż związków kontrolnych. Natomiast, w warunkach hipoksji działanie cytostatyczne pochodnej było silne, porównywanie z działaniem standardowych cytostatyków (doksorubicyną i eliptycyną), szczególnie w stosunku do A549 (gruczolakorak płuc) i MCF7 (rak piersi). Efekty wywierane przez pochodną w hipoksji oraz w warunkach normalnej zawartości tlenu porównano w Tabeli 1 i wyrażono jako stosunek E/E₀. Wyniki pokazują, że aktywność cytostatyczna pochodnej w warunkach hipoksji była znacznie wyższa od jej działania w warunkach normalnej zawartości tlenu. W przypadku, doksorubicyny, jak i eliptycyny obserwowane różnice aktywności (wartości E/E₀) były wielokrotnie mniejsze.

Tabela 2. Ocena żywotności komórek trzech linii nowotworowych w hodowlach z nową pochodną pirydokarbazolu w teście redukcji MTT

Stężenie toksyczne (TD₅₀) związków testowanych w normalnej zawartości tlenu E₀ pO₂=20%) i w hipoksji (E, pO₂=5%, pO₂=2%, pO₂=1%) [średnia ±SD, powtórzenia n=5]. Przedstawiono dodatkowo stosunek E/E₀

linie komórkowe	badane związki	E ₀ TD ₅₀ [μM]; (pO ₂ =20%)		E ₁ TD ₅₀ [μM]; (pO ₂ =5%)		E ₂ TD ₅₀ [μM]; (pO ₂ =2%)		E ₃ TD ₅₀ [μM]; (pO ₂ =1%)		E/E ₀		
		n=5	SD	n=5	SD	n=5	SD	n=5	SD	E1/E0	E2/E0	E3/E0
A549	Badana pochodna	34,20	16,74	3,36	1,13	2,35	0,31	0,97	0,10	0,10	0,07	0,03
	Eliptycyna	17,63	0,62	17,42	0,80	15,94	3,28	5,73	0,51	0,99	0,90	0,32
	Doksorubicyna	1,92	0,35	1,95	0,11	1,99	0,35	1,28	0,17	1,01	1,04	0,66
CCRF/CEM	Badana pochodna	3,97	0,65	3,04	0,26	0,58	0,04	0,67	0,03	0,77	0,15	0,17
	Eliptycyna	0,94	0,08	0,95	0,04	0,56	0,01	0,62	0,04	1,01	0,60	0,66
	Doksorubicyna	0,74	0,02	0,74	0,03	0,54	0,01	0,67	0,04	1,00	0,74	0,90
MCF7	Badana pochodna	10,88	2,11	4,1	0,8	3,8	1,2	2,3	1,0	0,38	0,35	0,21
	Eliptycyna	1,95	0,40	2,4	0,4	2,6	0,6	1,7	1,1	2,32	2,50	1,58
	Doksorubicyna	0,87	0,21	1,5	0,1	1,0	0,1	0,5	0,0	1,77	1,20	0,61

Dane przedstawione w Tabeli 2 na Figurze 2 pokazują, że nowo syntetyzowana pochodna pirydokarbazolu wykazuje słabe działanie cytotoksyczne w stosunku do trzech linii komórek nowotworo-

wych w hodowli z normalną zawartością tlenu – normoksja (20% O₂); natomiast znaczny efekt cytotoksyczny obserwowany był w hodowlach w warunkach hipoksji (O₂: 5%, 2% i 1%) i był on porównywalny z efektem wywoływanym przez standardowe cytostatyki (doksorubicyną i eliptycyną). Niezwykle korzystne jest to, że związek według wynalazku różni się od znanych i stosowanych cytostatyków, np. doksorubicyny i eliptycyny, tym, że wykazuje aktywność wyłącznie w warunkach hipoksji, typowych dla rozwijającej się intensywnie tkanki nowotworowej, tymczasem znane cytostatyki działają niezależnie od warunków tlenowych.

Wyniki pokazują, że aktywność cytostatyczna badanej pochodnej w hodowlach w warunkach hipoksji była znacznie zwiększona w porównaniu z jej działaniem w warunkach normalnej prężności tlenu. W związku z tym, na podstawie powyższych analiz można stwierdzić, że badany związek działa na komórki nowotworowe, będzie zaś obojętny wobec zdrowych komórek, a zatem doskonale spełnia wymagania stawiane związkom przeciwnowotworowym.

