

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 247231 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **445403**

(22) Data zgłoszenia: **2023.06.29**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.12.30 BUP 53/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.06.02 WUP 22/2025**

(51) MKP:

C07D 413/14 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

A61K 31/535 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA KRAKOWSKA IM. TADEUSZA
KOŚCIUSZKI, Kraków, PL
UNIwersytet Rolniczy im. Hugona
Koźłataja w Krakowie, Kraków, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**DAMIAN KUŁAGA, Kraków, PL
ANNA KAROLINA DRABCZYK, Kraków, PL
IZABELA SIEMIŃSKA, Kraków, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Adam Kuc, Kraków, PL

(54) Tytuł:

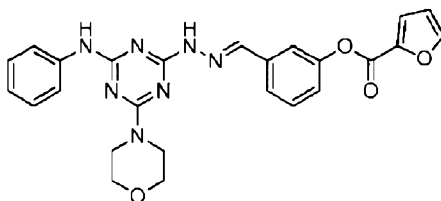
Nowa pochodna 1,3,5-triazyny i jej zastosowanie

PL 247231 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowa pochodna tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1 oraz jej zastosowanie w leczeniu nowotworu jelita grubego.

Stanowiąca przedmiot wynalazku, nowa pochodna tryptamino-1,3,5-triazyny w postaci soli chlorowodoru o ogólnym wzorze 1 to związek nieznan do tej pory w literaturze. Najbliższym rozwiązaniem pod względem budowy chemicznej do opisywanego nowego związku jest związek STL427944, wykazujący działanie cytotoksyczne na komórkach nowotworowych raka jelita grubego. Wynikiem jego zastosowania jest zahamowanie produkcji białka FOXM1, co w konsekwencji powoduje efekt przeciwnowotworowy i opisany został przez Comacho C. i Gartel A. w *Cell Death & Disease* (2021) 12:704 „Novel FOXM1 inhibitor identified via gene network analysis induces autophagic FOXM1 degradation to overcome chemoresistance of human cancer cells”. Związek ten opisany wzorem 2, jest przedstawicielem hydrazonów, zawierający motyw 1,3,5-triazyny połączonej ugrupowaniem hydrazonu z pierścieniem fenylovym, który z kolei jest podstawiony estrem kwasu 2-furanokarboksylowym w pozycji trzeciej.



Wzór 2

Rak jelita grubego (ang. colorectal cancer, CRC), to jeden z najbardziej śmiertelnych typów nowotworu złośliwego. Szacuje się, że w 2020 roku zostało zdiagnozowane ponad 1,9 miliona nowych przypadków. Współczesna terapia onkologiczna polega głównie na resekcji guza wraz z szerokim marginesem zdrowych tkanek, natomiast chemioterapia używana jest jako metoda wspomagająca. W przypadku chemioterapii, znane jest kilka leków (5-FU, kwas folinowy, oksaliplatyna oraz kapecytabina), które oprócz niszczenia komórek guza wpływają negatywnie na zdrowe tkanki, powodując szereg skutków ubocznych. Na chwilę obecną FDA (U.S. Food and Drug Administration) zaakceptowała trzy związki do leczenia raka jelita grubego – cetuksymab, panitumumab oraz bewacyzumab. Pomimo swojej skuteczności, wykazują skutki uboczne i nie każdy pacjent może być zakwalifikowany do ich stosowania z powodu potencjalnych mutacji receptora EGF lub też niskiej jego ekspresji. W przypadku cząsteczek typu small-molecules, jedynie regorafenib został zaakceptowany przez FDA m.in. do leczenia raka jelita grubego, jednak z powodu podobnych wad, terapia tym lekiem jest ograniczona.

Jednym z istotnych celów molekularnych, które mogą zostać użyte w leczeniu CRC, jest białko FOXM1 (ang. Forkhead Box M) – onkogenny czynnik transkrypcyjny, którego nadekspresja związana jest ze wzrostem guza, a także z procesem angiogenezy oraz mechanizmem powstawania przerzutów i spełnia kluczową rolę w mechanizmie oporności na typowe leki przeciwnowotworowe. Dla linii komórkowej SW480 (ludzkie komórki pierwotnego raka jelita grubego) związek STL427944 wykazywał słabą inhibicję FOXM1 w stężeniu 25 μ M, oraz znaczącą przy stężeniu – 50 μ M. Według autorów cząsteczka ta wykazywała również działanie dla innych typów komórek nowotworowych w tym LNCaP (rak prostaty), PC3 (rak prostaty) i A549 (nie-drobnokomórkowy rak płuc).

Istotą wynalazku jest nowa pochodna tryptamino-1,3,5-triazyny, którą stanowi chlorowodorek benzoesu (E)-3-((2-(4-((2-(1H-indo-3-ilo)etylo)amino)-6-morfolino-1,3,5-triaz-2-yl)hydrazono)metylo)fenylu o wzorze 1, do zastosowania w leczeniu nowotworu jelita grubego, jako substancja hamująca produkcję białka FOXM1.

