

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **235212**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **421672**

(22) Data zgłoszenia: **22.05.2017**

(51) Int.Cl.

C07C 331/20 (2006.01)

C07C 317/32 (2006.01)

A61K 31/26 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Nowe pochodne sulforafanu, sposób ich wytwarzania i zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

03.12.2018 BUP 25/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

15.06.2020 WUP 07/20

(73) Uprawniony z patentu:

**CENTRUM BADAŃ MOLEKULARNYCH
I MAKROMOLEKULARNYCH
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Łódź, PL
NARODOWY INSTYTUT LEKÓW, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**TOMASZ CIERPIAŁ, Częstochowa, PL
PIOTR KIEŁBASIŃSKI, Łódź, PL
ZDZISŁAW CHILMOŃCZYK, Warszawa, PL
KATARZYNA WIKTORSKA, Warszawa, PL
KATARZYNA LUBELSKA, Szydłów, PL**

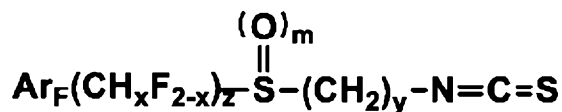
(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Michał Wróblewski

PL 235212 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe pochodne naturalnego produktu, sulforafanu $\text{CH}_3\text{S}(\text{O})(\text{CH}_2)_4\text{NCS}$, w postaci sulfidów, sulfoksydów, ω -izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowych bądź ω -izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)alkilowych o wzorze 1,



wzór 1

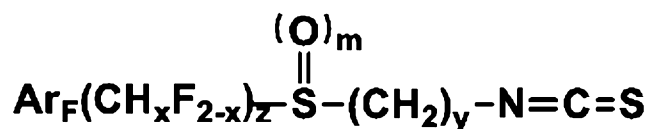
w którym Ar_F oznacza grupę polifluoroarylową o wzorze $\text{C}_6\text{H}_k(\text{CF}_3)_p\text{F}_{5-k-p}$, gdzie k oznacza liczbę naturalną od 0 do 4, p oznacza liczbę 0, 1 lub 2, x oznacza liczbę 0, 1 lub 2, z oznacza liczbę 0, 1 lub 2, m oznacza liczbę 0 lub 1, a y oznacza liczbę naturalną od 3 do 6, sposób ich wytwarzania i zastosowanie w leczeniu chorób onkologicznych lub hematologicznych.

Pochodne sulforafanu według wynalazku otrzymano poprzez zastąpienie w cząsteczce sulforafanu grupy metylowej, związanej z sulfinylowym atomem siarki, podstawnikami polifluoroarylowymi, bądź polifluoroarylo(fluoro)alkilowymi oraz ewentualnie poprzez zmianę liczby grup metylenowych w łańcuchu łączącym centralny atom siarki z izotiocyanianowym atomem azotu, a także poprzez zmianę stopnia utlenienia centralnego atomu siarki.

Związki według niniejszego wynalazku nie były dotychczas opisane w literaturze chemicznej.

Nieoczekiwanie, w trakcie badań własnych, okazało się, że uzyskane sposobem według wynalazku nowe połączenia, odznaczają się wzmocnionym działaniem biologicznym i nowymi właściwościami leczniczymi, w szczególności jako środki zwalczające niektóre komórki nowotworowe.

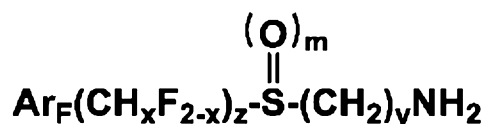
Pochodne sulforafanu, w postaci sulfidów lub sulfoksydów ω -izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowych lub ω -izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)-alkilowych, przedstawione wzorem 1,



wzór 1

w którym Ar_F oznacza grupę polifluoroarylową o wzorze $\text{C}_6\text{H}_k(\text{CF}_3)_p\text{F}_{5-k-p}$, gdzie k oznacza liczbę naturalną od 0 do 4, p oznacza liczbę 0, 1 lub 2, x oznacza liczbę 0, 1 lub 2, z oznacza liczbę 0, 1 lub 2, m oznacza liczbę 0 lub 1, a y oznacza liczbę naturalną od 3 do 6, w tym sulfidy o wzorze 1 dla $m = 0$, sulfoksydy ω -izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowe o wzorze 1 dla $m = 1$, z wyłączeniem związku o wzorze 1, gdzie $k = 4$, $m = 1$, $p = 0$, $x = 0$, $y = 4$, $z = 0$.

