

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 242529 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **426731**

(22) Data zgłoszenia: **2018.08.20**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2020.02.24 BUP 05/2020**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.03.06 WUP 10/2023**

(51) MKP:

**C07H 15/26** (2006.01)

**C07D 475/08** (2006.01)

**A61K 31/7052** (2006.01)

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**SIDDARTH AGRAWAL, Żerniki Wrocławskie, PL**

**MARTA WOŹNIAK, Wrocław, PL**

**WIESŁAW SZEJA, Żernica, PL**

**ANIL KUMAR AGRAWAL,**

**Żerniki Wrocławskie, PL**

**ANDRZEJ GAMIAN, Wrocław, PL**

**MONIKA KRAWCZYK, Olkusz, PL**

**GABRIELA PASTUCH-GAWOŁEK, Gliwice, PL**

**SEBASTIAN MAKUCH, Skrzypne, PL**

**JERZY WIŚNIEWSKI, Wrocław, PL**

**PIOTR ZIÓŁKOWSKI, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

**Anna Gdula, Wrocław, PL**

(54) Tytuł:

**Glikokoniugatowa pochodna metotreksatu i glukozy, jej zastosowanie oraz sposób otrzymywania**

**PL 242529 B1**

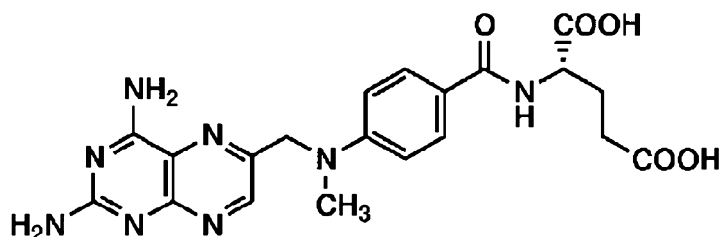
## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest związek będący glikokoniugatem pochodną metotreksatu i glukozy, jak również sposób syntezy tego koniugatu oraz jego zastosowanie.

Nowy związek, wykazując działanie przeciwnowotworowe, znajduje zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i weterynaryjnym, jako element innowacyjnej i selektywnej terapii przeciwnowotworowej.

Związek według wynalazku otrzymuje się w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji karbaminianu metotreksatu i 2-azydoetylo β-D-glukopiranozydu. Jako podjednostki strukturalne związek ten zawiera metotreksat i glukokoniugat triazynowy połączone wiązaniem karbamidowym, które w wyniku hydrolizy wiązania uwalniają się w komórce nowotworowej i wykazują synergiczne działanie hamujące proliferację komórek nowotworowych.

Metotreksat, inaczej zwany również ameopteryną, jest powszechnie znanym związkiem organicznym, należącym do antagonistów kwasu foliowego, który znalazł zastosowanie jako lek cytostatyczny. Jako antymetabolit, antagonistą kwasu foliowego hamuje aktywność reduktazy dihydrofolianowej katalizującej przemianę dihydrofolianu w tetrahydrofolian. Wiąże się nieodwracalnie z enzymem, uniemożliwiając przyłączenie właściwego substratu – kwasu foliowego.

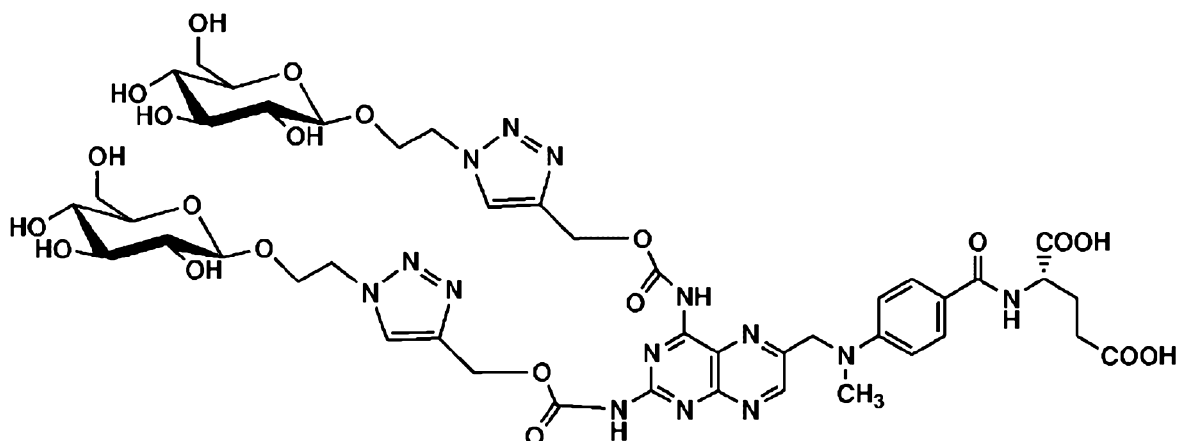


Metotreksat jest stosowany jako lek przeciwnowotworowy i immunosupresyjny. Hamuje syntezę nukleotydów purynowych oraz tymidynianów niezbędnych do syntezy i naprawy DNA oraz replikacji komórkowej. Działa głównie przez zahamowanie syntezy DNA, pośrednio hamuje również syntezę RNA i białek. Metotreksat działa swoiście na proliferujące komórki, głównie w fazie S cyklu komórkowego. Mechanizm działania leku w przypadku reumatoidalnego zapalenia stawów nie jest do końca poznany.

Metotreksat jest najczęściej stosowany w terapii następujących chorób nowotworowych: ostrej białaczki limfaticznej, nasieniaka, mięsaka kościopochodnego oraz nowotworów litych głowy i szyi.

Istnieje nadal zapotrzebowanie na nowe, udoskonalone chemioterapeutyki nadające się zwłaszcza do stosowania w terapii przeciwnowotworowej.

Przedmiotem wynalazku jest związek o wzorze 1:



Wzór 1

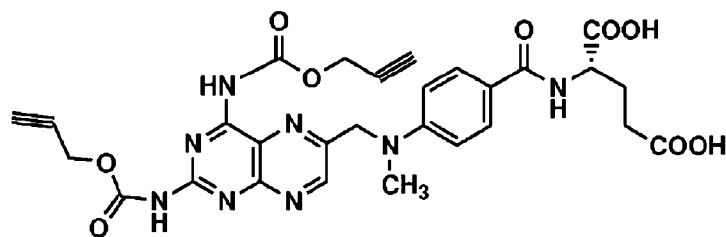
Innym przedmiotem wynalazku jest związek o wzorze 1 do stosowania w medycynie.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest związek o wzorze 1 do stosowania w leczeniu i zapobieganiu nowotworom.

Korzystnie, nowotwór jest wybrany spośród: raka piersi, raka jelita grubego, raka płuc, raka skóry, raka żołądka, raka kolczystokomórkowego i mięsaka kości.

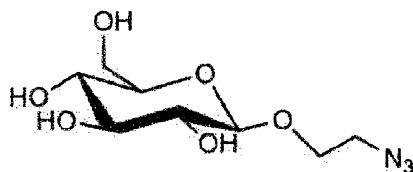
Innym przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania związku o wzorze 1, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

a) prowadzi się reakcję metotreksatu z chloromrówczanem propargilu w obecności aminy trzeciorzędowej, uzyskując karbaminian o wzorze 2;



Wzór 2

b) prowadzi się reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydku cukrowego o wzorze 3



Wzór 3

w mieszaninie alkohol i-propylowy – tetrahydrofuran, w obecności wodnego roztworu askorbinianu sodu i  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  oraz karbaminianu o wzorze 2 otrzymanego w etapie a) i w wyniku reakcji otrzymuje się związek o wzorze 1.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, w etapie a) po dodaniu chloromrówczanu propargilu reakcję prowadzi się przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku w etapie b) reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji prowadzi się przez 24 godziny.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku w etapie b) końcową mieszaninę reakcyjną miesza się, zateża i oczyszcza uzyskując wyizolowany związek o wzorze 1.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku w etapie b) uzyskany związek o wzorze 1 rozpuszcza się w metanolu i oczyszcza na żelu chromatograficznym.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest również związek o wzorze 2, który może być wykorzystany w syntezie chemicznej, zwłaszcza do otrzymywania związku o wzorze 1.