Nowy związek, chlorowodorek benzoesu (E)-3-((2-(4-((2-(1H-indo-3-ilo)etylo)amino)-6-morfolino-1,3,5-triaz-2-yl)hydrazono)metylo)fenylu o wzorze 1, otrzymuje się w sekwencji pięciu reakcji:

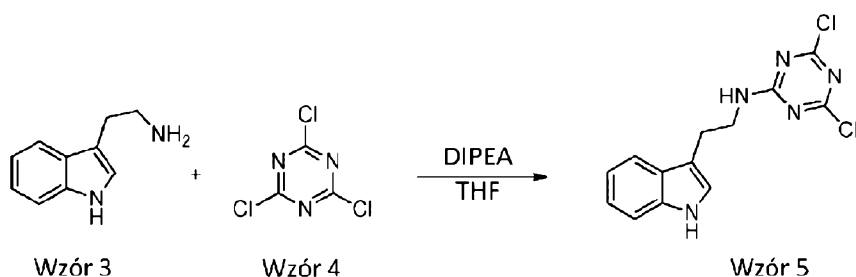
1. alkiluje się tryptaminę o wzorze 3 chlorkiem cyjanurowym o wzorze 4, w wyniku czego uzyskuje się półprodukt o wzorze 5;
2. półprodukt o wzorze 5 poddaje się reakcji kondensacji z morfoliną o wzorze 6, otrzymuje się produkt przejściowy o wzorze 7;
3. produkt przejściowy o wzorze 7 poddaje się reakcji kondensacji z wodzianem hydrazyny 8, otrzymując drugi produkt przejściowy o wzorze 9;

4. prowadzi się reakcję drugiego produktu przejściowego o wzorze 9 z benzoesanem 3-formylofenylowym o wzorze 10, przez co powstaje drugi półprodukt, zasada o wzorze 1a;
5. drugi półprodukt, zasadę o wzorze 1a przeprowadza się w postaci finalnego związku chlorowodoru o wzorze 1 z użyciem 4M roztworu HCl w dioksanie.

Nieoczekiwanym okazało się, że pomimo bliskiego podobieństwa strukturalnego do STL427944, opisywany związek będący chlorowodorkiem benzoesanu (E)-3-((2-(4-((2-(1H-indo-3-ilo)etylo)amino)-6-morfolino-1,3,5-triaz-2-yl)hydrazono)metylo)fenylu o wzorze 1 wykazuje działanie antyproliferacyjne na linii komórkowej SW480 (ludzkie komórki raka jelita grubego) poprzez blokadę produkcji białka FOXM1. Badany związek nie wykazywał działania na linii komórkowej SW620 (ludzkie komórki raka jelita grubego) oraz na linii prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego CCD841, która traktowana jest jako kontrolna.

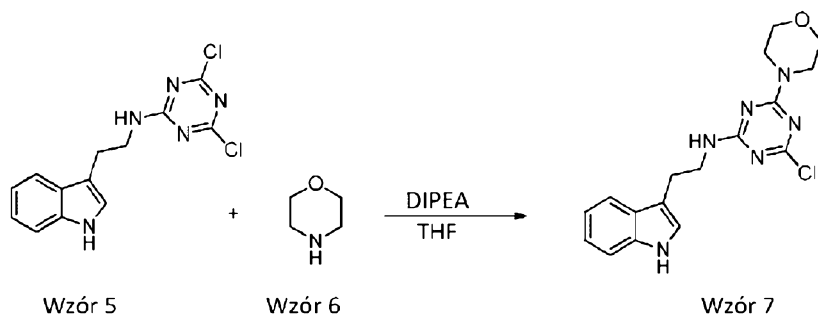
Przykładowy sposób uzyskania nowej pochodnej tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1 przedstawiono poniżej:

W pierwszym etapie 1,0 g (5,369 mmol) chlorku cyjanurowego (wzór 4) rozpuszczono w 20 mL bezwodnego tetrahydrofuranu (THF), a następnie schłodzono do temperatury 0°C. Do tak przygotowanej mieszaniny wkroplono 0,94 mL (5,369 mmol) diizopropyletyloaminy (DIPEA), a następnie 0,78 g (4,881 mmol) tryptaminy (wzór 3), rozpuszczonej w 15 mL bezwodnego tetrahydrofuranu (THF). Wkraplanie prowadzono z szybkością 2 kropel/s, tak aby temperatura nie przekroczyła 3°C. Po zakończeniu wkrapiania, temperaturę mieszaniny reakcyjnej podniesiono do 20°C i utrzymując tę temperaturę, prowadzono mieszanie z użyciem mieszadła magnetycznego jeszcze przez 10 minut z szybkością 700 obrotów/min. Po tym czasie, przy użyciu wyparki wolnoobrotowej (temperatura 40°C i ciśnienie 300 mbar), odparowano 25 mL rozpuszczalnika, a pozostałość przeniesiono do rozdzielacza i dodano 50 mL chlorku metylenu. Powstałą mieszaninę przemyto trzykrotnie 50 mL 0,1M roztworem kwasu solnego, po czym rozdzielono. Otrzymaną w ten sposób warstwę organiczną, suszono nad bezwodnym siarczanem (VI) magnezu, przefiltrowano, a następnie przesącz odparowano, przy użyciu wyparki wolnoobrotowej (temperatura 40°C i ciśnienie 300 mbar) w ciągu 10 minut. Otrzymaną w ten sposób stałą pozostałość koloru ciemnobeżowego macerowano w 15 mL zimnego metanolu, po czym odsączono, uzyskując jasnobieżowy osad, stanowiący półprodukt o wzorze 5, w ilości 1,45 g. Przebieg reakcji przedstawiono na schemacie I.



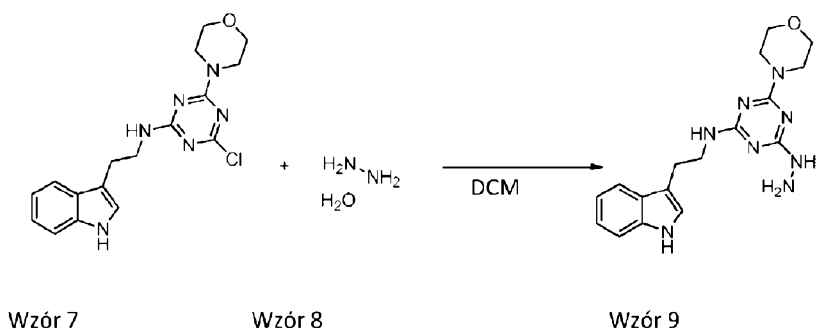
Schemat I

W drugim etapie 1,45 g (4,705 mmol) półproduktu o wzorze 5 rozpuszczono w 40 mL bezwodnego tetrahydrofuranu (THF), po czym schłodzono do temperatury 0°C. Do tak przygotowanej mieszaniny wkroplono 0,82 mL (4,705 mmol) diizopropyletyloaminy (DIPEA), a następnie 0,41 mL (4,705 mmol) morfoliny o wzorze 6. Wkraplanie prowadzono z szybkością 2 kropel/s, tak aby temperatura nie przekroczyła 3°C. Po zakończeniu wkrapiania, temperaturę mieszaniny reakcyjnej podniesiono do 20°C i utrzymując tę temperaturę, mieszano z użyciem mieszadła magnetycznego przez 15 godzin, z szybkością 700 obrotów/min. Po zakończeniu reakcji odparowano 30 mL rozpuszczalnika przy użyciu wyparki wolnoobrotowej (temperatura 40°C i ciśnienie 300 mbar), a ciekłą pozostałość przeniesiono do rozdzielacza i dodano 50 mL chlorku metylenu. Powstałą mieszaninę przemyto trzykrotnie 50 mL 1M roztworem kwasu solnego i rozdzielono. Otrzymaną w ten sposób warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem (VI) magnezu, przefiltrowano, a następnie przesącz odparowano przy użyciu wyparki wolnoobrotowej (temperatura 40°C i ciśnienie 300 mbar) w przeciągu 10 minut, otrzymując produkt przejściowy koloru białego o wzorze 7, w ilości 1,58 g. Przebieg reakcji przedstawiono na schemacie II.