Sposób wytwarzania pochodnych sulforafanu o wzorze 1, w którym Ar_F oznacza grupę polifluoroarylową o wzorze $\text{C}_6\text{H}_k(\text{CF}_3)_p\text{F}_{5-k-p}$, gdzie k oznacza liczbę naturalną od 0 do 4, p oznacza liczbę 0, 1 lub 2, x oznacza liczbę 0, 1 lub 2, z oznacza liczbę 0, 1 lub 2, m oznacza liczbę 0 lub 1, a y oznacza liczbę naturalną od 3 do 6, według wynalazku polega na tym, że prekursorzy o wzorze 2 ($m = 0$ lub $m = 1$)



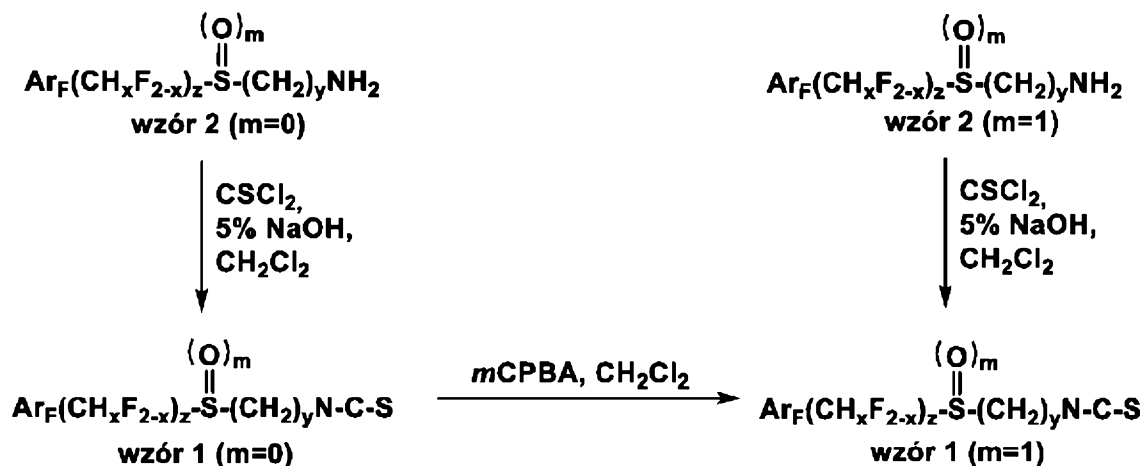
wzór 2

($m=0, 1$)

poddaje się reakcji z tiofosgenem w obecności wodorotlenku sodu, do otrzymania odpowiedniego sulfidu ω -izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowego bądź ω -izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)alkilowego o wzorze 1 ($m = 0$), który następnie utlenia się za pomocą środka utleniającego,

wybranego z grupy obejmującej kwas m-chloroperbenzoesowy (mCPBA), oksazirydyny Davisa, metanad sodu (NaIO₄) lub nadtlenek wodoru (H₂O₂), tworząc sulfoksyd ω-izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowy bądź ω-izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)-alkilowy, o wzorze 1 (m = 1), w których Ar_F, x, z, oraz y mają podane wyżej znaczenie.

Metodologię według wynalazku ilustrują syntezy związków pokazane na Schemacie 1.



SCHEMAT 1

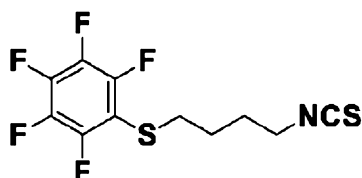
Prekursory o wzorze 2 otrzymać można według opisanych wcześniej w literaturze metod^[1-4]. Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

Procedura I. Procedura ogólna wytwarzania sulfidów ω-izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowych bądź ω-izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)-alkilowych o wzorze 1 (m = 0).

Do schłodzonego do 0°C roztworu sulfidu ω-amino-1-alkilowo-polifluoroarylowego o wzorze 2 (m = 0) (1.85 mmol) w CHCl_3 (10 ml) wkroplono tiofosgen (CSCl_2) (2 mmol), a po chwili wodny roztwór NaOH (6 mmol, 2 ml H_2O). Roztwór mieszano przez 1 h utrzymując temperaturę 0°C, a następnie przez noc w temperaturze pokojowej. Po tym czasie rozdzielono warstwy. Fazę wodną ekstrahowano CHCl_3 (2x10 ml). Połączone fazy organiczne suszono bezwodnym MgSO_4 . Odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując surowy produkt, który oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej.

Otrzymano w ten sposób odpowiedni czysty sulfid ω-izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowy o wzorze 1 (m = 0).

P r z y k ł a d I. Sulfid 2',3',4',5',6'-pentafluorofenylo-4-izotiocyaniano-1-butylo-owy o wzorze 1 (k = 0, p = 0, m = 0, y = 4, z = 0). Wydajność 41% po oczyszczaniu za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując jako eluent układ rozpuszczalników CH_2Cl_2 -heksan w gradiencie.

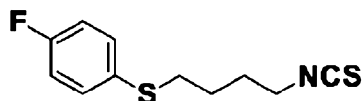


¹H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 3.55 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.91 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.99 – 1.58 (m, 4H).

¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -131.38 – -132.37 (m), -151.23 – -151.76 (m), -159.65 – -160.19 (m).

MS (Cl/izobutan): m/z = 314 [M+H]⁺.

P r z y k ł a d II. Sulfid 4'-fluorofenylo-4-izotiocyaniano-1-butylo-owy o wzorze 1 (k = 4, p = 0, m = 0, y = 4, z = 0). Wydajność 37% po oczyszczaniu za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując jako eluent układ rozpuszczalników CH_2Cl_2 -heksan w gradiencie.



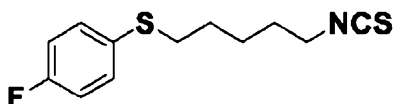
^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.43 – 7.29 (m, H), 7.06 – 6.92 (m, 2H), 3.53 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.89 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.93 – 1.61 (m, 4H).