Związek o wzorze 1 jest prolekiem i znajduje zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej ze względu na to, że posiada wiele nieoczekiwanych zalet, takich jak selektywność, biodostępność i wysoka skuteczność wynikająca z aktywności synergistycznej elementów jego struktury. Aktywność cytotoksyczna koniugatu metotreksatu z glukozą według wynalazku jest silniejsza niż działanie niezmodyfikowanego metotreksatu.

Ponadto związek według wynalazku zapewnia mechanizm selektywnego dostarczania czynnika cytotoksycznego do komórek nowotworowych wykazujących zwiększone zużycie glukozy i nasilenie procesów glikolizy aerobowej. Wykazuje on silne działanie cytotoksyczne nawet w środowisku hipoksji i hipoglikemii, podczas gdy większość chemioterapeutyków nie działa na komórki w tych warunkach.

W wyniku realizacji sposobu według wynalazku, obejmującego reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji karbaminianu metotreksatu i 2-azydoetylo  $\beta$ -D-glukopiranozydu, otrzymuje się prolek o właściwościach przeciwnowotworowych charakteryzujący się wysoką biodostępnością. Prolek ten zawiera podjednostki strukturalne wykazujące działanie cytotoksyczne: metotreksat i glukokoniugat triazynowy połączone

wiązaniem karbamidowym. Jednostki te w wyniku hydrolizy wiązania uwalniają się w komórce nowotworowej i wykazują synergistyczne działanie hamujące proliferację komórek.

Prolek według wynalazku o ukierunkowanym wprowadzaniu do komórek nowotworowych posiada następujące elementy strukturalne:

Prolek zawiera cząsteczkę D-glukozy połączoną wiązaniem glikozydowym o konfiguracji  $\beta$ -poprzez elastyczny łącznik z pierścieniem triazynowym.

Pierścień triazynowy podstawiony w pozycji 4 połączony jest z metotreksatem poprzez wiązanie karbamidowe. W proleku według wynalazku D-glukoza pełni funkcję liganda oddziaływującego z białkami przenoszącymi cukier do komórki nowotworowej. Koncepcję syntezy pochodnych D-glukozy oparto na tzw. efekcie Warburga, który wskazuje, że komórki nowotworowe metabolizują wielokrotnie większe ilości cukru w porównaniu z pozostałymi komórkami gospodarza. Wpływa to korzystnie na biodostępność silnie polarnego związku, jakim jest metotreksat, zawierający dwie grupy karboksylowe. Komórki nowotworowe wykazują nadekspresję białek GLUT przenoszących cukier, co powoduje, że koniugaty są w sposób ukierunkowany transportowane i przenoszone do komórek nowotworowych. Konfiguracja 3-wiązania glikozydowego jest preferowana w odniesieniu do receptora, białka GLUT-1.

Nieoczekiwanie ustalono, że koniugat D-glukozy z triazyną zmniejsza szybkość proliferacji komórek nowotworowych, wobec tego po uwolnieniu w komórce nowotworowej zwiększa się cytotoksyczność proleku. Aby proces ten mógł być pierwszym etapem metabolizmu proleku układ triazyny połączono z metotreksatem wiązaniem karbamidowym, ulegającym procesom hydrolizy katalizowanym przez enzymy. Jako farmakofor wybrano metotreksat z uwagi na dobrze udokumentowane właściwości przeciwnowotworowe.

Tak zaprojektowany i syntezowany lek posiada w swojej strukturze jednostki, które wykazują synergiczne działanie przeciwnowotworowe i pozwala na uwalnianie w procesie metabolizmu glikokoniugatu triazyny oraz metotreksatu.

Niniejszy wynalazek zobrazowano za pomocą następujących figur rysunku w przykładach wykonania: na figurze 1 przedstawiono wpływ inhibitora GLUT1 EDG na wartości IC<sub>50</sub> dla komórek raka płuca A427 i dla komórek raka kolczystokomórkowego SCC;

na figurze 2 przedstawiono wpływ Glu-Met i metotreksatu na przeżywalność komórek nowotworowych A427, SCC i WI38 oraz odpowiadających im zdrowych komórek;

na figurze 3 przedstawiono wpływ Glu-Met i metotreksatu w warunkach hypoksji na komórki raka piersi MCF7 (A) oraz komórki raka jelita grubego SW480 (B);

na figurze 4 przedstawiono wpływ Glu-Met i metotreksatu w warunkach hiperglikemii na komórki raka piersi MCF7 (A) oraz komórki raka jelita grubego SW480 (B);

na figurze 5 przedstawiono wpływ Glu-Met i metotreksatu w warunkach hypoksji i hiperglikemii na komórki raka piersi MCF7 (A) oraz komórki raka jelita grubego SW480 (B);

na figurze 6 przedstawiono wyniki analizy MS dla komórek nowotworowych raka jelita grubego SW480 rosnących z MTX oraz z koniugatem według wynalazku;

na figurze 7 przedstawiono zestawienie widm dla obydwu pików uzyskanych w wyniku analizy MS i przedstawionych na figurze 6.

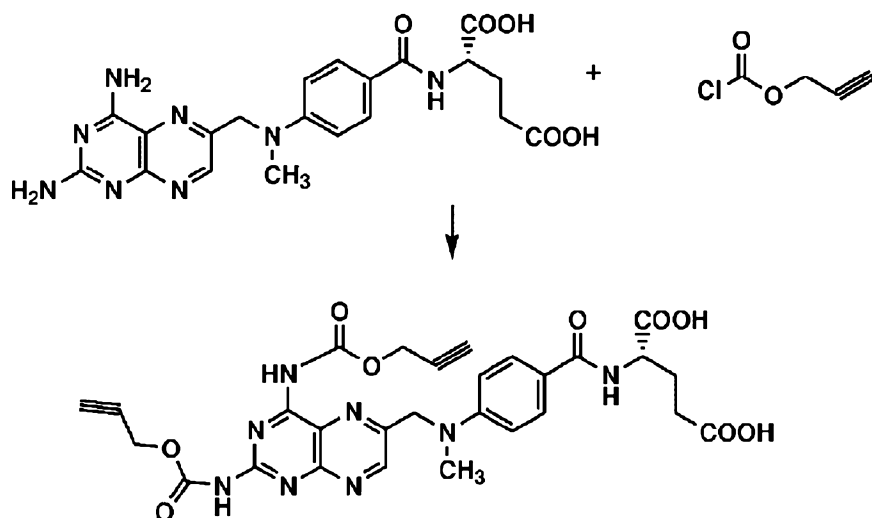
Poniższe przykłady powinny ułatwić realizację zdefiniowanego powyżej wynalazku.

#### **Przykłady**

##### **Przykład 1. Synteza glikokoniugatu, pochodnej metotreksatu**

Glikokoniugat otrzymano w następującej wieloetapowej syntezie, w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji 2-azydoetylo- $\beta$ -D-glukopiranozydu i propargiloksykarbaminianu metotreksatu.