Tabela 3. Ocena żywotności komórek linii NHDF w teście redukcji MTT (żywotność w stosunku do kontroli [%], kontrola K=100)

Stężenie O ₂	Badana pochodna										Doksorubicyna		Eliptycyna	
	1 μM		2 μM		5 μM		10 μM		20 μM		20 μM		20 μM	
	n=5	SD	n=5	SD	n=5	SD	n=5	SD	n=5	SD	n=5	SD	n=5	SD
(pO ₂ =20%)	89,3	6,4	88,5	12,1	65,8	7,1	77,3	5,9	62,3	14,2	36,6	14,5	34,4	17,2
(pO ₂ =1%)	95,1	14,6	91,0	9,7	83,2	8,2	86,8	10,4	64,6	7,7	22,4	0,8	47,6	3,1

W Tabeli 3 i na Figurze 3 przedstawiono wpływ badanej pochodnej na żywotność komórek prawidłowych – komórki pierwotne, prawidłowe fibroblasty ludzkie skórną (NHDF). Nie stwierdzono istotnego oddziaływania cytostatycznego na fibroblasty skórną w teście SRB w całym zakresie testowanych stężeń a ocena w teście redukcji MTT pokazała większą (2–3-krotnie) żywotność hodowli z pochodną pirydokarbazolu w porównaniu z hodowlami kontrolnymi prowadzonymi ze standardowymi cytostatykami (doksorubicyną, eliptycyną).

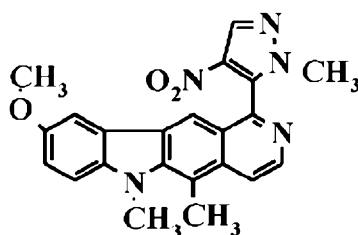
Przeprowadzone porównanie wykazało (Figura 4 i 5), że aktywność badanej pochodnej różniła się w zależności od prężności tlenu podczas testu, zarówno w teście MTT, jak i SRB. W przypadku związku wzorcowego doksorubicyny, różnice efektu w zależności od prężności O_2 w hodowlach były znacząco mniejsze w teście SRB, a w przypadku testu MTT nie były statystycznie istotne.

Porównanie efektu badanej pochodnej pirydokarbazolu wywieranego na hodowlę komórek linii nowotworowych użytych do badania pokazało, że związek ten nie różnił się swoim wpływem w przypadku oceny żywotności komórek (MTT), natomiast wykazał niewielkie, chociaż statystycznie istotne, różnice w zakresie wpływu na proliferację (SRB) trzech linii nowotworowych.

Uzyskane wyniki pokazały, że otrzymana pochodna wykazuje znacznie zwiększoną aktywność cytostatyczną i cytotoksyczną na komórki nowotworowe w warunkach hipoksji, przy słabym działaniu cytostatycznym i cytotoksycznym w hodowlach komórek w normalnej prężności tlenu (normoksji).

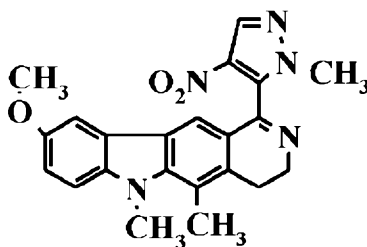
Zastrzeżenia patentowe

1. Nowa pochodna pirydokarbazolu o nazwie chemicznej 5,6-dimetylo-9-metoksy-1-(1-metylo-4-nitropirazol-5-ilo)-6*H*-pirydo[4,3-*b*]karbazol, o wzorze 1:



Wzór 1

2. Sposób wytwarzania nowej pochodnej pirydokarbazolu określonej w zastrz. 1, **znamienny tym**, że 5,6-dimetylo-9-metoksy-1-(1-metylo-4-nitropirazol-5-ilo)-3,4-dihydro-6*H*-pirydo[4,3-*b*]-karbazol o wzorze 3:

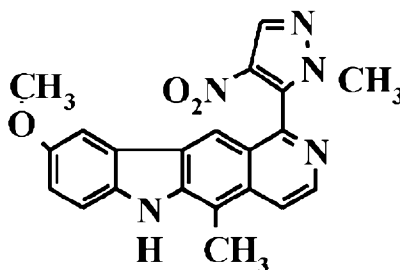


Wzór 3

rozpuszcza się w eterze difenylowym i dodaje się katalizator zawierający pallad, korzystnie 10% pallad na węglu aktywnym, całość ogrzewa się w temperaturze wrzenia, następnie katalizator przesącza się, przesącz chłodzi do temperatury otoczenia i dodaje się heksan, powstały osad sączy się, zaś przesącz ekstrahuje, korzystnie 5% HCl, do oddzielonej wodnej części dodaje się $NaHCO_3$ i ekstrahuje chloroformem, po czym organiczne warstwy osusza się, korzystnie z użyciem $MgSO_4$, po odsączeniu środka suszającego i odparowaniu chloroformu, korzystnie na

wyparce rotacyjnej powstały osad oczyszcza się przy pomocy chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym i wymywa produkt mieszaniną chloroform-metanol.

3. Sposób wytwarzania nowej pochodnej pirydokarbazolu określonej w zastrz. 1, **znamienny tym**, że 9-metoksy-5-metylo-1-(1-metylo-4-nitropirazol-5-ilo)-6*H*-pirydo[4,3-*b*]]karbazol o wzorze 2:



Wzór 2

węglan potasu, węglan dimetylu, dimetyloformamid i 18-crown-6 miesza się i ogrzewa się do temperatury wrzenia, następnie odparowuje się rozpuszczalnik, dodaje wodę i przeprowadza ekstrakcję chloroformem a uzyskany ekstrakt suszy się, korzystnie przy pomocy bezwodnego siarczanu magnezu, po czym odparowuje się chloroform a pozostałość oczyszcza się przy pomocy chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, wymywając produkt chloroformem.

4. Nowa pochodna pirydokarbazolu jak określono w zastrz. 1, do stosowania w leczeniu i profilaktyce przeciwnowotworowej.
5. Kompozycja farmaceutyczna do zapobiegania lub leczenia nowotworu, **znamienna tym**, że zawiera jako substancję aktywną pochodną pirydokarbazolu jak określono w zastrz. 1 i farmaceutycznie dopuszczalny nośnik.