$^1\text{H}\{^{19}\text{F}\}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 7.46 – 7.29 (m, 2H), 7.10 – 6.91 (m, 2H), 3.53 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.89 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.97 – 1.61 (m, 4H).

^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -114.40 – -114.37 (m).

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -114.51 (s).

P r z y k ł a d III. Sulfid 4'-fluorofenylo-4-izotiocyjaniano-1-pentylowy o wzorze 1 (k = 4, p = 0, m = 0, y = 4, z = 0). Wydajność 37% po oczyszczaniu za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując jako eluent układ rozpuszczalników CH_2Cl_2 -heksan w gradiencie.



^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.40 – 7.28 (m, 2H), 7.06 – 6.93 (m, 2H), 3.50 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.80 – 1.42 (m, 6H).

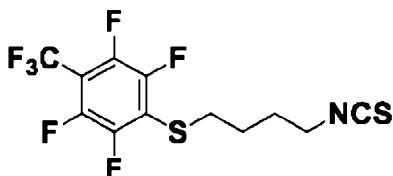
$^1\text{H}\{^{19}\text{F}\}$ NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.42 – 7.28 (m, 2H), 7.10 – 6.89 (m, 2H), 3.50 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.85 – 1.40 (m, 6H).

^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -114.80 – -115.07 (m).

^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -114.93 (s).

P r z y k ł a d IV. Sulfid 4'-(trifluorometylo)-2',3',5',6'-tetrafluorofenylo-4-izotiocyjaniano-1-butylowy o wzorze 1 (k = 0, p = 1, m = 0, y = 4, z = 0).

Wydajność 25% po oczyszczaniu za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując jako eluent układ rozpuszczalników CH_2Cl_2 -heksan w gradiencie.



^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 3.56 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.08 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.02 – 1.61 (m, 4H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 148.51 – 147.45 (m), 146.27 – 145.78 (m), 145.70 – 144.86 (m), 143.59 – 142.55 (m), 131.04 (s), 120.72 – 119.52 (m), 44.60 (s), 33.38 (s), 28.64 (s), 26.89 (s).

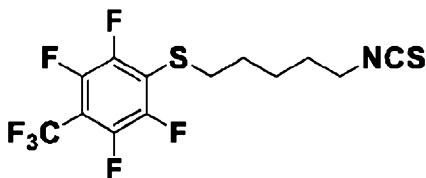
^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -55.66 (t, $J = 21.7$ Hz), -131.58 – -132.06 (m), -138.98 – -139.84 (m).

MS (EI): $m/z = 363$ $[\text{M}]^+$.

HRMS: m/z obliczono $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_7\text{NS}_2$ 362.99864, znaleziono 362.99773.

P r z y k ł a d V. Sulfid 4'-(trifluorometylo)-2',3',5',6'-tetrafluorofenylo-5-izotiocyjaniano-1-pentylowy o wzorze 1 (k = 0, p = 1, m = 0, y = 4, z = 0).

Wydajność 40% po oczyszczaniu za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując jako eluent układ rozpuszczalników CH_2Cl_2 -heksan w gradiencie.



^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 3.53 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.06 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.86 – 1.44 (m, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 148.40 – 147.65 (m), 146.40 – 145.59 (m), 145.46 – 145.02 (m), 143.52 – 142.77 (m), 130.36 (s), 120.59 (s), 44.96 (s), 33.94 (s), 29.54 (s), 29.27 (s).

^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -55.61 (t, $J = 21.6$ Hz), -131.23 – -132.89 (m), -138.50 – -140.81 (m).

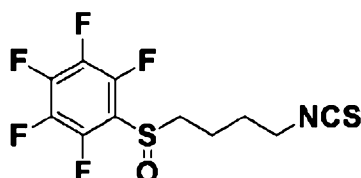
MS (EI): $m/z = 377$ $[\text{M}]^+$.

HRMS: m/z obliczono $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_7\text{NS}_2$ 377.01429, znaleziono 377.01496.

P r o c e d u r a II. Procedura ogólna wytwarzania sulfoksydów ω -izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowych bądź ω -izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)-alkilowych o wzorze 1 (m = 1).

Do schłodzonego do -20°C roztworu sulfidu ω -izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowego bądź ω -izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)-alkilowego o wzorze **1** ($m = 0$) (0.8734 mmol) w CH_2Cl_2 (7 ml), powoli wkroplono roztwór kwasu meta-chloroperbenzoesowego (mCPBA) (0.8734 mmol) w CH_2Cl_2 (5 ml), w atmosferze argonu. Roztwór mieszano przez 0,5 h utrzymując temperaturę -20°C , a następnie przez 1 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę przemyto nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 . Po oddzieleniu, fazę organiczną suszono bezwodnym MgSO_4 . Odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując surowy produkt, który oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując jako eluent układ rozpuszczalników CH_2Cl_2 -MeOH w gradiencie. Otrzymano w ten sposób czysty produkt – sulfoksyd ω -izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowy bądź ω -izotiocyaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)alkilowy o wzorze **1** ($m = 1$).

P r z y k ł a d VI. Sulfoksyd 2',3',4',5',6'-pentafluorofenylo-4-izotiocyaniano-1-butylo-owy o wzorze 1 ($k = 0$, $p = 0$, $m = 1$, $y = 4$, $z = 0$). Wydajność: 75%.