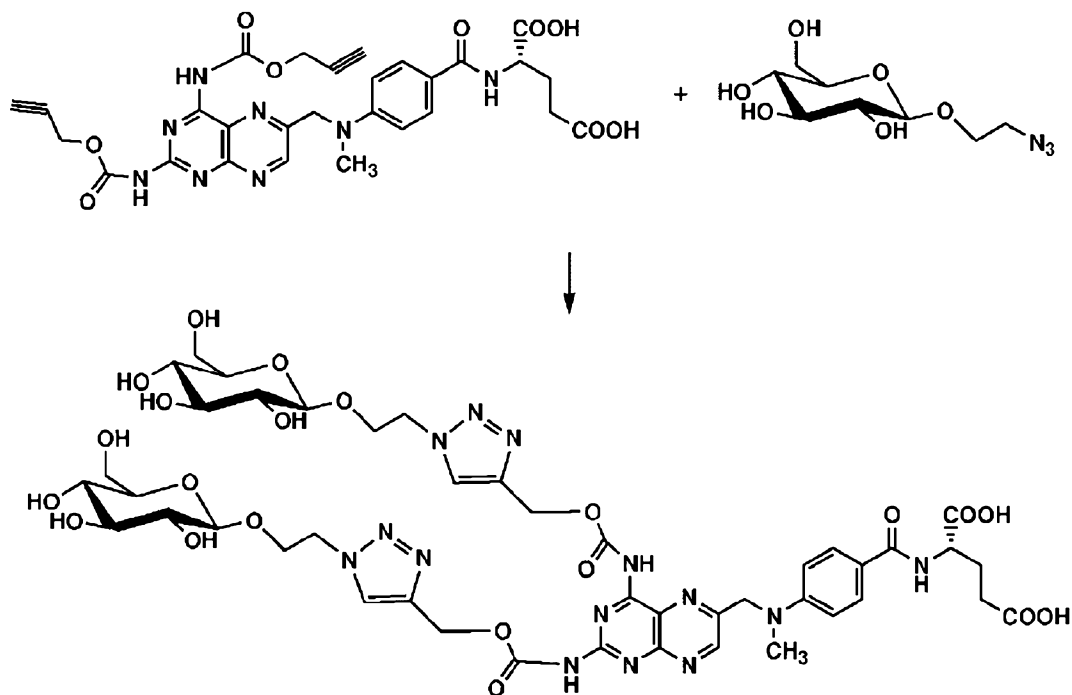
### Etap 1. Synteza karbaminianu



W kolbie zabezpieczonej przed światłem umieszczono metotreksat (180 mg; 0.40 mmol), dodano bezwodną pirydynę (3 ml), intensywnie mieszając, dodano dietylo-izo-propyloaminę (50  $\mu$ l; 0.30 mmol). Mieszaninę reakcyjną umieszczono w łaźni zawierającej wodę z lodem i po kilkunastu minutach wkroplono chloromrówczan propargilu (50  $\mu$ l; 0.51 mmol). Mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury pokojowej i prowadzono reakcję przez 24 godziny. Surowy produkt poddano reakcji dipolarnej cykloaddycji.

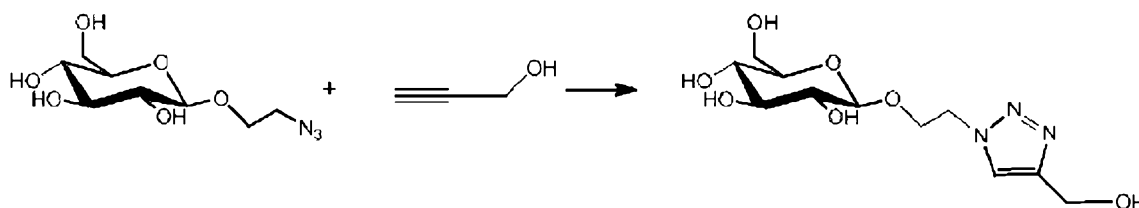
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.85-2.16 (m, 2H,  $2x\text{CH}_{\text{MTX}}$ ), 2.32 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{MTX}}$ ), 2.45 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{MTX}}$ ), 3.21 (s, 3H,  $\text{CH}_{3\text{MTX}}$ ), 3.52 (m, 2H,  $2x\text{CH}$ ), 4.35 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{MTX}}$ ), 4.62-4.72 (m, 4H,  $2x\text{CH}_2$ ), 4.80 (s, 2H,  $\text{CH}_{2\text{MTX}}$ ), 6.80-6.85 (m, 2H, H- $\text{Ph}_{\text{MTX}}$ ), 7.68-7.76 (m, 2H, H- $\text{Ph}_{\text{MTX}}$ ), 8.20 (m, 1H,  $\text{NH}_{\text{MTX}}$ ), 8.61 (s, 1H, H-7 $_{\text{MTX}}$ ).  
 $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  25.31, 29.39, 29.71, 50.89, 50.97, 51.03, 54.14, 76.93, 77.73, 78.47, 110.36, 120.41, 120.46, 128.23, 146.26, 148.39, 150.20, 152.65, 160.80, 161.99, 165.61, 165.64, 170.95, 173.01, 173.18.

### Etap 2. Synteza glukokoniugatu, pochodnej metotreksatu



Azydek cukrowy (99 mg; 0.40 mmol) rozpuszczono w mieszaninie alkohol i-propylowy (3 ml) tetrahydrofuran (3 ml) i dodano wodny (3 ml) roztwór askorbinianu sodu (32 mg; 0.16 mmol) i  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (20 mg; 0.08 mmol). Otrzymany roztwór dodano do produktu z wcześniejszego etapu syntezy. Intensywnie mieszano zawartość reaktora w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Mieszaninę reakcyjną zateżono na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany olej rozpuszczono w metanolu, dodano żel do chromatografii kolumnowej (1 g) i zateżono na wyparce rotacyjnej. Żel krzemionkowy zawierający zaadsorbowane produkty reakcji wprowadzono na kolumnę chromatograficzną i oczyszczano produkt metodą gradientowej chromatografii, stosując jako eluent mieszaniny chloroform-metanol. Skład frakcji analizowano metodą chromatografii cienkowarstwowej. Wydzielono produkt eluowany przez mieszaninę chloroform-metanol = 1 : 1. Frakcje zateżono i wydzielono produkt w postaci osadu w kolorze kremowym. Produkt przechowywano w ciemnym naczyniu w temperaturze  $0^\circ\text{C}$ – $5^\circ\text{C}$ . Strukturę związku określono na podstawie widm magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.71-2.10 (m, 2H,  $2x\text{CH}_{\text{MTX}}$ ), 2.19-2.39 (m, 2H,  $2x\text{CH}_{\text{MTX}}$ ), 2.96 (dd, 2H,  $J = 7.8 \text{ Hz}$ ,  $J = 8.6 \text{ Hz}$ , H- $2_{\text{Glu}}$ ), 3.03 (dd, 2H,  $J = 9.0 \text{ Hz}$ ,  $J = 9.4 \text{ Hz}$ , H- $4_{\text{Glu}}$ ), 3.09-3.55 (m, 9H,  $\text{CH}_{3\text{MTX}}$ , H- $3_{\text{Glu}}$ , H- $5_{\text{Glu}}$ , H- $6a_{\text{Glu}}$ ), 3.63-3.79 (m, 4H,  $4x\text{CH}$ ), 3.68 (dd, 2H,  $J = 1.6 \text{ Hz}$ ,  $J = 11.4 \text{ Hz}$ , H- $6b_{\text{Glu}}$ ), 3.86-3.95 (m, 2H,  $2x\text{CH}$ ), 4.01-4.12 (m, 2H,  $2x\text{CH}$ ), 4.22 (d, 2H,  $J = 7.8 \text{ Hz}$ , H- $1_{\text{Glu}}$ ), 4.29 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{MTX}}$ ), 4.55-4.61 (m, 4H,  $2x\text{CH}_2$ ), 4.79 (bs, 2H, OH), 5.21 (s, 2H,  $\text{CH}_{2\text{MTX}}$ ), 6.80-6.87 (m, 2H, H- $\text{Ph}_{\text{MTX}}$ ), 7.66-7.72 (m, 2H, H- $\text{Ph}_{\text{MTX}}$ ), 7.95 (d, 1H,  $J = 7.0 \text{ Hz}$ ,  $\text{NH}_{\text{MTX}}$ ), 8.25 (s, 2H, H- $5_{\text{triaz}}$ ), 8.61 (s, 1H, H- $7_{\text{MTX}}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  24.62, 30.33, 31.64, 48.55, 49.72, 54.87, 60.62, 61.05, 67.19, 69.99, 73.26, 76.54, 76.95, 102.87, 111.09, 121.49, 125.84, 128.62, 140.91, 146.75, 149.15, 150.83, 154.04, 163.78, 165.39, 165.56, 173.56, 174.26.

