

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 444568 A1

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku
(z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **444568**
(22) Data zgłoszenia: **2023.04.25**
(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.10.28 BUP 44/2024**

(51) MKP:
C07D 471/04 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01)

(71) Zgłaszający:
UNIwersytet Śląski w Katowicach,
Katowice, PL

(72) Twórca(-y):
KATARZYNA MALARZ, Bielsko-Biała, PL
PATRYCJA RAWICKA, Łany, PL
JACEK MULARSKI, Katowice, PL
ANNA MROZEK-WILCZKIEWICZ, Katowice, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Małgorzata Jadwiszczok,
Ruda Śląska, PL

(54) Tytuł:
4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidyna
oraz jej zastosowanie

(57) Skróć opisu:
Przedmiotem zgłoszenia jest 4-[(2chlorofenylo)-sulfanylo]-2-[(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo-[2,3-d] pirymidyna oraz jej zastosowanie jako barwnika fluorescencyjnego do barwienia biologicznych struktur komórkowych, korzystnie do barwienia błoniastych struktur komórkowych, najkorzystniej do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów nabłonkowych płuc lub błoniastych struktur komórkowych nowotworów mózgu.

4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyna oraz jej zastosowanie

Przedmiotem wynalazku jest 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyna będąca pochodną pirydo[2,3-d]pirymidyny, oraz jej zastosowanie do barwienia biologicznych struktur komórkowych.

Obrazowanie struktur komórkowych jest istotnym zagadnieniem z punktu widzenia badań biomedycznych i wykorzystania ich potencjału do postawienia prawidłowej diagnozy. Wykorzystanie związków światłoczułych, które po wzbudzeniu odpowiednią wiązką światła emitują fluorescencję ma również istotne znaczenie dla rozwoju dziedziny chirurgii onkologicznej. Zjawisko fluorescencji pochodzące od barwników, które gromadzą się w tkankach zmienionych chorobowo może w wyjątkowy sposób uwydatnić i określić miejsce położenia guza, oraz jego rozmiar. Przykładami takich stosowanych barwników – fotouczulaczy są pochodne i analogi protoporfiryny IX, takie jak fotofrin, feoforbida, werteporfina lub ich prekursorzy zwane prolekami jak kwas 5-aminolewulinowy opisany w dokumentach patentowych WO84/04665 oraz WO2013/184830. Z drugiej jednak strony, związki te posiadają pewną toksyczność po aktywacji wiązką światła, co uniemożliwia ich wykorzystanie do nieinwazyjnego barwienia struktur komórkowych. Innymi najbardziej znanymi barwnikami fluorescencyjnymi są izotiocyjanian 5-fluoresceiny (FITC), czy oranż akrydyny służące do wybarwiania struktur komórkowych, poprzez wiązanie z elementami cytoszkieletu oraz kwasami nukleinowymi (opisy patentowe: US9102835, US5075556, US20100184042, US20040156782). Co więcej, popularnym środkiem fluorescencyjnym stosowanym w diagnostyce medycznej przy badaniu kontrastowym jest zieleń indocyjaninowa, której zastosowanie wskazano w dokumencie patentowym US20040156782.

Znanym ze stanu techniki (patent PL233179) barwnikiem fluorescencyjnym służącym do barwienia organelli komórkowych jest także pochodna para-iminostyrylochinoliny, która znana jest ze swojego zastosowania

w diagnostyce chorób nowotworowych, zwłaszcza chorób nowotworowych jelita grubego.

Inne znane ze stanu techniki pochodne mające zastosowanie do barwienia komórek nowotworowych to pochodne fenotiazyny (polskie zgłoszenie patentowe P.438052) zawierające w swojej strukturze sprzężony pierścień imidazolu.

Pomimo szerokiego wachlarza zastosowań, wiele z obecnie stosowanych barwników fluorescencyjnych nie pozostaje bez wad. W pracy Jensen, E.C., Anat Rec **2012**, 295, 2031-2036 opisano ograniczenia stosowania popularnych barwników wraz ze wskazaniem najistotniejszych trudności jakie napotykają dzisiejsze badania związane z obrazowaniem. Dlatego też znalezienie dobrego barwnika stanowi duże wyzwanie, a tym samym badania związane z poszukiwaniem nowych związków mających zastosowanie w obrazowaniu struktur komórkowych są szczególnie istotne. Związki wykazujące fluorescencję dedykowane do wybarwiania organelli komórkowych czy też monitorowania zmian strukturalnych oraz biochemicznych zachodzących w układach komórkowych powinny posiadać kilka istotnych cech. Ze względu na możliwości wykorzystania związków w barwieniach przyżyciowych, najważniejszym elementem jest ich brak cytotoksyczności wobec komórek, nawet w przypadku długoczasowych procedur. Dodatkowo, brak wpływu na cykl i mechanizmy zachodzące w komórkach, jak i wysokie powinowactwo do określonych struktur komórkowych to niezbędniaki dobrego barwnika. Z punktu widzenia właściwości spektroskopowych, barwniki do wskazanych zastosowań powinny charakteryzować się wysoką kwantową wydajnością fluorescencji, dużym przesunięciem Stokesa oraz brakiem fotowysbielenia. Cechy te gwarantują uzyskanie najwyższej jakości obrazów mikroskopowych przy wysokim sygnale fluorescencji w stosunku do szumu, generowanego przez autofluorescencję komórek. Przyjmuje się również, że związki przeznaczone do barwień komórkowych powinny charakteryzować się emisją fluorescencji minimum w granicach barwy zielonej. Stąd też, barwniki emitujące zieloną barwę są jednymi z najbardziej popularnych i są przedmiotem zainteresowania badaczy pracujących nad zmodyfikowaniem i ulepszeniem cech, które ograniczają ich możliwości