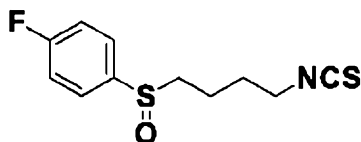


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.61 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.56 – 3.15 (m, 2H), 2.00 – 1.86 (m, 4H).

^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -137.73 – -138.23 (m), -144.92 – -145.40 (m), -156.91 – -157.53 (m).

MS (Cl/izobutan): $m/z = 330$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

P r z y k ł a d VII. Sulfoksyd 4'-fluorofenylo-4-izotiocyaniano-1-butylo-owy o wzorze 1 ($k = 4$, $p = 0$, $m = 1$, $y = 4$, $z = 0$). Wydajność: 86%.



^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.67 – 7.56 (m, 2H), 7.29 – 7.18 (m, 3H), 3.55 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.81 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.99 – 1.66 (m, 4H).

$^1\text{H}\{^{19}\text{F}\}$ NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.69 – 7.53 (m, 2H), 7.32 – 7.17 (m, 3H), 3.55 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.81 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.01 – 1.67 (m, 4H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 164.45 (d, $J = 251.9$ Hz), 138.87 (s), 131.07 (s), 126.31 (d, $J = 8.9$ Hz), 116.81 (d, $J = 22.6$ Hz), 56.20 (s), 44.65 (s), 28.97 (s), 19.57 (s).

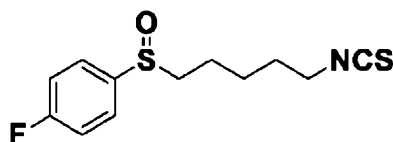
^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -107.42 – -107.74 (m).

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -107.60 (s).

MS (EI): $m/z = 257$ $[\text{M}]^{+\cdot}$.

HRMS: m/z obliczono $[\text{M}]^+ \text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{F}_1\text{NOS}_2$ 257.03444, znaleziono 257.03387.

P r z y k ł a d VIII. Sulfoksyd 4'-fluorofenylo-5-izotiocyaniano-1-pentylo-owy o wzorze 1 ($k = 4$, $p = 0$, $m = 1$, $y = 4$, $z = 0$). Wydajność: 84%.



^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.71 – 7.54 (m, 2H), 7.30 – 7.16 (m, 2H), 3.52 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.78 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.95 – 1.39 (m, 6H).

$^1\text{H}\{^{19}\text{F}\}$ NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.70 – 7.51 (m, 2H), 7.26 – 7.18 (m, 2H), 3.52 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.78 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.99 – 1.39 (m, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 164.38 (d, $J = 251.5$ Hz), 139.12 (d, $J = 2.9$ Hz), 130.30 (s), 126.30 (d, $J = 8.8$ Hz), 116.71 (d, $J = 22.5$ Hz), 56.95 (s), 44.76 (s), 29.61 (s), 25.77 (s), 21.44 (s).

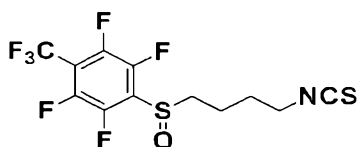
^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -107.70 – -108.05 (m).

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -107.84 (s).

MS (EI): $m/z = 371$ $[\text{M}]^{+\cdot}$.

HRMS: m/z obliczono $[M]^+$ $C_{12}H_{14}F_1NOS_2$ 271.05009, znaleziono 271.04976.

P r z y k ł a d IX. Sulfoksyd 4'-(trifluorometylo)-2',3',5',6'-tetrafluorofenylo-4-izotiocyjaniano-1-butylo-1 (k = 0, p = 1, m = 1, y = 4, z = 0). Wydajność: 78%.



1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 3.62 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.60 – 3.11 (m, 2H), 2.10 – 1.83 (m, 4H).

^{19}F NMR (188 MHz, $CDCl_3$) δ -55.99 (t, $J = 21.9$ Hz), -135.55 – -136.28 (m), -136.64 – -137.13 (m).

MS (Cl/izobutan): $m/z = 381$ $[M+H]^+$.

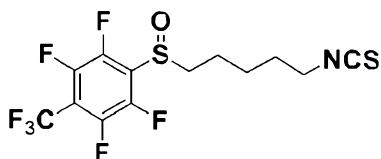
HRMS: m/z obliczono $[M]^+$ $C_{13}H_{10}F_7NOS_2$ 380.00138, znaleziono 380.00077.

Otrzymaną mieszaninę racemiczną rozdzielono na enancjomery stosując technikę HPLC na chiralnej fazie stałej (Chirobiotic T2; heksan – (*i*-PrOH:MeOH 50%) 7%).

(+)-1 (k = 0, p = 1, m = 1, y = 4, z = 0) $[\alpha]_D + 76.3$ (c = 0.84, AcOEt), ee = 99.9%

(-)-1 (k = 0, p = 1, m = 1, y = 4, z = 0) $[\alpha]_D - 76.1$ (c = 1.52, AcOEt), ee = 99.6%

P r z y k ł a d X. Sulfoksyd 4'-(trifluorometylo)-2',3',5',6'-tetrafluorofenylo-5-izotiocyjaniano-1-pentylowy o wzorze 1 (k = 0, p = 1, m = 1, y = 5, z = 0). Wydajność: 89%.