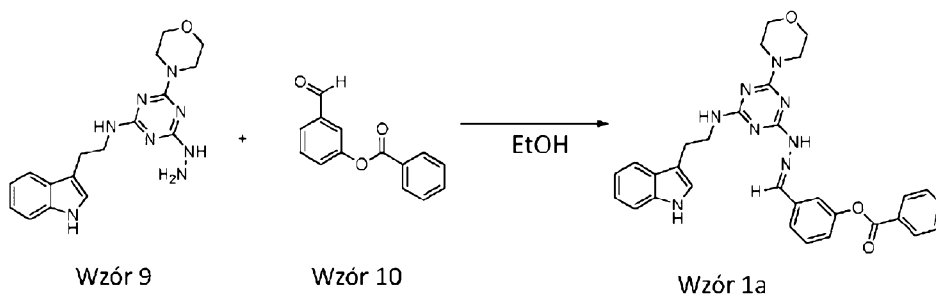
Schemat II

W trzecim etapie 1,58 g (4,40 mmol) produktu przejściowego 7, zawieszono w 30 mL chlorku metylenu (DCM), następnie dodano w jednej porcji 88 mL (17,6 mmol) wodzianu hydrazyny i powstałą mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika na mieszadle magnetycznym z szybkością mieszania 700 obrotów/min przez 15 godzin. Po zakończeniu reakcji, utworzony biały osad odsączono na lejku Schotta pod ciśnieniem korzystając z pompki wodnej, a przesącz przeniesiono do rozdzielacza i przemyto trzykrotnie 50 mL wody destylowanej. Otrzymaną w ten sposób warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem (VI) magnezu, przefiltrowano a następnie przesącz odparowano przy użyciu wyparki wolnoobrotowej (temperatura 40°C i ciśnienie 600 mbar) w przeciągu 10 minut, otrzymując drugi produkt przejściowy w postaci białego osadu o wzorze 9, w ilości 1,5 g. Przebieg reakcji przedstawiono na schemacie III.



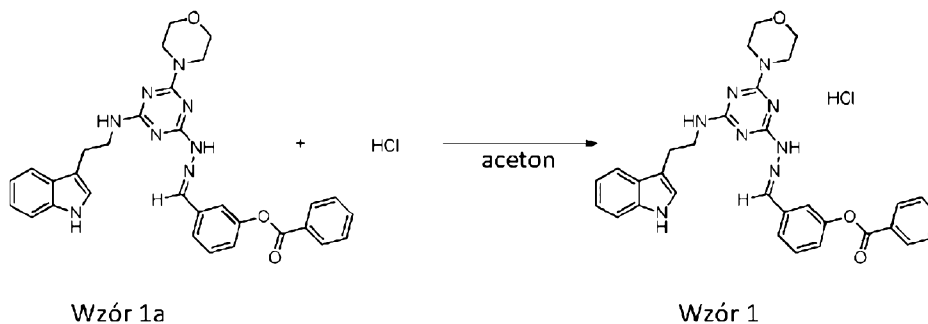
Schemat III

W czwartym etapie 250 mg (0,71 mmol) drugiego produktu przejściowego 9, zawieszono w 20 mL 96% etanolu (EtOH) a następnie dodano 0,16 g (0,71 mmol) estru o wzorze 10. Powstałą mieszaninę zakwaszono dodając 5 kropli 4M HCl w dioksanie i mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 10 godzin w temperaturze z szybkością 700 obrotów/min. Po zakończeniu reakcji wytrącony biały osad z mieszaniny reakcyjnej odsączono na lejku Schotta pod obniżonym ciśnieniem korzystając z pompki wodnej, a następnie przemyto kolejno: wodą (5 mL), acetonem (5 mL) i metanolem (5 mL) i finalnie wysuszono na powietrzu, uzyskując drugi półprodukt o wzorze 1a w ilości 320 g. Przebieg reakcji przedstawiono na schemacie IV.



Schemat IV

W ostatnim etapie 320 mg (0,57 mmol) drugiego półproduktu, zasady o wzorze 1a, zawieszono w 20 mL acetonu i dodano 4M HCl w dioksanie do uzyskania pH 2–3 (w trakcie dodawania kwasu, obserwowano rozpuszczanie się osadu). Po upływie 5 minut, zaobserwowano ponowne tworzenie się białego osadu, który wytrącono 5 dodając 60 mL zimnego eteru dietylowego i odsączono, otrzymując w ten sposób 300 mg produktu finalnego w postaci chlorowodoru benzoesu (E)-3-((2-(4-((2-(1H-indo-3-ilo)etylo)amino)-6-morfolino-1,3,5-triaz-2-yl)hydrazono)metylo)fenylu o wzorze 1. Przebieg reakcji przedstawiono na schemacie V.



Schemat V

Wyniki analiz potwierdzających strukturę chemiczną

Związek o wzorze 1 scharakteryzowano wykonując: spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (protonowa – ^1H NMR oraz węglowa – ^{13}C NMR), analizę chromatograficzną połączoną ze spektroskopią mas (HPLC-MS), chromatografię cienkowarstwową (TLC) oraz pomiar temperatury topnienia.

Magnetyczny rezonans jądrowy

Widmo protonowe magnetycznego rezonansu jądrowego przedstawiono na Fig. 1.

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.21 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 8.15 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.77 – 7.67 (m, 2H), 7.63 – 7.54 (m, 4H), 7.39 – 7.31 (m, 2H), 7.13 – 7.07 (m, 2H), 7.01 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 3.83 (td, J = 11.3, 4.7 Hz, 6H), 3.73 – 3.66 (m, 4H), 3.09 (t, J = 6.6 Hz, 2H).

Widmo węglowe magnetycznego rezonansu jądrowego przedstawiono na Fig. 2.

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 165.10, 161.48, 154.56, 154.22, 151.55, 147.12, 136.88, 134.94, 133.72, 129.78, 129.70, 129.10, 128.51, 127.25, 125.65, 5 124.20, 122.53, 121.10, 119.79, 118.32, 117.66, 110.99, 66.09, 66.02, 44.32, 41.04, 24.59.