Rysunki

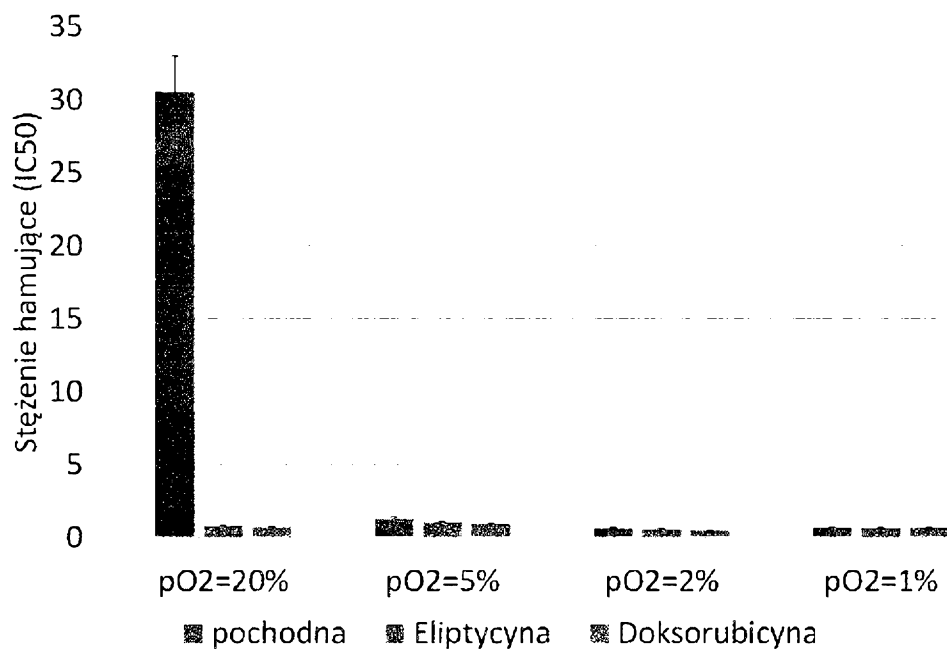


Figura 1A

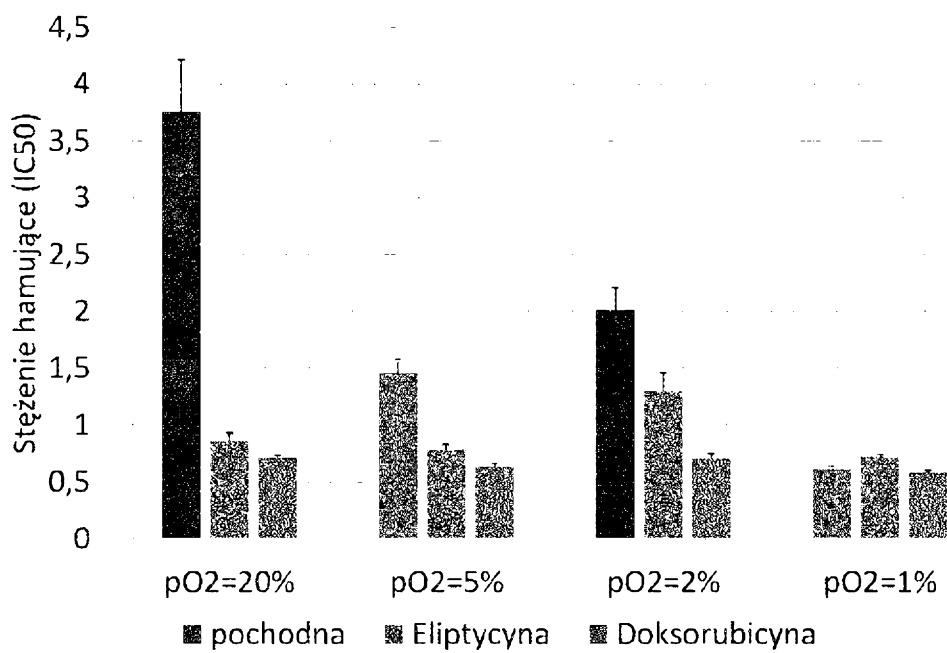


Figura 1B