1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 3.57 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.59 – 3.07 (m, 2H), 2.00 – 1.62 (m, 6H).

^{19}F NMR (188 MHz, $CDCl_3$) δ -55.98 (t, $J = 21.8$ Hz), -135.78 – -136.56 (m), -136.76 – -137.11 (m).

MS (EI): $m/z = 393$ $[M]^+$.

HRMS: m/z obliczono $[M]^+$ $C_{13}H_{10}F_7NOS_2$ 393.00920, znaleziono 393.00864.

Otrzymaną mieszaninę racemiczną rozdzielono na enancjomery stosując technikę HPLC na chiralnej fazie stałej (Chirobiotic T2; heksan – (*i*-PrOH:MeOH 50%) 7%).

(+)-1 (k = 0, p = 1, m = 1, y = 5, z = 0) $[\alpha]_D + 78.1$ (c = 0.97, AcOEt), ee = 99.8%

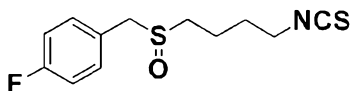
(-)-1 (k = 0, p = 1, m = 1, y = 5, z = 0) $[\alpha]_D - 65.3$ (c = 0.55, AcOEt), ee = 83.6%

Procedura III. Procedura ogólna wytwarzania sulfoksydów ω -izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowych bądź ω -izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)-alkilowych o wzorze 1 (m = 1).

Do schłodzonego do 0°C roztworu odpowiedniego sulfoksydu ω -amino-1-alkilowo-polifluoroarylowego bądź ω -amino-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)-alkilowego o wzorze 2 (m = 1) (1.85 mmol) w $CHCl_3$ (10 ml) wkroplono tiosfogen ($CSCl_2$) (2 mmol), a po chwili wodny roztwór NaOH (6 mmol, 2 ml H_2O). Roztwór mieszano przez 1 h utrzymując temperaturę 0°C, a następnie przez noc w temperaturze pokojowej. Po tym czasie rozdzielono warstwy. Fazę wodną ekstrahowano $CHCl_3$ (2x10 ml). Połączone fazy organiczne suszono bezwodnym $MgSO_4$. Odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując surowy produkt, który oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując jako eluent układ rozpuszczalników CH_2Cl_2 -MeOH w gradiencie.

Otrzymano w ten sposób czysty produkt – sulfoksyd ω -izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowy oraz ω -izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)-alkilowy o wzorze 1 (m = 1).

P r z y k ł a d XI. Sulfoksyd 4'-fluorobenzylowo-4-izotiocyjaniano-1-butylo-1 (k = 4, p = 0, m = 1, x = 2, y = 4, z = 1). Wydajność: 40%.



1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 7.35 – 7.19 (m, 2H), 7.17 – 7.01 (m, 2H), 3.96 (s, 2H), 3.55 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.70 – 2.53 (m, 2H), 2.03 – 1.69 (m, 4H).

$^1H\{^{19}F\}$ NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 7.35 – 7.21 (m, 2H), 7.14 – 6.99 (m, 2H), 3.96 (s, 2H), 3.55 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.68 – 2.49 (m, 2H), 2.02 – 1.70 (m, 4H).

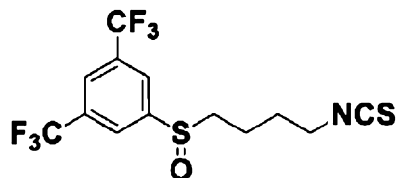
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 162.93 (d, $J = 248.0$ Hz), 131.83 (d, $J = 8.3$ Hz), 130.92 (s), 125.48 (d, $J = 3.2$ Hz), 116.18 (d, $J = 21.7$ Hz), 57.34 (s), 49.84 (s), 44.72 (s), 29.12 (s), 20.14 (s).

^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -112.13 – -112.48 (m).

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -112.33 (s).

MS (Cl/izobutan): $m/z = 272$ $[\text{M}]^+$.

Przykład XII. Sulfoksyd 3',5'-di-(trifluorometylo)fenylo-4-izotiocyjaniano-1-butylo-owy w wzorze 1 (k = 3, p = 2, m = 1, y = 4, z = 0). Wydajność: 42%.



^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (s, 2H), 8.01 (s, 1H), 3.59 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.08 – 2.71 (m, 2H), 2.19 – 1.75 (m, 4H).

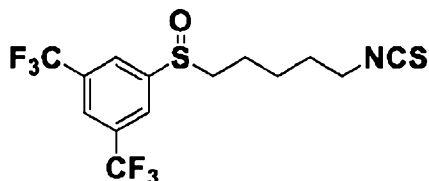
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 147.43 (s), 133.09 (q, $J = 34.3$ Hz), 131.52 (s), 125.04 (dt, $J = 6.9$, 3.3 Hz), 124.40 (d, $J = 2.6$ Hz), 122.66 (q, $J = 273.4$ Hz), 56.28 (s), 44.60 (s), 28.86 (s), 19.75 (s).

^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -62.23 (s).

MS (Cl): $m/z = 376$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HRMS: m/z obliczono $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{F}_6\text{NOS}_2$ 375.01863, znaleziono 375.01812.