Analiza HPLC – MS (analiza chromatograficzna ze spektroskopią mas) – chromatogram oraz widmo masowe przedstawiono na Fig. 3.

HPLC: czystość = 100%, czas retencji = 7,37 min, m/z = 563,22 $[\text{M}+\text{H}]$

Chromatografia cienkowarstwową – TLC

TLC: R_f = 0,40 (układ eluentów chloroform: metanol 9 : 1 v/v)

Temperatura topnienia (wyznaczona na aparacie Boetius)

T_t = 192–195°C

Masa molowa soli: 599.08 g/mol

Wzór sumaryczny soli: $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{ClN}_8\text{O}_3$

Wykonane analizy pozwalają na jednoznaczne potwierdzenie, iż otrzymano nowy produkt w postaci chlorowodorek benzoesu (E)-3-((2-(4-((2-(1H-indo-3-ilo)etylo)amino)-6-morfolino-1,3,5-triaz-2-yl)hydrazono)metylo)fenylu opisany wzorem 1, będący nową pochodną tryptamino-1,3,5-triazyny.

Hodowla linii komórkowych

W hodowli wykorzystano linie komórkowe SW480 i SW620 oraz CCD841 zakupione od American Type Culture Collection (ATCC) i hodowane wg zaleceń ATCC. Hodowla dla każdej z linii komórkowych oraz ich pasaż 2 razy w tygodniu, z subkultywacją w stosunku 1 : 3 prowadzona została według standardowych schematów prezentowanych w książce Davis, J. M. (2011). „Basic techniques and media, the maintenance of cells lines, and safety. Animal cell culture. Chichester: Wiley-Blackwell, 91-125.” Linie SW480 i SW620 hodowano, zgodnie ze standardami, w DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) z gentamycyną (50 $\mu\text{M}/\text{mL}$) w kolbach o powierzchni 75 cm^2 , a linia CCD841 w EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) z gentamycyną (50 $\mu\text{M}/\text{mL}$) w kolbach hodowlanych o powierzchni 75 cm^2 . Linie hodowano w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO_2 .

Ocena potencjału antyproliferacyjnego

Ocenę potencjału antyproliferacyjnego, nowej pochodnej tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1, względem komórek nowotworowych jelita grubego, przeprowadzono z zastosowaniem testu MTS, na liniach komórkowych SW480 oraz SW620. Jako próbę odniesienia użyto linii komórkową prawidłowego nabłonka jelita grubego CCD841. Dodatkowo przeprowadzono oznaczenie zdolności hamowania produkcji FOXM1 w teście ELISA.

Do testu proliferacji MTS i testu ELISA, przygotowano naważkę 7 mg nowej pochodnej tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1, którą rozpuszczono w 116,8 μL DMSO (dimetylosulfotlenek) uzyskując stężenie 0,1 M/L (roztwór wyjściowy). Następnie stosując medium hodowlane DMEM z 10% (v/v) dodatkiem FBS – płodowa surowica bydlęca (do 9 mL DMEM dodano 1 mL FBS), utworzono szereg stężeń nowej pochodnej tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1: 200 $\mu\text{M/L}$, 100 $\mu\text{M/L}$, 50 $\mu\text{M/L}$, 25 $\mu\text{M/L}$, 12,5 $\mu\text{M/L}$, 6,25 $\mu\text{M/L}$, co przedstawiono poniżej w Tabeli 1.

Użyte stężenie próbki	0,1 M/L	200 $\mu\text{M/L}$	100 $\mu\text{M/L}$	50 $\mu\text{M/L}$	25 $\mu\text{M/L}$	12,5 $\mu\text{M/L}$
Dodana objętość próbki	4 μL	1000 μL	1000 μL	1000 μL	1000 μL	1000 μL
Objętość DMEM z 10% FBS	1996 μL	1000 μL	1000 μL	1000 μL	1000 μL	1000 μL
Uzyskane stężenie związku o wzorze 1	200 $\mu\text{M/L}$	100 $\mu\text{M/L}$	50 $\mu\text{M/L}$	25 $\mu\text{M/L}$	12,5 $\mu\text{M/L}$	6,25 $\mu\text{M/L}$

Test proliferacji MTS

Test MTS jest to kolorymetryczna metoda określania liczby żywych komórek w testach proliferacji i cytotoksyczności. W tym teście reagent zawiera związek tetrazoliowy [3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-5-(3-karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2H-tetrazol], który to związek redukowany jest przez żywe komórki do barwnego formazanu, rozpuszczalnego w pożywce do hodowli komórkowej. Poziom proliferacji komórek jest wprost proporcjonalna do ilości wytwarzanego formazanu, a tym samym zmiany barwy ocenianej kolorymetrycznie przy długości fali 490 nm.