stosowania [Swenson ES, Price JG, Brazelton T, Krause DS., Stem Cells **2007**, 25, 2593-2600]. Warto również nadmienić, iż badania związane z zastosowaniem barwników są niejednokrotnie wstępem i podwaliną do złożonych badań klinicznych i dlatego mają bezpośrednie przełożenie na użycie przedmiotu tych badań w medycynie. Wobec tego, synteza nowych pochodnych opartych na nowych szkieletach, które wykazują specyficzne własności jest działaniem potrzebnym i pożądanym.

Celem twórców niniejszego wynalazku stało się opracowanie pochodnej pirydo[2,3-d]pirymidyny o korzystnych własnościach spektroskopowych. Dotychczasowe doniesienia o związkach opartych na szkielecie pirydo[2,3-d]pirymidyny dotyczą jedynie ich zastosowania w zakresie hamowania aktywności kinaz białkowych takich jak FGFR4 czy też białek mTOR i Akt odpowiedzialnych za procesy przeżycia komórek. Związki takie są opisane w dokumentach patentowych: US10618902, US2008194546, WO2007/060404. Żaden z nich nie dotyczy możliwości wykorzystania związków zawierających szkielet pirydo[2,3-d]pirymidyny z dołączonym 1-chloro-2-(metylosulfanylo)benzenem do barwienia struktur komórkowych lub wykorzystania w diagnostyce chorób nowotworowych.

Istotę niniejszego wynalazku stanowi 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyna, o postaci chemicznej przedstawionej wzorem 1, będąca pochodną pirydo[2,3-d]pirymidyny.

Istotę wynalazku stanowi także zastosowanie 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyny przedstawionej wzorem 1 jako barwnika fluorescencyjnego do barwienia biologicznych struktur komórkowych, przy czym stosuje się ją, to jest podaje do komórek, w pożywce hodowlanej umożliwiającej przeżycie komórek, po uprzednim rozpuszczeniu w rozpuszczalniku.

Korzystnie, w roztworze gotowym do podania do komórek, stężenie rozpuszczalnika w pożywce hodowlanej nie przekracza 0,3%.

Korzystnie, 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidynę przedstawioną wzorem 1 stosuje się rozpuszczoną w dimetylosulfotlenku (DMSO).

Korzystnie, jako pożywkę hodowlaną stosuje się pożywkę Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM.

Korzystnie, 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidynę przedstawioną wzorem 1 stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych.

Korzystnie, 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidynę przedstawioną wzorem 1 stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów nabłonkowych płuc.

Korzystnie, 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidynę przedstawioną wzorem 1 stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów mózgu.

Nowo zsyntezowana pochodna pirydo[2,3-d]pirymidyny została scharakteryzowana pod kątem widm absorpcji i emisji. Prezentowane w przykładzie 1 dane wskazują, iż przedmiot niniejszego wynalazku wykazuje dwa pasma absorpcji w zakresie 300-360 nm oraz fluorescencję w zakresie 464 nm. Duże przesunięcie Stokesa (powyżej 110 nm) oraz wysoka intensywność fluorescencji zakwalifikowały prezentowaną pochodną do badań komórkowych dotyczących obrazowania. Związek ten może być stosowany zgodnie z wynalazkiem w postaci farmaceutycznie dostępnych preparatów, takich jak roztwory rozpuszczone w korzystnym dla komórek rozpuszczalniku. Takim rozpuszczalnikiem może być dimetylosulfotlenek (DMSO) lub etanol. Jednakże, przy przygotowaniu roztworu gotowego do podania do układu komórkowego należy uwzględnić bezpieczną dawkę rozpuszczalnika, która nie powinna przekraczać 0,3% objętości pożywki hodowlanej gotowej do podania do układu