Przykład XIII. Sulfoksyd 3',5'-di-(trifluorometylo)fenylo-5-izotiocyjaniano-1-pentylo-owy w wzorze 1 (k = 3, p = 2, m = 1, y = 5, z = 0). Wydajność: 91%.



^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 8.08 (s, 2H), 8.01 (s, 1H), 3.55 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.08 – 2.68 (m, 2H), 2.12 – 1.41 (m, 4H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 147.79 (s), 133.14 (q, $J = 34.2$ Hz), 130.70 (s), 125.03 (s), 124.50 (d, $J = 2.6$ Hz), 122.79 (q, $J = 273.45$ Hz), 57.11 (s), 44.85 (s), 29.68 (s), 25.82 (s), 21.66 (s).

^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3) δ -62.23 (s).

MS (EI): $m/z = 389$ $[\text{M}]^+$.

HRMS: m/z obliczono $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{F}_6\text{NOS}_2$ 389.03428, znaleziono 389.03395.

BADANIA BIOLOGICZNE

W badaniach biologicznych użyte zostały cztery linie komórkowe: MCF-7, MDA-MB-231 – komórki nowotworowe gruczołów piersiowych, MALME-3M – komórki nowotworowe czerniaka oraz MALME-3 – prawidłowe komórki skóry.

Linia komórkowa MCF-7

Komórki linii MCF-7 są komórkami gruczolakoraka piersi pobranymi z wysięku do opłucnej od 69-letniej kobiety rasy kaukaskiej. Komórki wytwarzają receptory estrogenowe i progesteronowe, w związku z czym są wrażliwe na hormony. Na wzrost komórek wpływać można również za pomocą $\text{TNF } \alpha$ oraz cytokreatyny. W komórkach wykryto ekspresję onkogenu WNT7B oraz genu, którego produktem jest IGFBP (insulin-like growth factor binding protein), czyli białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu. Jest to linia epitelialna, adherentna, szybko rosnąca co ułatwia badania.

Linia komórkowa MDA-MB-231

Linia MDA-MB-231 jest linią szybko rosnącą, adherentną i epitelialną gdyż są to komórki gruczolakoraka piersi pochodzące z przerzutów do opłucnej od kobiety rasy kaukaskiej w wieku 51 lat. Jak wyżej, komórki wykazują ekspresję onkogenu WNT7B a ponadto ekspresję EGF (epidermal growth factor) oraz $\text{TGF } \alpha$ (transforming growth factor α). W odróżnieniu od linii MCF-7, komórki nie wykazują ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych więc nie są wrażliwe na leczenie hormonalne.

Linia komórkowa Malme-3M

Komórki MALME-3M to komórki czerniaka, pochodzące z przerzutów do płuc od 43-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej. Komórki morfologicznie przypominają fibroblasty, wykazują ekspresję antygenów leukocytarnych: HLA A2, Aw30, B13, B40, DRw7.

Linia komórkowa MALME-3

Komórki MALME-3 są to prawidłowe fibroblasty skóry pochodzące od tego samego pacjenta co komórki MALME-3M. Są to komórki adherentne, wolnorosnące, co utrudnia ich badanie. Wykazują nadekspresję antygenów: HLA A2, Aw30, B13, B40(+/-), DRw7.

Rozbankowanie komórek

Fiolki z komórkami (ATCC), przechowywane w zbiorniku z ciekłym azotem w temperaturze -196°C wyjęto i szybko rozmrożono. Otrzymany roztwór komórek w DMSO przeniesiono do falkonu z 4 ml pożywki i odwirowano (5 min, 1200 obrotów/min temperatura 25°C). Supernatant wylano w celu usunięcia DMSO a komórki przeniesiono z 10 ml pożywki do butelki i inkubowano w środowisku zawierającym 5% CO_2 , 95% powietrza w temperaturze 37°C .

Pasażowanie

Po osiągnięciu przez komórki pokrycia dna butelki przekraczającego 75% konieczne było ich przesianie. W tym celu odciągnięto pożywkę z butelki, płukano 5 ml roztworu PBS i po dokładnym jego usunięciu dodano 1,5 ml 0,25% roztworu trypsyny z dodatkiem EDTA. Inkubowano do czasu oderwania się komórek od dna butelki, inaktywowano trypsynę używając 10 ml pożywki. Za pomocą pipety rozmieszano i rozcieńczono przenosząc odpowiednią ilość roztworu komórek do nowej butelki uzupełniając pożywką do 10 ml.

Test żywotności MTT

Po zakończeniu ustalonego czasu inkubacji komórek MCF-7, MDA-MB-231 i MALME-3M ze związkami trwającej 24, 48, 72 godziny, a dla MALME-3 trwającej 72 godziny, z płytek 96-dołkowych odciągnięto pożywkę. Każdy dołek przemyto roztworem PBS w ilości ok. $100\ \mu\text{l}$, który następnie dokładnie odciągnięto. Dodano po $50\ \mu\text{l}$ MTT ($250\ \mu\text{g/ml}$) i wstawiono na 3 godziny do inkubatora (37°C). Po tym czasie płytki zalano izopropanolem po $200\ \mu\text{l}$ na każdy dołek, owinięto parafilmem aby zapobiec wyparowaniu odczynnika i odstawiono do lodówki. Następnego dnia odczytywano absorbancję przy $\lambda=570\ \text{nm}$.