### Przykład 2 (porównawczy). Synteza koniugatu D-Glukoz-triazyna



Azydek cukrowy (82 mg; 0.33 mmol) i alkohol propargilowy (20  $\mu\text{l}$ ; 0.34 mmol) rozpuszczono w mieszaninie alkohol i-propylowy (3 ml) i tetrahydrofuran (3 ml). Intensywnie mieszając zawartość kolby, dodano wodny (3 ml) roztwór askorbinianu sodu (27 mg; 0.14 mmol) i  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (16 mg; 0.07 mmol). Reakcję cykloaddycji prowadzono przez 24 godziny, intensywnie mieszając zawartość kolby. Zateżono mieszaninę reakcyjną na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany olej rozpuszczono w metanolu, dodano żel do chromatografii kolumnowej (1 g) i zateżono na wyparce rotacyjnej. Żel krzemionkowy zawierający zaadsorbowane produkty reakcji wprowadzono na kolumnę chromatograficzną i wydzielono produkt metodą gradientowej chromatografii, stosując jako eluent mieszaniny chloroform-metanol. Skład frakcji analizowano metodą chromatografii cienkowarstwowej. Wydzielono produkt eluowany mieszaniną chloroform-metanol = 2 : 1. Frakcje zateżono i wydzielono produkt w postaci osadu w kolorze kremowym. Produkt przechowywano w ciemnym naczyniu w temperaturze  $0^\circ\text{C}$ – $5^\circ\text{C}$ . Strukturę związku określono na podstawie widm magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.97 (m, 1H, H- $2_{\text{Glu}}$ ), 3.04 (m, 1H, H- $4_{\text{Glu}}$ ), 3.09-3.16 (m, 2H, H- $3_{\text{Glu}}$ , H- $5_{\text{Glu}}$ ), 3.43 (m, 1H, CH), 3.68 (m, 1H, H- $6a_{\text{Glu}}$ ), 3.89 (m, 1H, H- $6b_{\text{Glu}}$ ), 4.07 (m, 1H, CH), 4.23 (d, 1H,  $J = 7.8 \text{ Hz}$ , H- $1_{\text{Glu}}$ ), 4.47-4.58 (m, 4H,  $2x\text{CH}_2$ ), 4.91 (d, 1H,  $J = 5.1 \text{ Hz}$ , OH), 4.95 (d, 1H,  $J = 4.7 \text{ Hz}$ , OH), 5.06 (d, 1H,  $J = 5.1 \text{ Hz}$ , OH), 5.15 (dd, 1H,  $J = 5.5 \text{ Hz}$ ,  $J = 5.9 \text{ Hz}$ , OH), 8.01 (s, 1H, H- $5_{\text{triaz}}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  49.54, 54.99, 61.05, 67.41, 69.99, 73.29, 76.60, 76.97, 102.93, 123.45, 147.68.

### Przykład 3. Analiza aktywności biologicznej.

#### Analiza cytotoksyczności związku według wynalazku (test MTT)

Komórki w ilości 3–10  $\times 10^3$  komórek/studzienkę wysiano na płytkę 96-studzienkową. Po 24 godzinach ziano pożywkę hodowlaną i podano po 100  $\mu\text{l}$  świeżej pożywki do studzienek kontrolnych oraz pożywkę z rozpuszczonymi w DMSO badanymi związkami do studzienek badanych. Płytki owinięto w folię i umieszczono w inkubatorze. Po 48 godzinach inkubacji ziano pożywkę i dodano 100  $\mu\text{l}$  roztworu żółtego rozpuszczalnego bromku 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowego (MTT) w stężeniu 0,5 mg/ml. Po 4 godzinach inkubacji ziano roztwór MTT i podano 100  $\mu\text{l}$ /studzienkę DMSO.

Po 2 godzinach gęstość optyczną rozpuszczonego formazanu analizowano kolorymetrycznie w czytniku płytek BioTek.

Stężenie DMSO w badanych próbach nie przekroczyło 0,1%.

Ponieważ żywe komórki powodują redukcję MTT do farmazanu, gęstość optyczna (GO) jest najwyższa w studzienkach kontrolnych (K), które stanowiły 100% przeżywalności komórek. Przeżywalność w studzienkach inkubowanych ze związkiem (Z) wyliczano na podstawie wzoru:

$$X = 100\% \times GO Z / GO K$$

Podane wyniki stanowią wartość średnią z 3 powtórzeń analizy cytotoxyczości.

Badania oceny przeżywalności za pomocą testu MTT na liniach komórkowych licznych nowotworów w tym: raka piersi, jelita grubego, płuc, żołądka, kolczystokomórkowego oraz mięsaka kości wykazały, że związek o wzorze 1 działa silnie cytotoxycycznie in vitro. Na Figurze 1 oraz w Tabeli 1 pokazano porównawcze wyniki badania oceny przeżywalności (IC<sub>50</sub>) dla różnych linii komórek nowotworowych, na które oddziaływano samym metotreksatem lub pochodną według wynalazku glukoza-metotreksat (związek o wzorze 1). Działanie cytotoxycyczne koniugatu metotreksatu z glukozą jest silniejsze niż działanie niezmodyfikowanego metotreksatu. W badaniu zastosowano: Glu-Met 5 µM, Metotreksat 20 µM; inkubacja 48 godzin; analiza MTT.

Tabela 1

Związek	Wartości IC <sub>50</sub> (µM)						
	MCF-7 (piers)	SW480 (jelito grube)	SCC4 (skóra)	A427 (płuco)	MG63 (mięsak kości)	HS746 (żołądek )	SW620 (jelito grube)
Glu-Met	6,2±0,3 4	6,8±0,1	7,3±0,04	2,9±0,6	6,4±0,65	14,9±1, 7	9,7±0,49
Metotreksat	>40	24,6±2,2	22,12±1,2 6	19,8±0,8 1	>30	>30	>30

Średnia ±OS wyników z trzech niezależnych eksperymentów. Test MTT, inkubacja 48 godz.

### Analiza MS

Komórki w ilości 2,5 x 10<sup>5</sup> komórek/studzienkę wysiano na płytkę 6-studzienkową w 1ml/studzienkę. Kiedy komórki osiągnęły 80% konfluencji, ziano pożywkę hodowlaną i podano odpowiednio po 1 ml na studzienkę świeżej pożywki do studzienek kontrolnych lub 1 ml na studzienkę badaną pożywką z metotreksatem w stężeniu 10 µM lub pochodną metotreksatu o wzorze 1 w stężeniu 10 µM. Płytkę owinięto folią i inkubowano 8 godzin w inkubatorze. Po tym czasie ziano pożywkę, każdą studzienkę płukano 2 x 1 ml PBS o temperaturze pokojowej. Następnie płytkę ułożono na lodzie i do każdej studzienki podano 500 µl mieszaniny 3 : 1 metanolu i ultraczystej wody o temperaturze -20 stopni Celsjusza. W każdej studzience kilkakrotnie pipetowano mieszaninę i pobrano ją do eppendorfki. Następnie procedurę powtórzono i przygotowane próbki (każda o objętości 1 ml) włożono do zamrażarki niskotemperaturowej -80 stopni Celsjusza. Następnego dnia próbki zagęszczano w koncentratorze próżniowym do całkowitego wysuszenia próbki. Przed analizą do próbki dodano rozpuszczalnika do analizy MS (Xevo G2 Q-TOF MS). Na figurze 6 można zauważyć, że pole powierzchni dla MTX w komórkach nowotworowych SW480 rosnących z MTX wynosi około 333 jednostek, a w przypadku zastosowania związku według wynalazku (określonego na fig. 6 jako 10/4) – 17631, czyli jest około 52 mniejsze niż w przypadku koniugatu. Na figurze 7 pokazano zestawienie widm dla obydwu pików.

### Ocena biologiczna koniugatu glukozy i triazyny (przykład porównawczy)

Komórki w ilości 1 x 10<sup>4</sup> komórek/studzienkę wysiano na płytkę 96-studzienkową. Po 24 godzinach ziano pożywkę hodowlaną i dodano po 100 µl świeżej pożywki do studzienek kontrolnych oraz pożywkę z rozpuszczonymi w DMSO badanymi związkami do badanych studzienek. Płytki owinięto w folię i umieszczono w inkubatorze. Po 48 godzinach inkubacji wykonano test MTT. Wyniki pokazują, że związek otrzymany w przykładzie 2 wykazuje działanie cytotoxycyczne. Przeprowadzono walidację oceny na liniach dwóch różnych nowotworów, raku piersi MCF-7 oraz raku jelita grubego SW480. IC<sub>50</sub> wynosi

odpowiednio 60  $\mu\text{M}$  oraz 75  $\mu\text{M}$ . Ustalono, że obserwowana aktywność jest znacznie słabsza niż w przypadku związku o wzorze 1.