komórkowego. Z przeprowadzonych testów biologicznych wynika, że badana pochodna pirydo(2,3-d)pirymidyny tj. 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyna wykazuje brak bądź znikomą cytotoksyczność względem kilku linii komórek nowotworowych. Inkubacja pochodnej według wynalazku z testowanymi liniami komórkowymi nie wpływała znacząco na spadek żywotności tych komórek co zostało potwierdzone oceną morfologii komórek, jak również znacznie wydłużonym (do 72 godzin) czasem inkubacji w stosunku do czasu eksperymentu obrazowania, który wynosił 2 godziny. W typowej procedurze barwienia, po 2-godzinnym czasie inkubacji związku, komórki linii A549 (nowotwór płuca), oraz komórki linii U251, LN-18 i LN-229 (nowotwory mózgu) zostały poddane obserwacji z zastosowaniem techniki mikroskopii fluorescencyjnej. Zwykle obrazy powstałe w wyniku użycia tych metod, można rejestrować przy użyciu kamery CCD. Przedstawione obrazy w przykładach niniejszego wynalazku wskazują na intensywną zieloną fluorescencję obszarów błoniastych komórki. Dodatkowo, ten specyficzny mechanizm powinowactwa związku do komórkowych struktur błoniastych, jakie występują w mitochondriach oraz lizosomach potwierdziło przeprowadzone kontrbarwienie 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyny z zastosowaniem komercyjnych barwników dedykowanych poszczególnym organellom. Warunkiem stosowania tej metody jest różna długość fali promieniowania wzbudzającego oraz emitowanego badanego związku i stosowanego komercyjnie dostępnego barwnika.

Pochodną według wynalazku można otrzymać z wykorzystaniem metod znanych ze stanu techniki, na przykład z wykorzystaniem procedury syntezy, opisanej w publikacjach: Mularski J, Malarz K, Pacholczyk M, Musiol R., Eur J Med Chem. **2019**, 163, 610-625 oraz Malarz K, Mularski J, Kuczak M, Mrozek-Wilczkiewicz A, Musiol R., Cancers **2021**, 13, 1790 z modyfikacjami.

Poniżej przedstawiono rozwiązania według wynalazku, które mają charakter przykładowy. W przykładzie 1 przedstawiono postać chemiczną otrzymanej pochodnej pirydo[2,3-d]pirymidyny, tj. 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyny (oznaczenie kodowe

związku: **ET-06**) oraz przykładowy sposób jej otrzymywania. Dodatkowo przedstawiono właściwości spektroskopowe pochodnej według wynalazku, które są istotne przy jej zastosowaniu. Ponadto, przedstawiono przykładowe widma absorpcji i emisji 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyny według wynalazku. Wskazano także właściwości spektroskopowe 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyny w zależności od stosowanego rozpuszczalnika. Dodatkowo przedstawiono cytotoksyczność badanej pochodnej ET-06 wobec różnych typów komórek nowotworowych. W przykładach od 2 do 4 przedstawiono możliwość zastosowania 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyny w barwieniu biologicznych struktur komórkowych.

Przykład 1

4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyna (**ET-06**) o wzorze 1.

Związek otrzymano według przykładowej metody, która polegała na tym, że w naczyniu umieszczono (0,1 mmol, 43 mg) 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzo-1-sulfonianu o wzorze 2 stanowiącego bezpośredni prekursor ET-06, dodano chlorek metylenu - CH_2Cl_2 oraz 2-propanol (1:5 V/V; 2 mL), 2-chlorobenzono-1-tiol (0,1 mmol; 15 mg) oraz DIPEA - N,N-diizopropylloetyloaminę (0,1 mmol; 14 mg), po czym całość mieszano ogrzewając w temperaturze wrzenia 2-propanolu przez 15 minut. Z roztworu wykrystalizowano związek ET-06, który zbierano na lejku i rekrytalizowano z 2-propanolu (2 mL). ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9,23 (dd, $J = 4,4, 1,9$ Hz, 1H), 8,69 (dd, $J = 8,2, 1,9$ Hz, 1H), 7,91 (dd, $J = 7,7, 1,6$ Hz, 1H), 7,86 – 7,78 (m, 2H), 7,74 (ddd, $J = 8,1, 7,5, 1,7$ Hz, 1H), 7,71 (dd, $J = 8,2, 4,4$ Hz, 1H), 7,65 (dd, $J = 7,7, 1,7$ Hz, 1H), 7,59 (apptd, $J = 7,6, 1,4$ Hz, 1H), 7,37 (ddd, $J = 8,4, 7,3, 1,7$ Hz, 1H), 7,17 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 7,07 (dd, $J = 8,4, 1,1$ Hz, 1H), 7,01 – 6,96 (m, 1H), 3,87 (s, 3H).