Wykonanie testu proliferacji MTS z użyciem testu dostępnego na rynku (tu CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega). Na płaskodenną płytkę o objętości roboczej dołków 200 μL , wysiano po 10^4 komórek w objętości 50 μL medium hodowlanego na jeden dołek, do 24 dołków na każdą linię i płytkę umieszczono na 1 godzinę w cieplarni. Następnie do dołków dodawano po 50 μL roztworu nowej pochodnej tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1, o stężeniach zgodnych z Tabelą 1. Każde ze stężeń dodawano do 3 dołków dla badanej linii komórek. Dla linii SW480 i CCD841 zastosowano stężenia 100 $\mu\text{M/L}$, 50 $\mu\text{M/L}$, 25 $\mu\text{M/L}$, 12,5 $\mu\text{M/L}$, 6,25 $\mu\text{M/L}$, uzyskując tym samym w dołkach stężenia nowej pochodnej tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1: 50 $\mu\text{M/L}$, 25 $\mu\text{M/L}$, 12,5 $\mu\text{M/L}$, 6,25 $\mu\text{M/L}$ i 3,125 $\mu\text{M/L}$, a dla linii SW620 stężenia 200 $\mu\text{M/L}$, 100 $\mu\text{M/L}$, 50 $\mu\text{M/L}$, 25 $\mu\text{M/L}$, 12,5 $\mu\text{M/L}$ uzyskując w dołkach stężenia nowej pochodnej tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1: 100 $\mu\text{M/L}$, 50 $\mu\text{M/L}$, 25 $\mu\text{M/L}$, 12,5 $\mu\text{M/L}$, 6,25 $\mu\text{M/L}$.

Dodatkowo dla każdej linii, do pozostałych 9 dołków dodano, po 50 μL DMEM z 0,2% dodatkiem DMSO do pierwszych 3 dołków, po 50 μL DMEM z 10% dodatkiem FBS do kolejnych 3 dołków oraz po 50 μL roztworu DMEM z 0,1% dodatkiem tryton-X (związek zabijający wszystkie komórki, kontrola) do pozostałych 3 dołków. Tak przygotowane płytki hodowlane umieszczono na 24 h w cieplarni. Po 24 h zgodnie z zaleceniami producenta dodano po 20 μL odczynnika CellTiter 96[®] do każdego dołka, a po 4 godzinach dokonano pomiaru spektrofotometrycznego absorbancji przy długości fali 490 nm.

Komórki inkubowane z DMEM z 10% dodatkiem FBS, przyjęto jako „100% żywotności”. Liczbę żywych komórek z pozostałych grup znormalizowano do kontroli i przedstawiono jako % kontroli. Do analizy uśredniono wyniki z 3 dołków, w których badano dane stężenie. Eksperyment przeprowa-

dzono 4 razy. Obliczono IC_{50} , jest to miara aktywności cytotoksycznej, czyli takie stężenie, które powoduje zahamowanie wzrostu badanej populacji komórek o 50%. Do obliczenia IC_{50} użyto programu GraphPad Prims 8

% proliferacji komórek dla danego stężenia obliczono wg wzoru:

$$\begin{aligned} \% \text{ proliferacji komórek} &= \\ &= \left(\frac{\text{średnia absorbancja komórek dla danego stężenia}}{\text{średnia absorbancja komórek kontrolnych w DMEM}} \right) \times 100\% \end{aligned}$$

Dla linii SW480 uzyskano IC_{50} 12,60 $\mu\text{M/L}$, dla SW620 982,9 $\mu\text{M/L}$, a dla linii CCD841 około 83,20 $\mu\text{M/L}$. Wyniki uzyskane dla linii SW620 i CCD841 świadczą, iż nowa pochodna tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1 nie wpływa na proliferację tych komórek, ale wpływa znacząco na proliferację linii SW480.

Wyniki testu proliferacji MTS przedstawiono na Fig. 4, gdzie na wykresach przedstawiono zależność % proliferacji komórek od stężenia nowej pochodnej tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1.

Oznaczenie zdolności hamowania produkcji FOXM1 dla linii SW480, w teście ELISA

W teście ELISA, przeciwciała swoiście wykrywające antygen (w tym wypadku FOXM1), są unieruchomione na powierzchni płytki. Obecne w materiale białko FOXM1 łączy się z wyżej wspomnianymi przeciwciałami. Następnie dodawane są przeciwciała znakowane enzymatycznie, skierowane ponownie przeciwko FOXM1. Ilość przyłączonego znakowanego enzymatycznie przeciwciała odpowiada ilości wykrytego białka FOXM1 i jest ona mierzona poprzez aktywność enzymatyczną za pomocą substratu, który zmienia kolor po modyfikacji przez enzym, którym znakowane są przeciwciała. Absorpcję światła produktu powstałego po dodaniu substratu mierzy się spektrofotometrycznie i przelicza na wartości liczbowe.