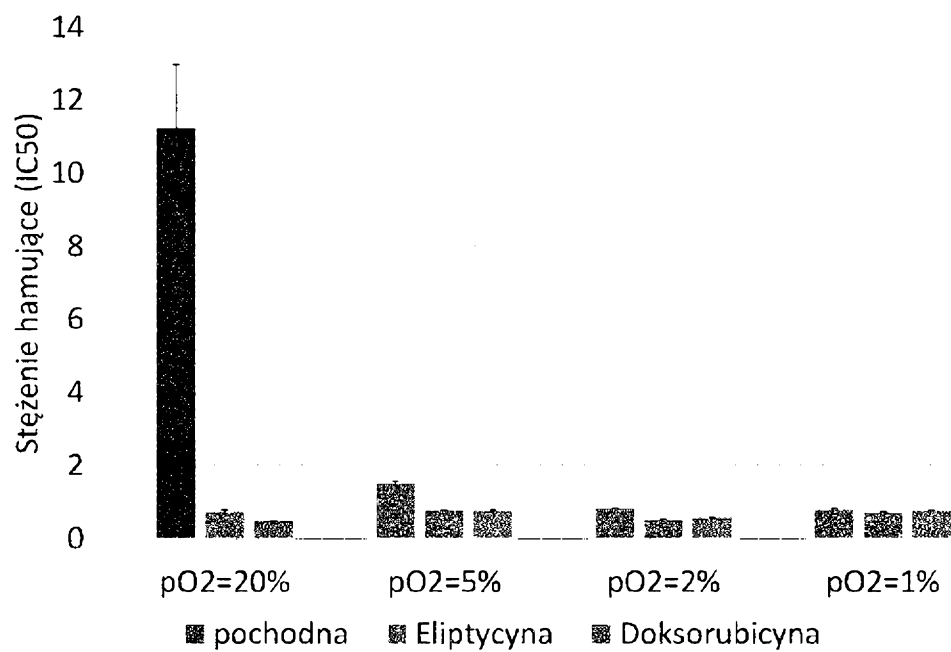


Figura 1C

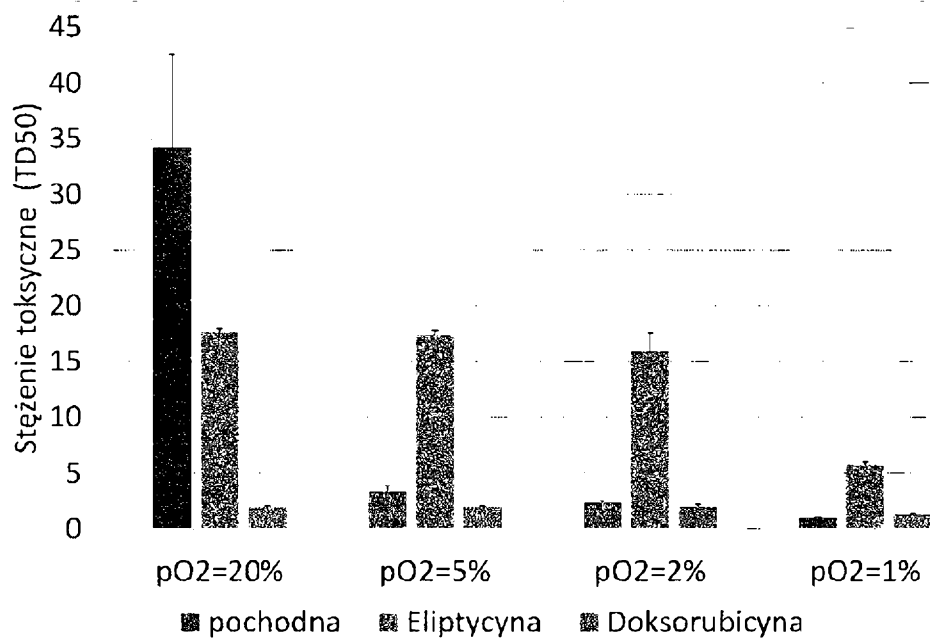


Figura 2A