Natomiast bezpośredni prekursor ET-06, to jest 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidyno-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonian wytworzono uprzednio według przykładowej metody, która polegała na tym, że w naczyniu umieszczono (0,2 mmol, 56 mg) [2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidyno-4(3H)-on. Dodano chlorek metylenu - CH₂Cl₂ (3 mL), DIPEA - N,N-diizopropylaoetyloaminę (0,3 mmol; 39 mg), TsCl - chlorek 4-metylobenzenosulfonowy (0,3 mmol, 57 mg) oraz DMAP - 4-dimetyloaminopirydynę (0,02 mmol; 3 mg). Całość mieszano w atmosferze gazu obojętnego (w temperaturze pokojowej 20-22°C) do zaniku sygnału pochodzącego od [2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidyno-4(3H)-onu. Następnie dokonano identyfikacji sygnału za pomocą cienkiej warstwy TLC (CH₂Cl₂:heksan – 1:1). Związek wydzielano poprzez rozdział chromatograficzny stosując kartridż wypełniony żel krzemionkowym (40 - 63 µm, 60 Å). ¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂) δ 9,19 (dd, J = 4,4, 2,0 Hz, 1H), 8,52 (dd, J = 8,2, 2,0 Hz, 1H), 8,42 (d, J = 16,1 Hz, 1H), 8,29 – 8,18 (m, 2H), 7,74 (dd, J = 7,5, 1,6 Hz, 1H), 7,56 (dd, J = 8,2, 4,4 Hz, 1H), 7,48 – 7,40 (m, 3H), 7,36 (d, J = 16,1 Hz, 1H), 7,17 – 7,04 (m, 2H), 4,07 (s, 3H).

Natomiast [2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidyno-4(3H)-on, potrzebny do uzyskania bezpośredniego prekursora ET-06, to jest 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidyno-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonianu otrzymano w wyniku następującej przykładowej trzyetapowej syntezy:

1) Najpierw przeprowadzono reakcję kwasu 2-aminonikotynowego z nadmiarem stechiometrycznym bezwodnika octowego (50 ekwiwalentów molowych), w temperaturze 80°C w reaktorze mikrofalowym – o mocy 80 W. Wynikiem reakcji jest 2-metylo-4H-pirydo[2,3-d][1,3]oksazyn-4-on. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8,96 (dd, J = 4,7, 2,0 Hz, 1H), 8,50 (dd, J = 7,8, 2,0 Hz, 1H), 7,61 (dd, J = 7,8, 4,7 Hz, 1H), 2,45 (s, 4H); Surowy produkt wydzielono poprzez filtrację.

2) 2-metylo-4H-pirydo[2,3-d][1,3]oksazyn-4-on (8 g) wymieszano z 40 mL wodnego roztworu amoniaku (32%) w temperaturze pokojowej (20-22°C) do całkowitego rozpuszczenia się osadu. Nasycanie roztworu reakcyjnego

dwutlenkiem węgla powoduje precypitację produktu 2-metylopirydo[2,3-d]pirymidin-4(3H)-onu, który zebrano na lejku filtracyjnym i przemyto 2-propanolem – otrzymując chinazon z wydajnością 40%. Reakcja została sprawdzona w skali 50 mmol; ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 12,48 (s, 1H), 8,90 (dd, $J = 4,6, 2,1$ Hz, 1H), 8,45 (dd, $J = 7,8, 2,1$ Hz, 1H), 7,48 (dd, $J = 7,8, 4,6$ Hz, 1H), 2,40 (s, 3H);

3) W trzecim etapie przeprowadzono reakcję 2-metylopirydo[2,3-d]pirymidin-4(3H)-onu z aldehydem 2-metoksyalicylowym w kwasie octowym (przykładowo stosowano taką ilość, aby nie przekroczyć 2 M stężenia substratu). Reakcję można prowadzić stosując reaktor mikrofalowy (130°C, 80 W, 120 minut) lub na łaźni olejowej (130°C, 12 h). Produkt krystalizował z medium reakcyjnego z wydajnością 45%. ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 12,62 (s, 1H), 8,93 (dd, $J = 4,5, 2,1$ Hz, 1H), 8,46 (dd, $J = 7,8, 2,1$ Hz, 1H), 8,29 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 7,64 (dd, $J = 7,7, 1,7$ Hz, 1H), 7,47 (dd, $J = 7,8, 4,6$ Hz, 1H), 7,44 (ddd, $J = 8,8, 7,4, 1,7$ Hz, 1H), 7,16 – 7,09 (m, 2H), 7,06 (appt, $J = 7,5$, 1H), 3,93 (s, 3H).

Właściwości spektroskopowe 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidyny.

W tabeli nr 1 przedstawiono zbiór najważniejszych parametrów spektroskopowych 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidyny w chloroformie jako najkorzystniejszym rozpuszczalniku do badań właściwości spektroskopowych. Parametry te potwierdzają przydatność wskazanej pochodnej z przykładu 1 do barwienia biologicznych struktur komórkowych.

Zgodnie z przedstawionymi danymi można zaobserwować, że badana pochodna ET-06 wykazuje dwa pasma absorpcji (306 nm oraz 353 nm) oraz maksimum fluorescencji w zakresie długości fali 464 nm, co odpowiada barwie zielonej. Związek ET-06 cechuje także wysoka intensywność fluorescencji (dla badanego stężenia $5 \cdot 10^{-5}$ M) oraz duże przesunięcie Stokesa (111 nm). Wskazane parametry spektroskopowe są szczególnie korzystne i istotne w zakresie uzyskania wysokiego sygnału fluorescencji w stosunku do tła, co jest gwarantem otrzymania

najwyższej jakości obrazów mikroskopowych. Z kolei, te cechy są szczególnie ważne dla wskazanego zastosowania w niniejszym wynalazku.