#### Analiza aktywności koniugatu według wynalazku w warunkach hipoksji

Komórki w ilości  $1 \times 10^4$  komórek/studzienkę wysiano na płytce 96-studzienkowej. Płytkę stanowiącą kontrolę hodowano w standardowych warunkach hodowli o stężeniu tlenu 20%. Płytkę badającą wpływ hipoksji hodowano w inkubatorze o stężeniu tlenu 1%. Po 24 godzinach zlano pożywkę hodowlaną i podano po 100  $\mu\text{l}$  świeżej pożywki do studzienek kontrolnych oraz pożywkę z rozpuszczonymi w DMSO badanymi związkami do studzienek badanych. Płytki owinięto w folię i umieszczono w odpowiednich inkubatorach. Po 48 godzinach inkubacji wykonano analizę MTT. Wyniki uzyskane podczas badania aktywności związku o wzorze 1 przedstawiono na figurze 3A dla komórek MCF7 i na figurze 3B dla komórek SW480.

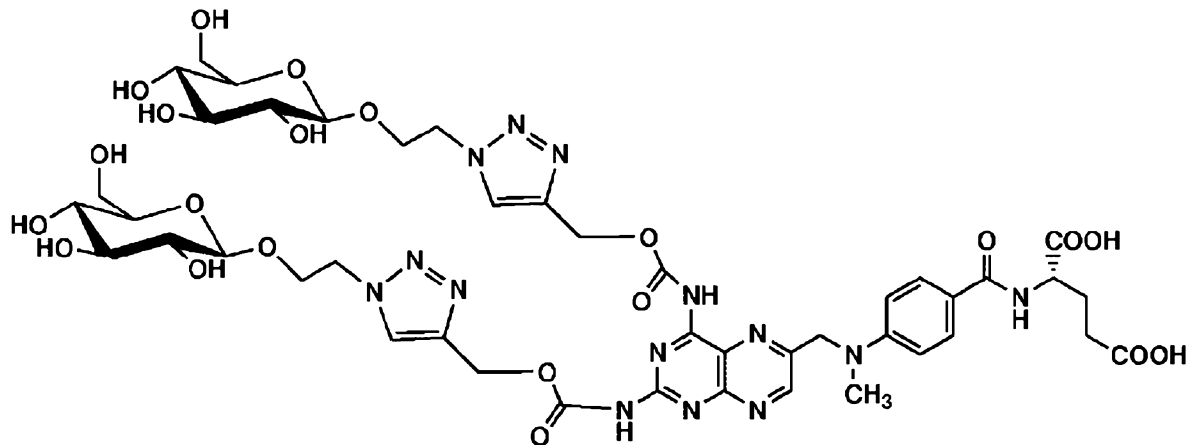
#### Analiza aktywności koniugatu według wynalazku w warunkach hipoglikemii

Komórki w ilości  $1 \times 10^4$  komórek/studzienkę wysiano na płytce 96-studzienkowej. Komórki stanowiące kontrolę hodowano w standardowej pożywce hodowlanej zawierającej glukozę. Komórki poddane hipoglikemii hodowano w pożywce bez glukozy. Po 24 godzinach zlano pożywkę hodowlaną z płytek i dodano po 100  $\mu\text{l}$  świeżej pożywki do studzienek kontrolnych oraz pożywkę bez glukozy z rozpuszczonymi w DMSO badanymi związkami do studzienek badanych. Po 48 godzinach inkubacji wykonano analizę MTT. Wyniki uzyskane podczas badania aktywności związku o wzorze 1 przedstawiono na figurze 4A dla komórek MCF7 i na figurze 4B dla komórek SW480.

Koniugat według wynalazku (związek o wzorze 1) wykazuje silne działanie cytotoksyczne nawet w środowisku hipoksji i hipoglikemii (Figura 5A i B), podczas gdy większość chemioterapeutyków nie działa na komórki w tych warunkach.

### Zastrzeżenia patentowe

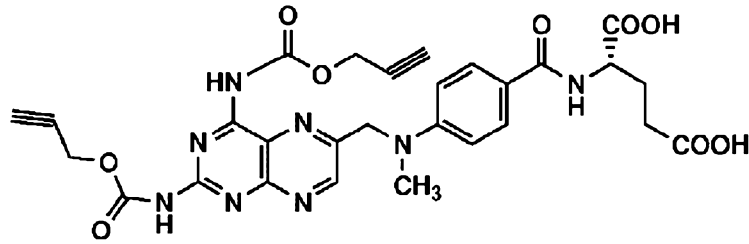
1. Związek o wzorze 1:



wzór 1

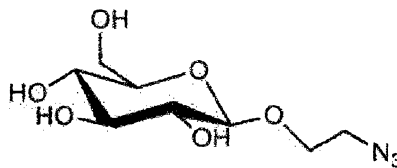
- Związek o wzorze 1 do stosowania w medycynie.
- Związek o wzorze 1 do stosowania w leczeniu i zapobieganiu nowotworom.
- Związek do stosowania według zastrz. 3, **znamienny tym**, że nowotwór jest wybrany spośród: raka piersi, raka jelita grubego, raka płuc, raka skóry, raka żołądka, raka kolczystokomórkowego i mięsaka kości.
- Sposób otrzymywania związku o wzorze 1, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:

- a) prowadzi się reakcję metotreksatu z chloromrówczanem propargilu w obecności aminy trzeciorzędowej, uzyskując karbaminian o wzorze 2:



wzór 2

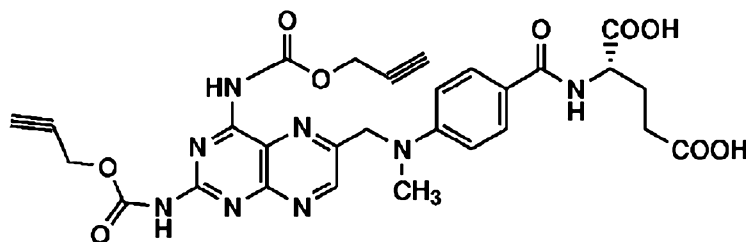
- b) prowadzi się reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydku cukrowego o wzorze 3:



wzór 3

w mieszaninie alkohol i-propylowy – tetrahydrofuran, w obecności wodnego roztworu askorbinianu sodu i  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  oraz karbaminianu o wzorze 2 otrzymanego w etapie a) i w wyniku reakcji otrzymuje się związek o wzorze 1.

6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie a) po dodaniu chloromrówczanu propargilu reakcję prowadzi się przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.
7. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie b) reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji prowadzi się przez 24 godziny.
8. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie b) końcową mieszaninę reakcyjną miesza się, zatęża i oczyszcza uzyskując wyizolowany związek o wzorze 1.
9. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie b) uzyskany związek o wzorze 1 rozpuszcza się w metanolu i oczyszcza na żelu chromatograficznym.
10. Związek o wzorze 2:



wzór 2

## Rysunki

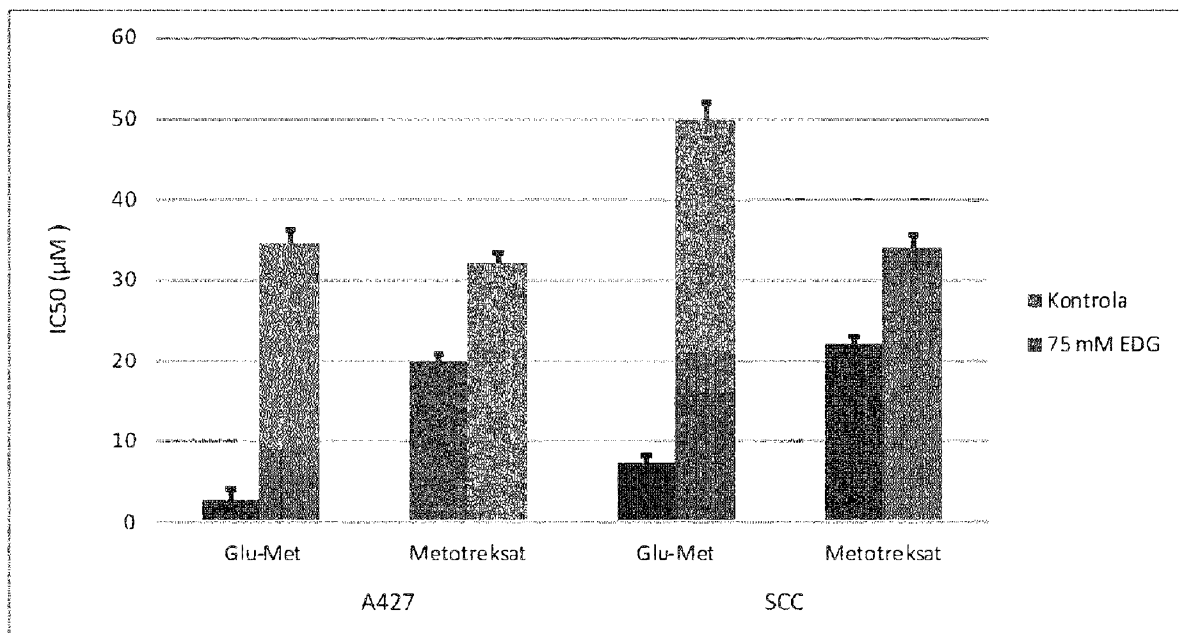


Figura 1

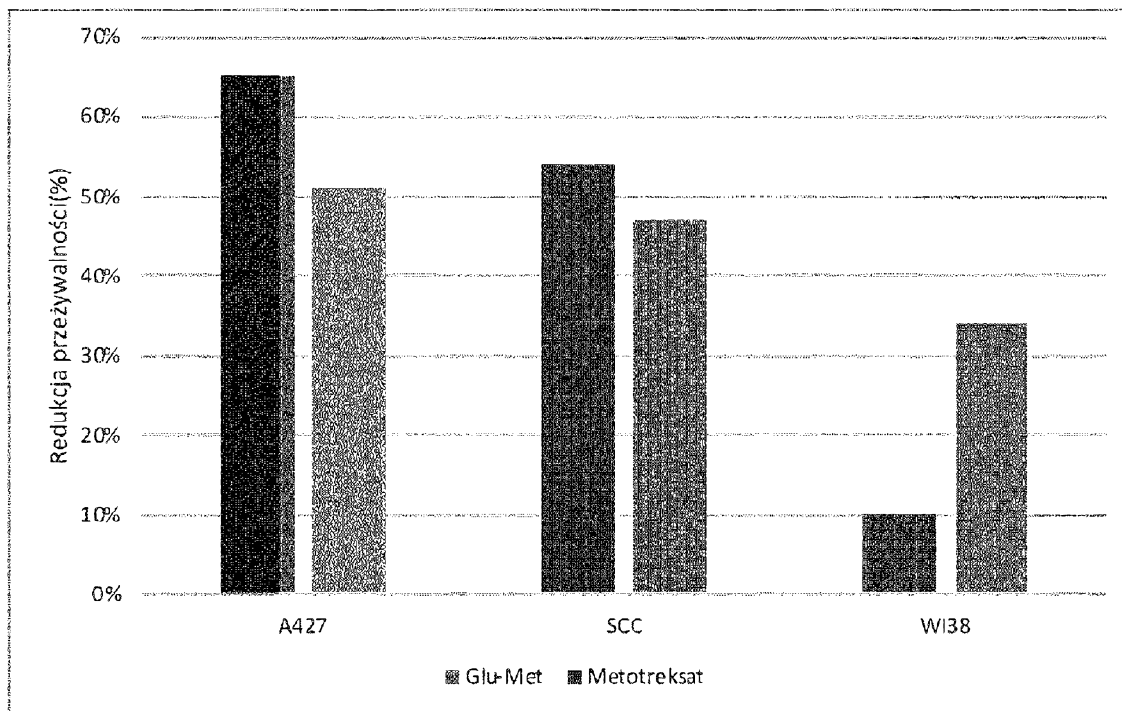
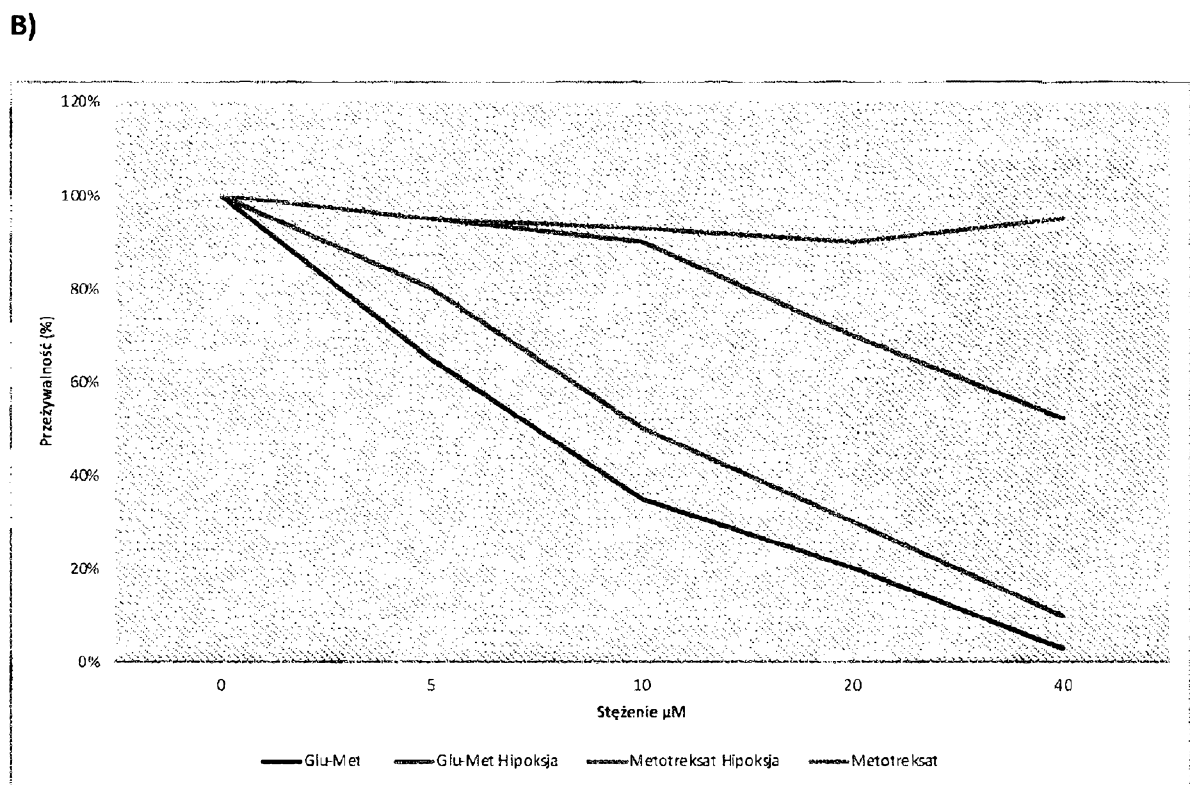
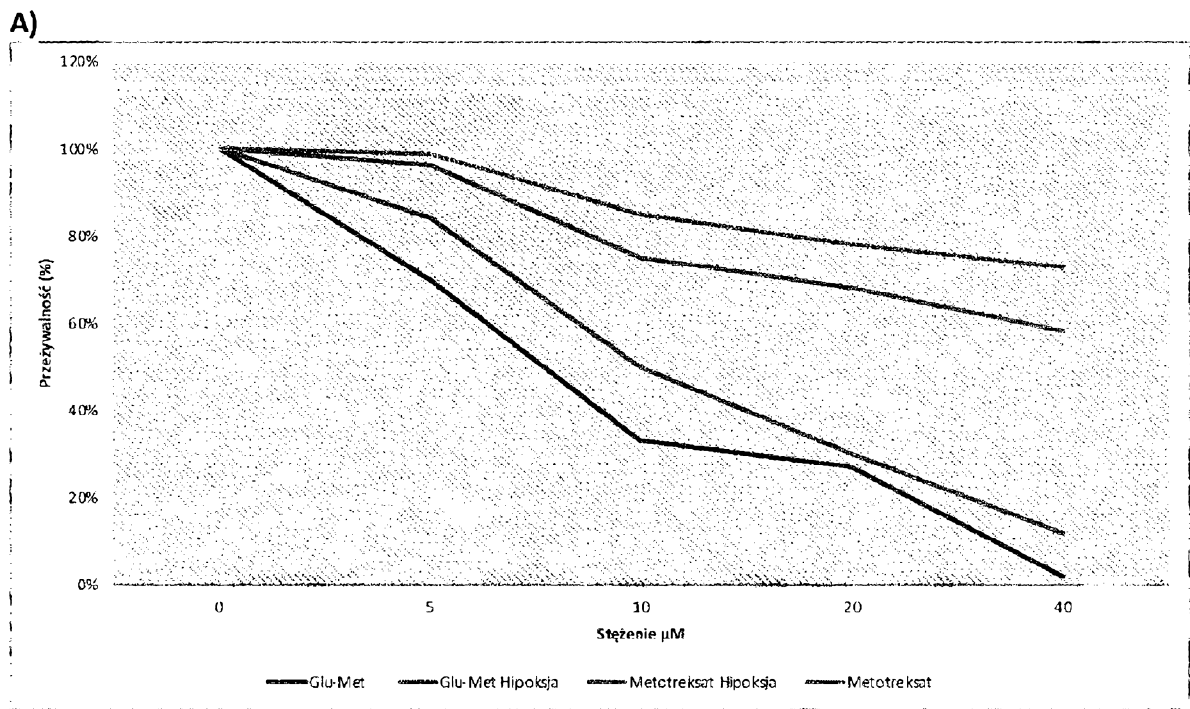
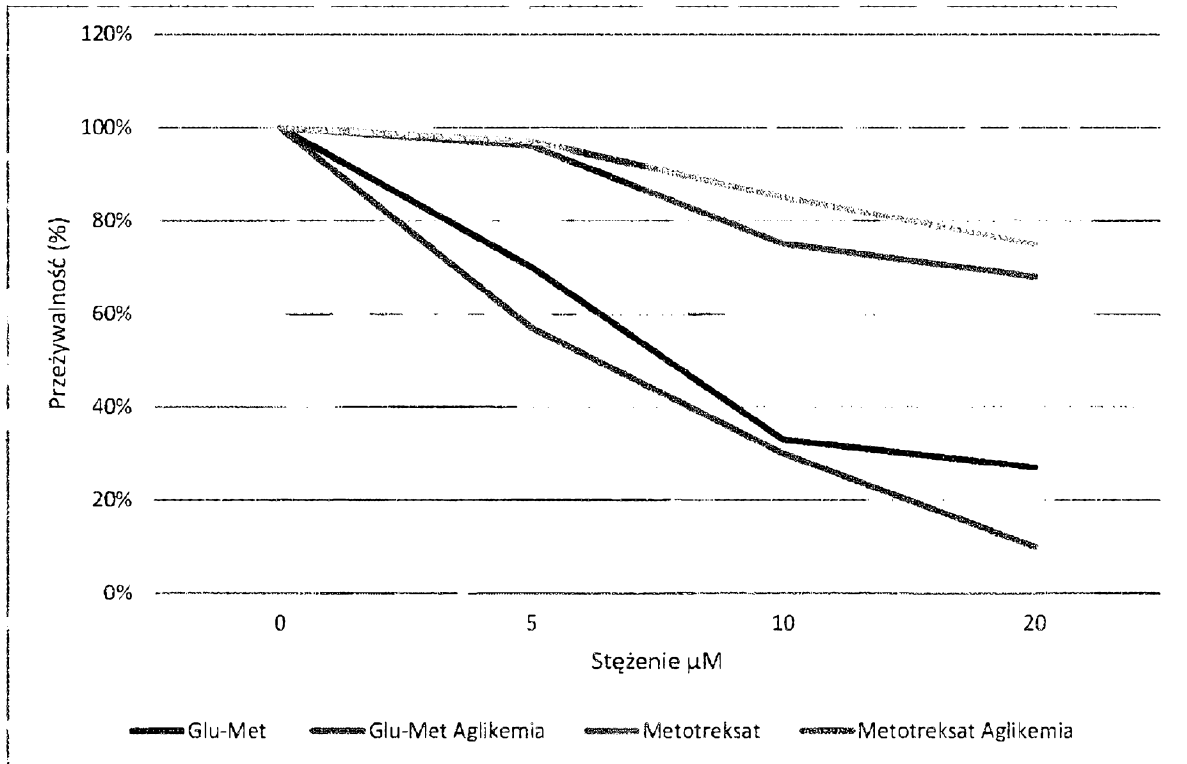