Cytotoksyczność wybranych stężeń każdego związku na wszystkich liniach zbadano w co najmniej dwóch niezależnych powtórzeniach zawierających co najmniej 3 powtórzenia zależne ($n \geq 6$). Wyniki skorygowano przez odjęcie absorbancji tła. Policzono średnią z pomiarów, odchylenie i błąd standardowy dla wszystkich stężeń. Porównując dane do kontroli, obliczono żywotność komórek inkubowanych z badanymi związkami.

Następnie, za pomocą programu Graphpad Prism 5, oszacowano wartości indeksu IC_{50} czyli stężenia związków powodujące śmierć 50% komórek. Indeks ten pozwala porównać skale efektu poszczególnych związków między sobą. Indeks ten wyznacza się poprzez dopasowanie krzywej Hill'a (równanie 1) do punktów doświadczalnych:

$$y=100/(1+10^{((\log\text{IC}_{50}-x)^H)}) \quad (\text{równanie 1})$$

gdzie:

y – żywotność komórek;

x – logarytm dziesiętny ze stężenia badanego związku;

H – współczynnik Hill'a

Policzone zostały również indeksy selektywności (SI) według równania 2. Indeks ten pozwala określić ile razy silniej dany związek działa na komórki nowotworowe niż na prawidłowe.

$$\text{SI} = (\text{IC}_{50} \text{ linii prawidłowej})/(\text{IC}_{50} \text{ linii nowotworowej}) \quad (\text{równanie 2})$$

Wartości IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$] i współczynniki selektywności (SI) badanych związków dla poszczególnych linii komórkowych w zależności od linii komórkowej i/lub czasu inkubacji przedstawiono w Tabeli 1 oraz Tabeli 2.

T a b e l a 1. Wartości IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$] badanych związków dla poszczególnych linii komórkowych w zależności od czasu inkubacji i współczynniki selektywności (SI) wyznaczone po 72 godzinach inkubacji.

Związek 1 (k = 4, p = 0, m = 1, y = 4, z = 0); [Przykład VII]				
	MCF-7	MDA-MB-231	MALME-3M	MALME-3
IC_{50}				
24h	9,3	10,2	11,9	
48h	6,3	6,5	10,9	
72h	4,5	3,9	10,5	23,3
SI				
	5,2	5,9	2,2	
Związek 1 (k = 4, p = 0, m = 1, y = 5, z = 0); [Przykład VI]]				
	MCF-7	MDA-MB-231	MALME-3M	MALME-3
IC_{50}				
24h	5,6	7,9	10,1	
48h	3,9	5,1	10,0	
72h	2,7	3,3	9,3	13,7
SI				
	5,1	4,1	1,5	
Związek 1 (k = 0, p = 1, m = 1, y = 4, z = 0); [Przykład IX]				
	MCF-7	MDA-MB-231	MALME-3M	MALME-3
IC_{50}				
24h	5,8	2,3	3,7	
48h	1,2	0,6	2,3	
72h	0,9	0,5	2,7	5,0
SI				
	5,7	10,2	1,9	
Związek 1 (k = 0, p = 1, m = 1, y = 5, z = 0); [Przykład X]				
	MCF-7	MDA-MB-231	MALME-3M	MALME-3
IC_{50}				
24h	4,2	3,5	4,7	
48h	0,8	1,1	3,8	
72h	0,7	1,3	4,3	8,3
SI				
	11,1	6,5	1,9	
Związek 1 (k = 4, p = 0, m = 1, x = 2, y = 4, z = 1); [Przykład XI]				
	MCF-7	MDA-MB-231	MALME-3M	MALME-3
IC_{50}				
24h	9,8	9,4	15,6	
48h	8,1	5,4	13,4	
72h	5,8	4,3	12,9	25,4
SI				
	4,4	5,9	2,0	
Związek 1 (k = 3, p = 2, m = 1, y = 5, z = 0); [Przykład XII]				
Linia komórkowa	MCF-7	MDA-MB-231	MALME-3M	MALME-3
IC_{50}				
24h	4,3	3,6	7,9	
48h	3,3	3,1	8,1	
72h	2,4	2,6	10,9	7,6
SI				
	3,2	2,9	0,7	

Związek Sulforafan (SFN)				
	MCF-7	MDA-MB-231	MALME-3M	MALME-3
IC₅₀				
24h	42,6	24,7	40,4	
48h	12,9	19,9	32,5	
72h	10,5	11,3	27,3	24,9
SI				
	2,4	1,1	0,9	

T a b e l a 2. Wartości IC₅₀ [μmol/l] badanych rozdzielonych mieszanin racemicznych związków dla poszczególnych linii komórkowych po 72 godzinach inkubacji.