Przykładowe widma absorpcji i emisji 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidyny.

Widma absorpcji dla pochodnej ET-06 w chloroformie (przedstawione na Fig. 4).

Widma emisji (wzbudzenie 353 nm) dla pochodnej ET-06 w chloroformie (przedstawione na Fig. 5).

Prezentowane widma absorpcji i fluorescencji potwierdzają korzystne własności spektroskopowe pochodnej ET-06, a także potwierdzają przydatność wskazanej pochodnej do barwienia biologicznych struktur komórkowych. Na wszystkich prezentowanych widmach widoczna jest zależność intensywności położenia pasm absorpcji oraz fluorescencji od badanego stężenia związku. Co ważne, zastosowanie prezentowanej pochodnej ET-06 w niskim stężeniu: $6,25 \cdot 10^{-6}$ M nadal potwierdza wysoką intensywność fluorescencji (powyżej 1000). W związku z tym, tak korzystne parametry spektroskopowe zakwalifikowały związek do dalszych badań komórkowych.

Właściwości spektroskopowe 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidyny w zależności od stosowanego rozpuszczalnika.

Tabela nr 2 przedstawia właściwości solwatochromiczne 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidyny, to jest zmiany właściwości spektroskopowych związku z przykładu 1 w zależności od stosowanego rozpuszczalnika (polarności). Rozpuszczalniki uporządkowane wg indeksu polarności (klasyfikacja Burdick & Jackson).

Zgodnie z przedstawionymi danymi, pochodna ET-06 prezentuje szczególnie korzystne parametry spektroskopowe w wybranych rozpuszczalnikach, to jest w chloroformie lub DMSO. Szczególnie drugi rozpuszczalnik zgodnie z danymi literaturowymi obok etanolu i metanolu jest uważany za korzystny z uwagi na rozpuszczenie substancji przeznaczonej do barwienia materiału żywego [Nguyen,

S., Nguyen, H., Truong, K., Biomed. Res. Ther. **2020**, 7(7), 3855-3859 oraz Jamalzadeh, L., Ghafoori, H., Sariri, R., Rabuti, H., Nasirzade, J., Hasani, H., & Aghamaali, M. R., Avicenna J Med Biochem, **2016**, 4(1), 10-33453]. Należy jednak zwrócić uwagę, aby bezpieczna dawka wskazanego rozpuszczalnika nie przekraczała 0,3% objętości pożywki hodowlanej gotowej do podania do układu komórkowego.

Cytotoksyczność badanej 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyny (ET-06) wobec różnych typów komórek nowotworowych.

Aktywność antyproliferacyjną testowanego związku oznaczono wobec ludzkich komórek nowotworów: mózgu linii U251, LN-18 oraz LN-229 oraz płuca linii A549. Komórki wysiewano na 96-dółkową płytkę w ilości 5 tysięcy na dołek (po 100 μ L/dółek) i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C i 5% CO₂. Po tym czasie przygotowano i podawano roztwory związku ET-06 (rozpuszczonych w minimalnej ilości DMSO, tj. w taki sposób aby zawartość DMSO nie przekraczała 0,3% objętości pożywki hodowlanej gotowej do podania do układu komórkowego) w stężeniach umożliwiających wyznaczenie wartości IC₅₀. Przykładowa aplikacja związku: rozpuszczenie związku w DMSO celem przygotowania roztworów o następujących stężeniach: 25 μ M, 12,5 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M, 0,1 μ M w pożywce hodowlanej Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), końcowa objętość w dołkach wynosiła 200 μ L. Następnie roztwory zostały podane komórkom i inkubowane 72 godziny. Po tym czasie przeżywalność komórek została określona za pomocą standardowego testu MTS. Aktywność antyproliferacyjną badanej 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyny (ET-06), w postaci wyliczonych wartości IC₅₀ przedstawiono w tabeli 3.

Zgodnie z przedstawionymi wynikami, dla badanej pochodnej ET-06 nie obserwowano cytotoksyczności wobec nowotworu nabłonkowego płuc. Dodatkowo, prezentowane dane wskazują na znikomą cytotoksyczność pochodnej o wzorze 1 wobec kilku różnych typów komórek nowotworowych. W związku

z powyższym, pochodna opisana wynalazkiem dobrze nadaje się do stosowania w obrazowaniu biologicznych struktur komórkowych w stężeniu pozwalającym osiągnąć wysoki poziom fluorescencji przy jednoczesnym braku lub znikomej cytotoksyczności.

Przykład 2

Zastosowanie 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyny (ET-06) do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów nabłonkowych płuc.