Figura 2



**Figura 3**

A)



B)

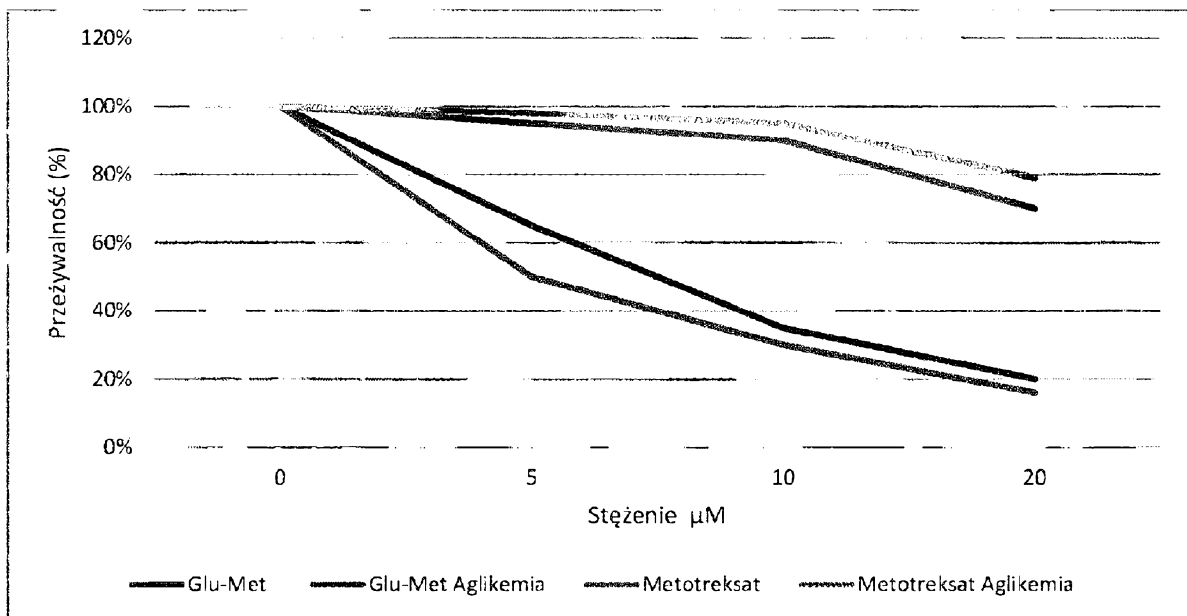
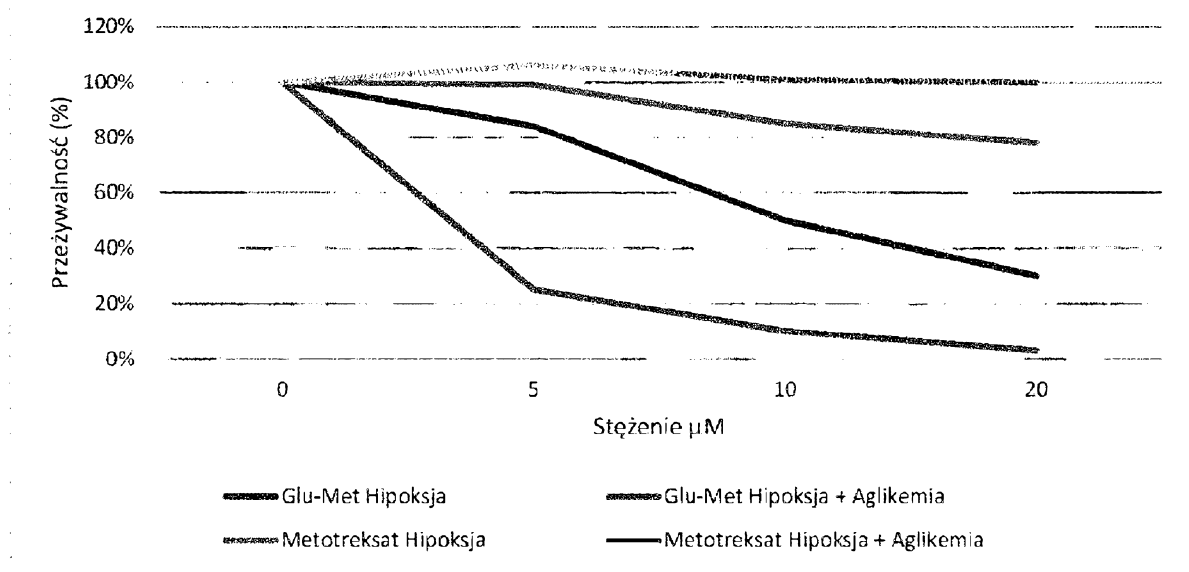