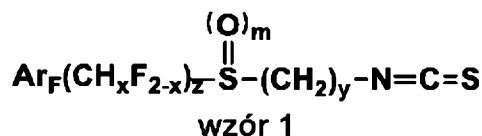
Związek	1 (k = 0, p = 1, m = 1, y = 4, z = 0); [Przykład IX]			1 (k = 0, p = 1, m = 1, y = 5, z = 0); [Przykład X]		
	(+)	(-)	racemat	(+)	(-)	racemat
IC ₅₀ (μM) MALME-3M	2,1	1,3	2,6	4,8	2,3	4,0
IC ₅₀ (μM) MDA-MB-231	0,4	0,4	0,5	1,4	0,7	1,2

Literatura:

- [1]. „New enantiomeric fluorine-containing derivatives of sulforaphane: Synthesis, absolute configurations and biological activity”, P. Kiełbasiński, J. Łuczak, T. Cierpień, J. Błaszczak, L. Sieroń, K. Wiktorska, K. Lubelska, M. Milczarek, Z. Chilmonczyk, Eur. J. Med. Chem. **2014**, 76, 332–342.
- [2]. „New organofluorine isoselenocyanate analogs of sulforaphane: synthesis and anticancer activity”, T. Cierpień, J. Łuczak, M. Kwiatkowska, P. Kiełbasiński, L. Mielczarek, K. Wiktorska, Z. Chilmonczyk, M. Milczarek, K. Karwowska, ChemMedChem, **2016**, 11.
- [3]. „Pochodne sulforafanu, ich prekursorzy oraz sposób ich wytwarzania”, J. Łuczak, T. Cierpień, P. Kiełbasiński, PL220620 (B1) **09.10.2012**.
- [4]. „Nowe analogi sulforafanu, ich prekursorzy, sposób ich wytwarzania, ich zastosowanie oraz postać farmaceutyczna”, T. Cierpień, P. Kiełbasiński, J. Łuczak, K. Wiktorska, L. Śliwka, Z. Chilmonczyk, M. Milczarek, K. Karwowska, zgłoszenie patentowe P-414576 **27.10.2015**.

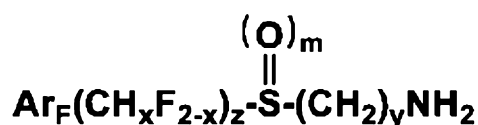
Zastrzeżenia patentowe

1. Pochodne sulforafanu, w postaci sulfidów lub sulfoksydów ω-izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowych bądź ω-izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)alkilowych o wzorze 1,



w którym Ar_F oznacza grupę polifluoroarylową o wzorze C₆H_k(CF₃)_pF_{5-k-p}, gdzie k oznacza liczbę naturalną od 0 do 4, p oznacza liczbę 0, 1 lub 2, x oznacza liczbę 0, 1 lub 2, z oznacza liczbę 0, 1 lub 2, m oznacza liczbę 0 lub 1, a y oznacza liczbę naturalną od 3 do 6, w tym sulfidy ω-izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowe bądź ω-izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)alkilowe o wzorze 1 dla m = 0, sulfoksydy ω-izotiocyjaniano-1-alkilowopolifluoroarylowe bądź ω-izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluoro)alkilowe o wzorze 1 dla m = 1, z wyłączeniem związku o wzorze 1, gdzie k = 4, m = 1, p = 0, x = 0, y = 4, z = 0.

2. Sposób wytwarzania pochodnych sulforafanu o wzorze **1**, w którym Ar_F oznacza grupę polifluoroarylową o wzorze $C_6H_k(CF_3)_pF_{5-k-p}$, gdzie k oznacza liczbę naturalną od 0 do 4, p oznacza liczbę 0, 1 lub 2, x oznacza liczbę 0, 1 lub 2, z oznacza liczbę 0, 1 lub 2, m oznacza liczbę 0 lub 1, a y oznacza liczbę naturalną od 3 do 6, **znamienny tym**, że prekursor sulfidu ω-amino-1-alkilowo-polifluoroarylowego bądź ω-amino-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluro)alkilowego, o wzorze **2** ($m = 0$),



wzór 2
(m=0, 1)

- poddaje się reakcji z tiofosgenem w obecności wodorotlenku sodu, do otrzymania odpowiedniego sulfidu ω-izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowego bądź ω-izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluro)alkilowego o wzorze **1** ($m = 0$), który następnie utlenia się za pomocą środka utleniającego, wybranego z grupy obejmującej kwas m-chloroperbenzoesowy (mCPBA), oksazirydiny Davisa, metanadjodan sodu ($NaIO_4$) lub nadtlenek wodoru (H_2O_2), do utworzenia sulfoksydu ω-izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowego bądź ω-izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluro)-alkilowego o wzorze **1** ($m = 1$), 10 w których Ar_F , x , z , oraz y mają podane wyżej znaczenie.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że w celu wytworzenia pochodnych sulforafanu o wzorze **1** ($m = 1$), prekursor sulfoksydu ω-amino-1-alkilowo-polifluoroarylowego bądź ω-amino-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluro)alkilowego, o wzorze **2** ($m = 1$) poddaje się reakcji z tiofosgenem w obecności wodorotlenku sodu, do otrzymania odpowiedniego sulfoksydu ω-izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylowego bądź ω-izotiocyjaniano-1-alkilowo-polifluoroarylo(fluro)alkilowego o wzorze **1** ($m = 1$), w którym Ar_F , x , z , oraz y mają podane wyżej znaczenie.
4. Związki o wzorze 1 określonym w zastrz. 1, do zastosowania jako leki o właściwościach cyto- statycznych lub cytotoksycznych wobec komórek nowotworowych, zwłaszcza przeciw nowotworom sutka (carcinoma mammae) i czerniaka (melanoma malignum).