Przykładowa procedura barwienia komórek ludzkiego nowotworu nabłonkowego płuca linii A549. Komórki wysiano w ilości 150 tys. (wraz z 1 mL DMEM) na wcześniej przygotowane specjalne szalki do obrazowania posiadające powierzchnię zawierającą szkiełko nakrywkowe, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37°C, 5% CO₂. Po tym czasie przygotowano roztwór związku ET-06 (rozpuszczalnik DMSO, którego zawartość nie przekracza 0,3% objętości pożywki hodowlanej gotowej do podania do układu komórkowego) w stężeniu 25 µM w pożywce hodowlanej Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), końcowa objętość na szkiełku wynosiła 1 mL. Następnie roztwór został podany komórkom i inkubowany przez 2 godziny w 37°C, celem wniknięcia związku przez błonę komórkową. Po inkubacji komórki przemywano dwukrotnie DMEM (bez FBS i czerwieni fenolowej), a następnie obserwowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego po wzbudzeniu filtrem DAPI, co przedstawiono na Fig. 1.

Zgodnie z przedstawionym obrazem, badana pochodna wykazuje jasną, intensywną zieloną fluorescencję w komórkach raka płuca. Umiejscowienie sygnału fluorescencyjnego na obszarze komórki może wskazywać powinowactwo do struktur błoniastych.

Przykład 3

Zastosowanie 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyny (ET-06) do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów mózgu.

Przykładowa procedura barwienia komórek ludzkiego nowotworu mózgu linii U251 oraz LN-229. Komórki wysiano w ilości 150 tys. (wraz z 1 mL DMEM) na wcześniej przygotowane specjalne szalki do obrazowania posiadające powierzchnię zawierającą szkiełko nakrywkowe, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37°C, 5% CO₂. Po tym czasie przygotowano roztwór związku o wzorze 1 (rozpuszczalnik DMSO, którego zawartość nie przekracza 0,3% objętości pożywki hodowlanej gotowej do podania do układu komórkowego) w stężeniu 25 µM w pożywce hodowlanej DMEM, końcowa objętość na szkiełku wynosiła 1 mL. Następnie roztwór został podany komórkom i inkubowany przez 2 godziny w 37°C, celem wnikięcia związku przez błonę komórkową. Po inkubacji komórki przemywano dwukrotnie DMEM (bez FBS i czerwieni fenolowej), a następnie obserwowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego po wzbudzeniu filtrem DAPI, co przedstawiono na Fig. 2A oraz Fig. 2B.

Przedstawione obrazy, wyraźnie wskazują na akumulację pochodnej ET-06 we wnętrzu komórek dwóch typów nowotworów mózgu: linii U251 (Fig. 2A) i linii LN-229 (Fig. 2B). Zgodnie z przedstawionymi danymi związek charakteryzuje się intensywną zieloną fluorescencją, która może występować w obszarach błoniastych komórek.

Przykład 4

Zastosowanie pochodnej pirido[2,3-d]pirymidyny o kodowaniu ET-06 do selektywnego barwienia zmian w błoniastych strukturach komórkowych i diagnostyki chorób nowotworowych nabłonkowych płuc.

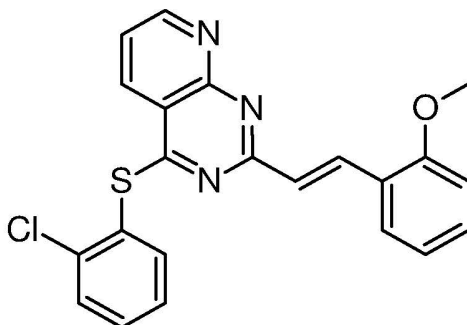
Przykładowa procedura barwienia struktur komórkowych ludzkiego nowotworu nabłonkowego płuca linii A549. Komórki wysiano w ilości 150 tys. (wraz z 1 mL DMEM) na wcześniej przygotowane specjalne szalki do obrazowania posiadające powierzchnię zawierającą szkiełko nakrywkowe, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37°C, 5% CO₂. Po tym czasie przygotowano roztwór związku o wzorze 1 (rozpuszczalnik DMSO, którego zawartość nie przekracza 0,3% objętości pożywki hodowlanej gotowej do podania do układu komórkowego) w stężeniu 25 µM w pożywce hodowlanej DMEM, końcowa objętość na szkiełku

wynosiła 1 mL. Następnie roztwór został podany komórkom i inkubowany przez 2 godziny w 37°C, celem wnikięcia związku przez błonę komórkową. Po zakończonej inkubacji komórki przepłukano dwukrotnie DMEM (bez FBS i czerwieni fenolowej), a następnie dodano roztwór odpowiedniego markera fluorescencyjnego, tj. barwnika do mitochondriów (przykładowe warunki barwienia: 100 nM, 30 min) lub lizosomów (przykładowe warunki barwienia: 5 µM, 1 godzina). Zastosowane fluorofory pozwoliły na specyficzne wybarwienie wybranych struktur wewnątrzkomórkowych: lizosomów oraz mitochondriów. Zastosowanie powyższych barwników ułatwiło ocenę akumulacji badanego związku we wnętrzu komórek na tle wybarwionych struktur. Po upływie wymaganego czasu inkubacji, dołki przepłukano dwukrotnie DMEM (bez FBS i czerwieni fenolowej), a następnie obserwowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego po wzbudzeniu filtrem o odpowiedniej długości fali, co przedstawiono na Fig. 3A oraz Fig. 3B.