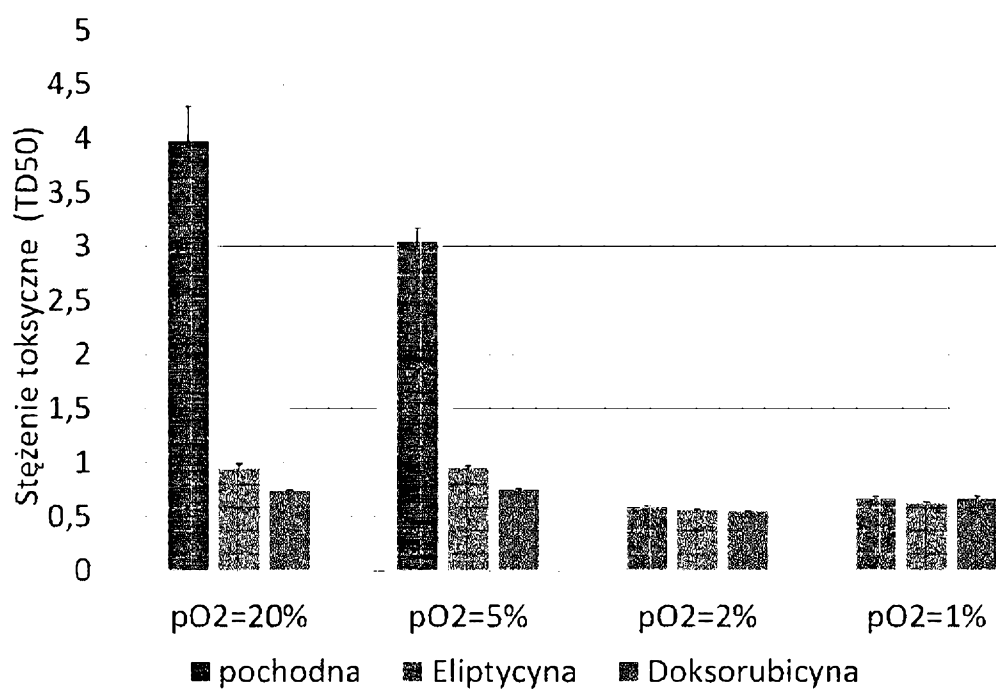


Figura 2B

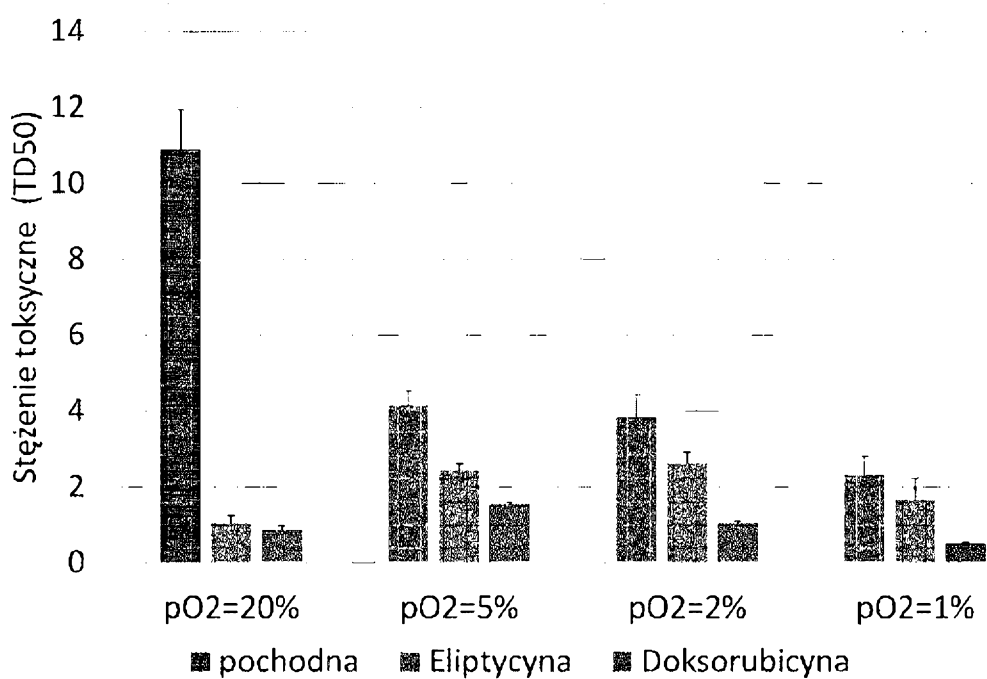


Figura 2C

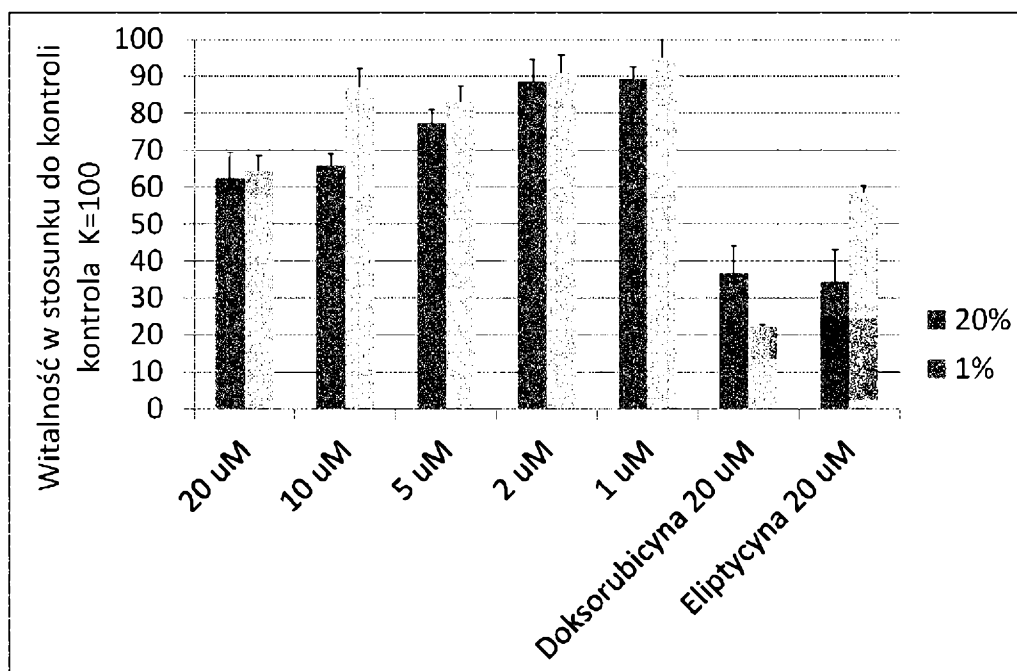