Na płytkę płaskodenną o objętości roboczej dołków 1 mL, do 6 dołków, wysiano po $0,5 \times 10^6$ komórek linii SW480 w objętości 250 μL medium hodowlanego, na każdy dołek, płytkę umieszczono na 1 godzinę w cieplarni. Następnie do 3 dołków dodano po 250 μL nowej pochodnej tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1, o stężeniu 25 $\mu\text{M/L}$, uzyskując tym samym w dołkach końcowe stężenie 12,5 $\mu\text{M/L}$. Stężenie 12,5 $\mu\text{M/L}$ nowej pochodnej tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1 ustalono opierając się na opisanych powyżej wynikach proliferacji komórek linii SW480 w obecności związku badanego, dla którego IC_{50} wynosiło 12,60 $\mu\text{M/L}$. Do 3 kolejnych dołków dodano 250 μL medium hodowlanego. Tak przygotowane płytki hodowlane umieszczono na 24 godziny w cieplarni. Po 24 godzinach oceniono hodowle z użyciem mikroskopu odwróconego, po czym ze wszystkich odebrano supernatant, komórki przepłukano 1 mL PBS (Phosphate-buffered saline – buforowanej fosforanem soli fizjologicznej), dodano 0,5 mL trypsyny i płytkę umieszczono w cieplarni na 10 minut. Po ocenie stopnia odklejenia komórek od powierzchni naczynia, z użyciem mikroskopu odwróconego, zatrzymano reakcję trypsynizacji dodając 10 μL FBS. Komórki zebrano do probówki Eppendorfa i wirowano 5 minut przy 300 xg. Odebrano nadsącz, a pelet komórkowy zawieszono w 250 μL PBS. Próbkę zamrożono w -20°C . W celu uzyskania minimalnej liczby powtórzeń ($n=3$) do przeprowadzenia analizy statystycznej, hodowle z izolacją komórek powtórzono 3 razy.

Przed wykonaniem testu ELISA przeprowadzono lizę komórek z użyciem sonifikatora, 3 razy po 1 minucie. Test ELISA wykonano z użyciem kitu Forkhead FOX Protein M1 (FOXM1) (Abbexa, United Kingdom) wg protokołu producenta.

Na płytkę dostarczoną w zestawie naniesiono pipetą po 100 μL standardów do 3 kolejnych dołków oraz lizatu komórkowego po hodowli z badaną substancją czynną, pochodną tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1, do 3 kolejnych dołków, oraz jako kontroli, lizatu komórek po hodowli w medium hodowlanym również do 3 kolejnych dołków. Płytkę inkubowano przez 1 godzinę w 37°C . Dodano 100 μL Detection Reagent A do każdego dołka. Inkubowano przez 1 godzinę w 37°C .

Przepłukano płytkę 3 razy za pomocą Wash Buffer dołączonego do zestawu. Dodano 100 μL Detection Reagent B do każdego dołka. Inkubowano przez 1,5 godziny w 37°C . Przepłukano płytkę 5 razy za pomocą Wash Buffer. Dodano 90 μL roztworu substratu TMB. Inkubowano 15 minut w 37°C . Zmierzone O.D. – gęstość optyczną przy długości fali 450 nm. Z trzech powtórzeń wyciągnięto średnią.

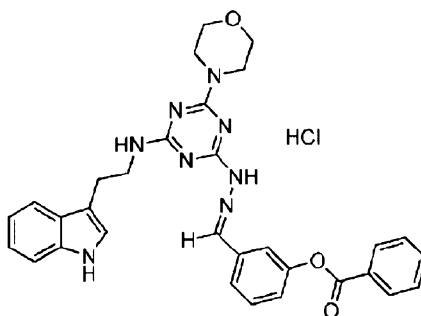
Uśrednione wyniki testu ELISA przedstawiono na Fig. 5, gdzie A to produkcja białka FOXM1 dla linii komórek SW480, a B dla linii SW480 z dodatkiem nowej pochodnej tryptamino-1,3,5-triazyny o wzorze 1. Potwierdza to, że związek o wzorze 1 wykazuje silny potencjał hamujący produkcję białka FOXM1.

Jak potwierdziły przeprowadzone badania, związek o wzorze 1, wykazuje właściwości antyproliferacyjne dla linii raka jelita grubego SW480 pozostając praktycznie obojętny na proliferację zdrowej linii komórkowej nabłonka jelita grubego CCD841. Dodatkowo związek ten wykazuje potencjał hamujący FOXM1.