Figura 4

A)



B)

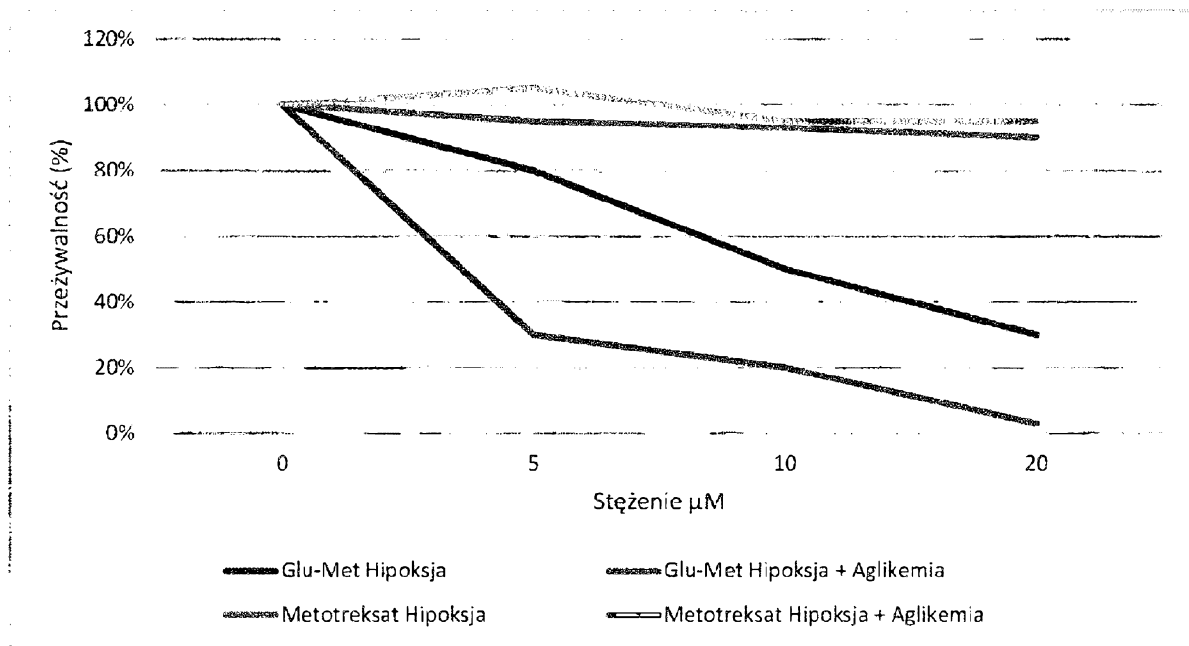


Figura 5

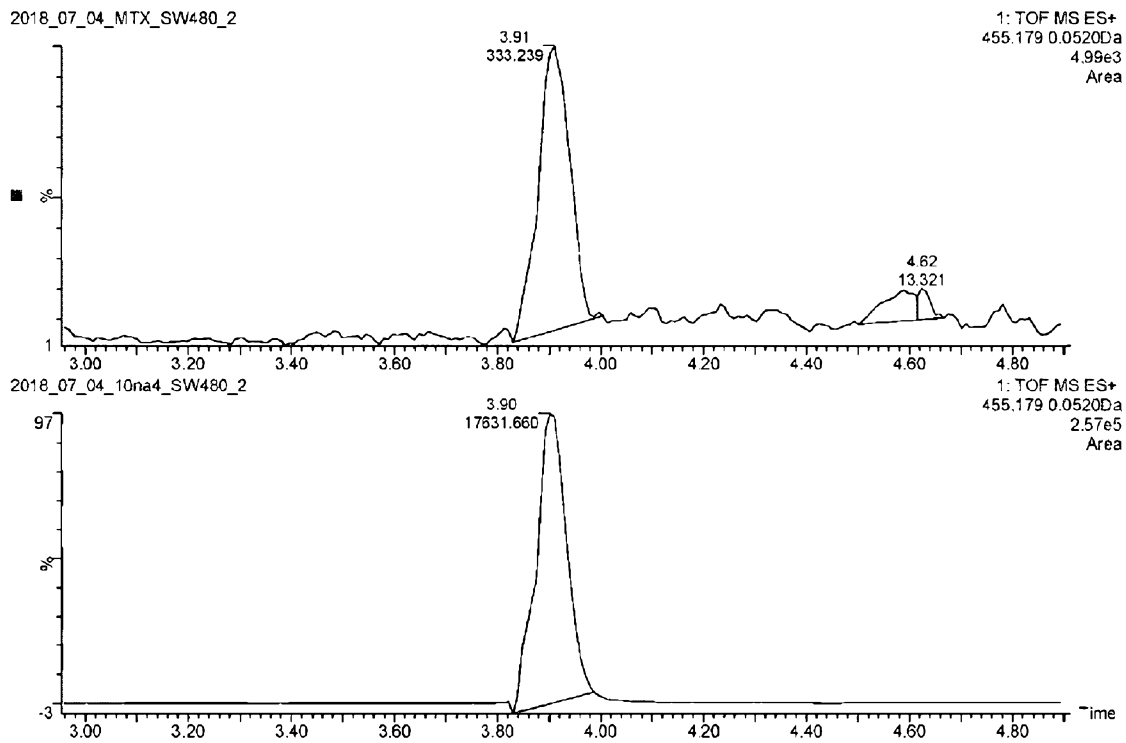


Figura 6

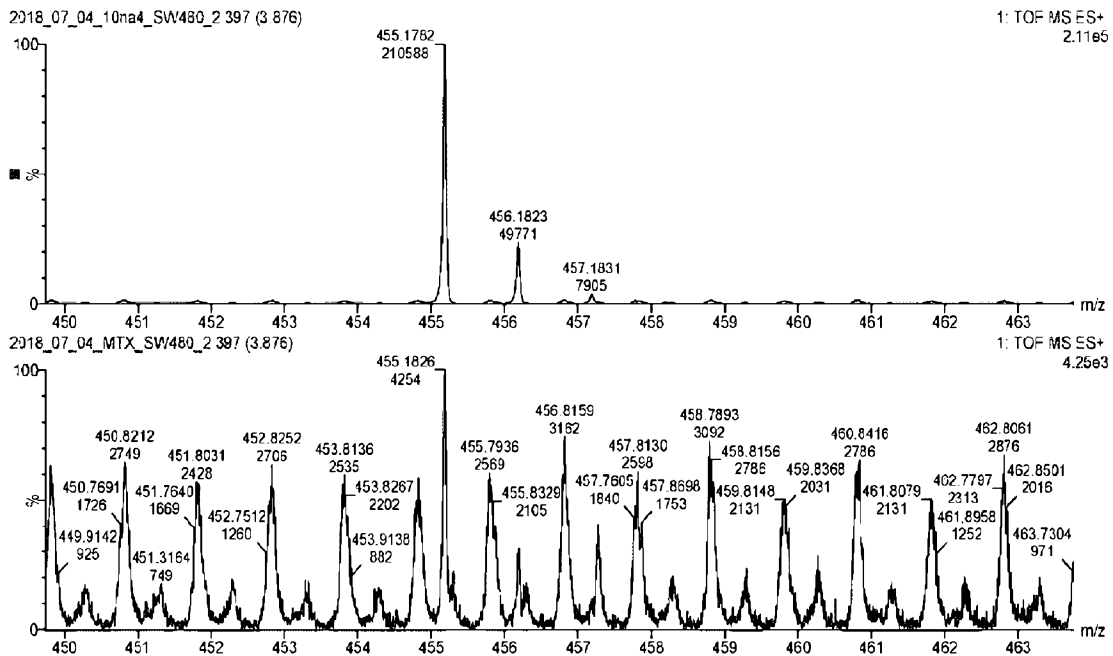


Figura 7