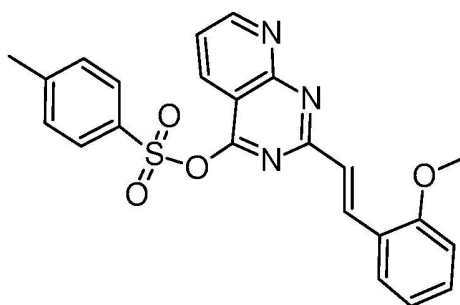
Prezentowane dane potwierdzają specyficzny mechanizm związku i tendencję do akumulacji w komórkowych strukturach błoniastych, jakie występują w mitochondriach oraz lizosomach. Nałożenie obrazów powstałych w wyniku przeprowadzonego kontrbarwienia 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidyny (Fig. 3A) z barwnikami komercyjnie dostępnymi (dedykowanymi dla poszczególnych organelli komórkowych, tj. mitochondriów Fig. 3B) pozwala jednoznacznie stwierdzić umiejscowienie badanego związku w komórce.

Zastrzeżenia patentowe

1. 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidyna, o postaci chemicznej przedstawionej wzorem 1.
2. Zastosowanie 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidyny przedstawionej wzorem 1 jako barwnika fluorescencyjnego do barwienia biologicznych struktur komórkowych, przy czym stosuje się ją, to jest podaje do komórek, w pożywce hodowlanej umożliwiającej przeżycie komórek, po uprzednim rozpuszczeniu w rozpuszczalniku.
3. Zastosowanie według zastrz. 2 **znamiennie tym, że** w roztworze gotowym do podania do komórek, stężenie rozpuszczalnika w pożywce hodowlanej nie przekracza 0,3%.
4. Zastosowanie według zastrz. 2 do 3 **znamiennie tym, że** 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidyna rozpuszczona jest w dimetylosulfotlenku.
5. Zastosowanie według zastrz. 2 do 4 **znamiennie tym, że** jako pożywkę hodowlaną stosuje się pożywkę Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM.
6. Zastosowanie według któregośkolwiek z zastrzeżeń 2 do 5 **znamiennie tym, że** 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidynę stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych.
7. Zastosowanie według któregośkolwiek z zastrzeżeń 2 do 6 **znamiennie tym, że** 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidynę stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów nabłonkowych płuc.
8. Zastosowanie według któregośkolwiek z zastrzeżeń 2 do 6 **znamiennie tym, że** 4-[(2-chlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]pirydo[2,3-d]pirymidynę stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów mózgu.