Figura 3

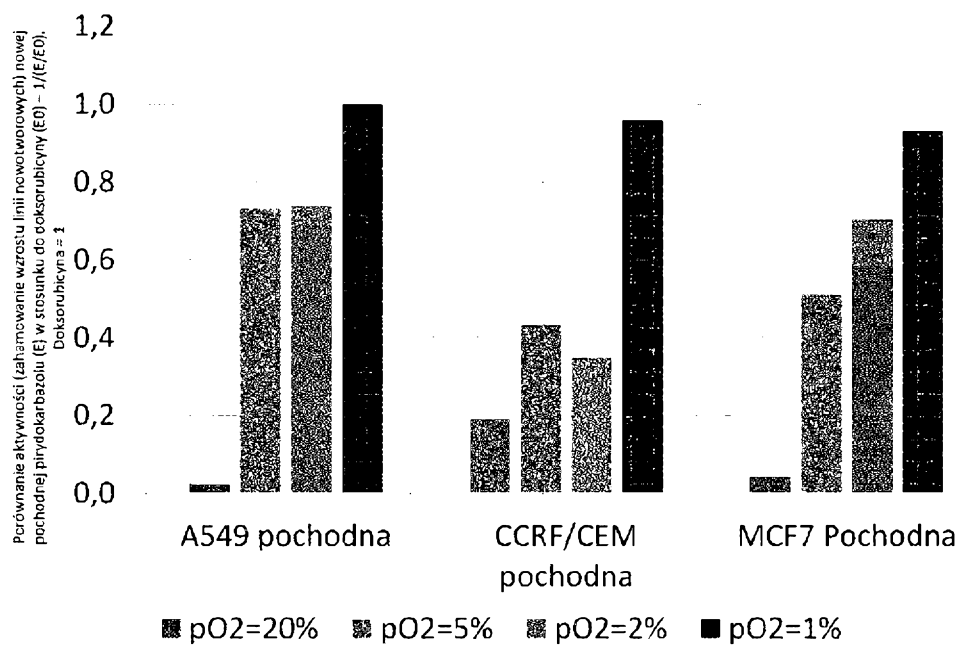


Figura 4

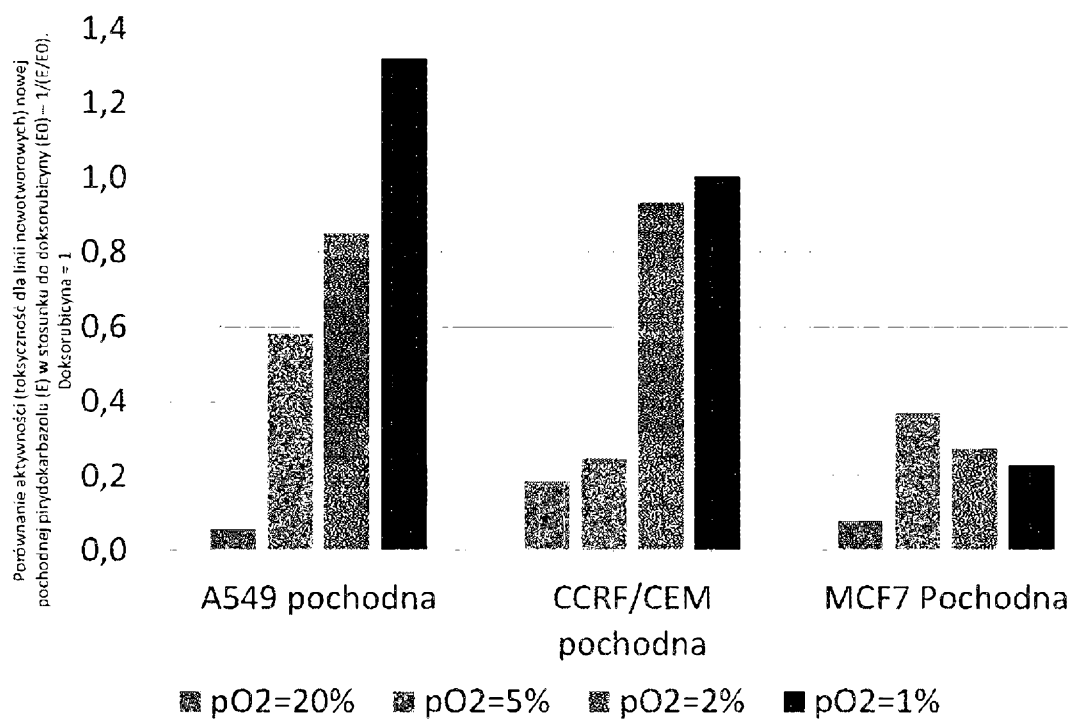


Figura 5