Wzór 1



Wzór 2

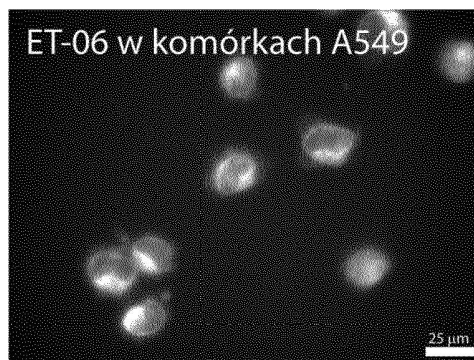


Fig.1

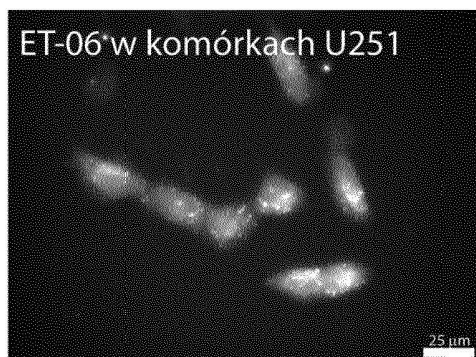


Fig. 2A

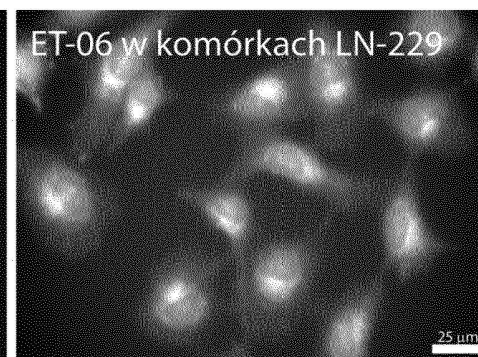


Fig. 2B

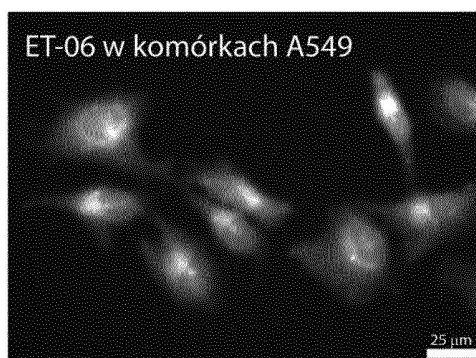


Fig. 3A

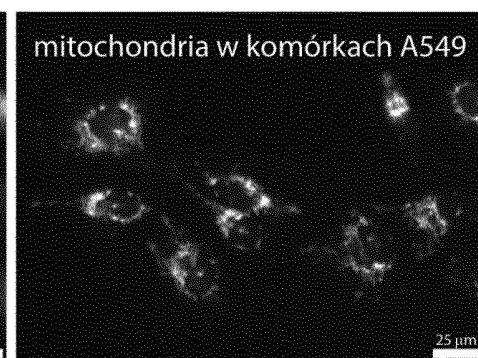


Fig. 3B

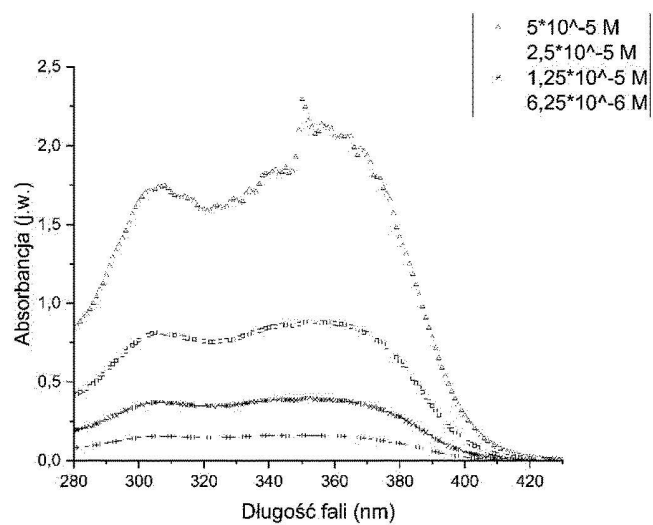


Fig. 4

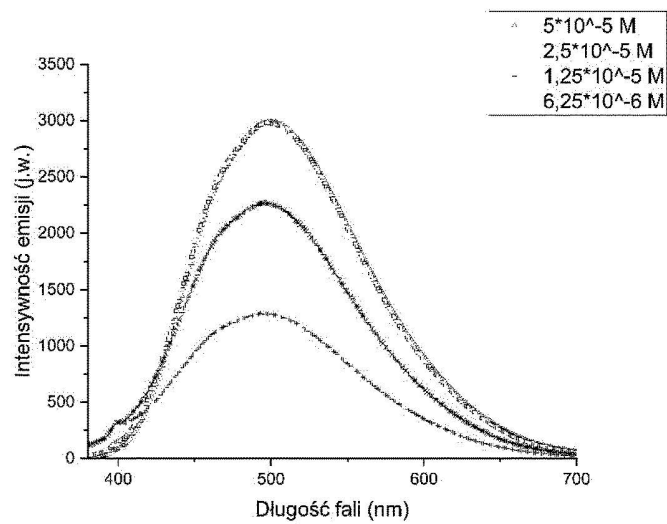


Fig. 5

Tabela 1.

Związek	Zakres absorpcji [nm]	Położenie pasm absorpcji λ [nm]	Maksimum fluorescencji $\lambda_{\max}$ [nm]	Intensywność fluorescencji	Przesunięcie Stokesa [nm]
ET-06	280-430	306; 353	464	5584	111

Tabela 2.

Związek	Rozpuszczalnik	Położenie pasm absorpcji λ [nm]	Maksimum fluorescencji $\lambda_{\max}$ [nm]	Intensywność fluorescencji	Przesunięcie Stokesa [nm]
ET-06	DMSO	306; 356	498	2986	142
	metanol	305; 357	484	1153	127
	chloroform	306; 353	464	5584	111
	toluen	305; 352	446	509	94

Tabela 3.

Związek	Aktywność antyproliferacyjna - IC ₅₀ [μM]			
	U251	LN-18	LN-229	A549
ET-06	15,63 ± 1,75	12,82 ± 0,94	18,91 ± 0,80	>25



SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR P.444568

Klasyfikacja zgłoszenia: C07D 471/04, G01N 33/52, C09K 11/06		
Podklasy w których prowadzono poszukiwania: C07D G01N C09K		
Bazy komputerowe w których prowadzono poszukiwania: EPODOC WPI Caplus Registry bazy UPRP Google		
Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	PL233179 B1 (UNIWERSYTET ŚLĄSKI W KATOWICACH, PL) 30-09-2019	1-8
A	Barbara Czaplińska i in., „Acid selective pro-dye for cellular compartments”, Scientific Reports 2019, 9:15304	1-8
A	WO2017014601 A1 (SEOUL NAT UNIV R & DB FOUND, KR; I IN.) 26-01-2017	1-8
☐ Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie		
A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie, E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia, L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu, O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób, P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa, T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku, X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie, Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy, & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.		

Sprawozdanie wykonał/-a:

Wioleta Świerczyńska
Naczelnik Wydziału

Data:

10.01.2024

Podpis:

/podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o zastrz. z dnia 25.04.2023 r.