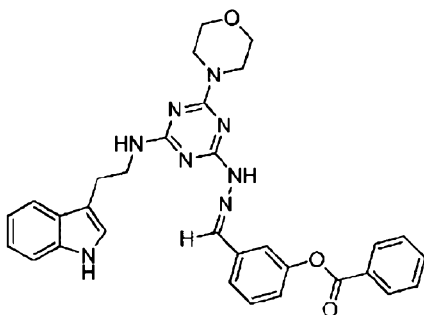
Zastrzeżenia patentowe

1. Nowa pochodna tryptamino-1,3,5-triazyny, którą stanowi chlorowodorek benzoesu (E)-3-((2-(4-((2-(1H-indo-3-ilo)etylo)amino)-6-morfolino-1,3,5-triaz-2-yl)hydrazono)metylo)fenylu o wzorze 1.
2. Nowa pochodna tryptamino-1,3,5-triazyny według zastrzeżenia 1 do zastosowania w leczeniu nowotworu jelita grubego.

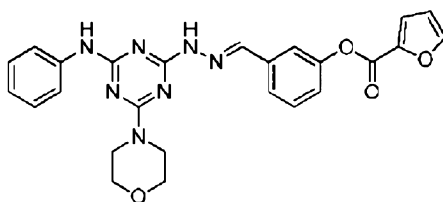
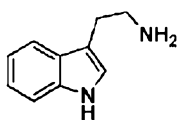
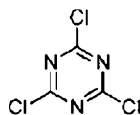
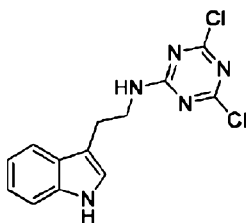
Rysunki

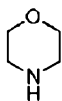
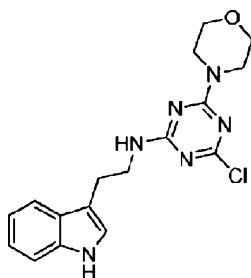
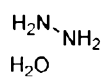
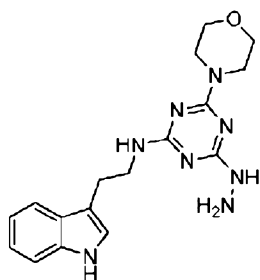
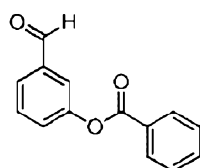


Wzór 1



Wzór 1a

**Wzór 2****Wzór 3****Wzór 4****Wzór 5**

**Wzór 6****Wzór 7****Wzór 8****Wzór 9****Wzór 10**

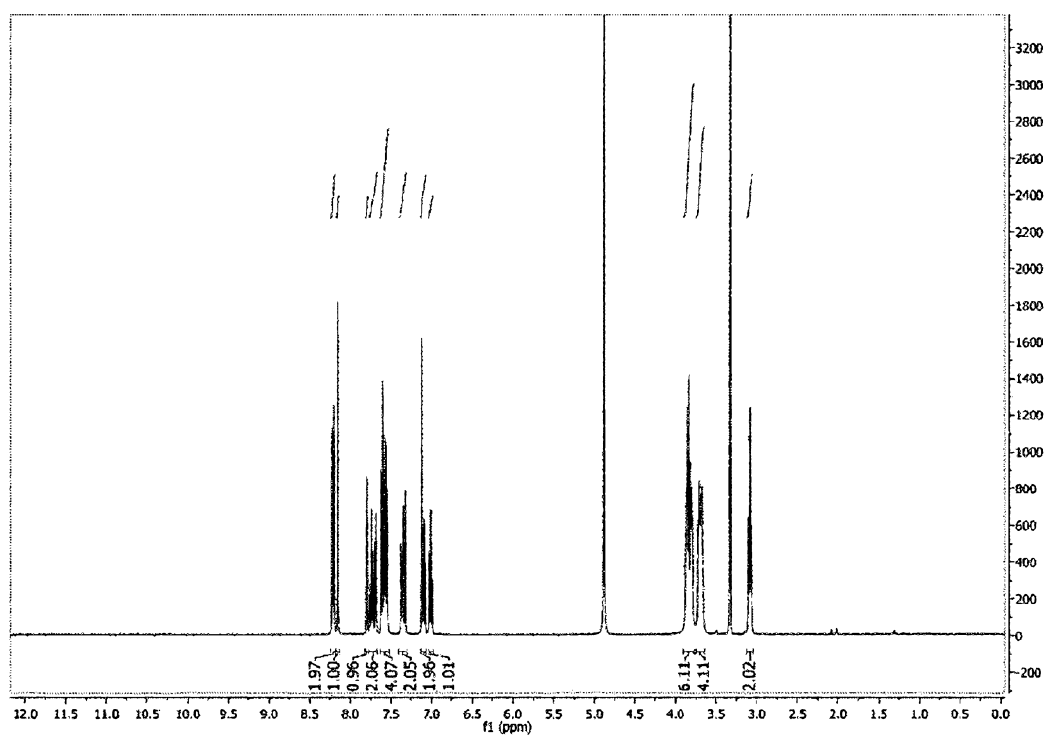


Fig.1

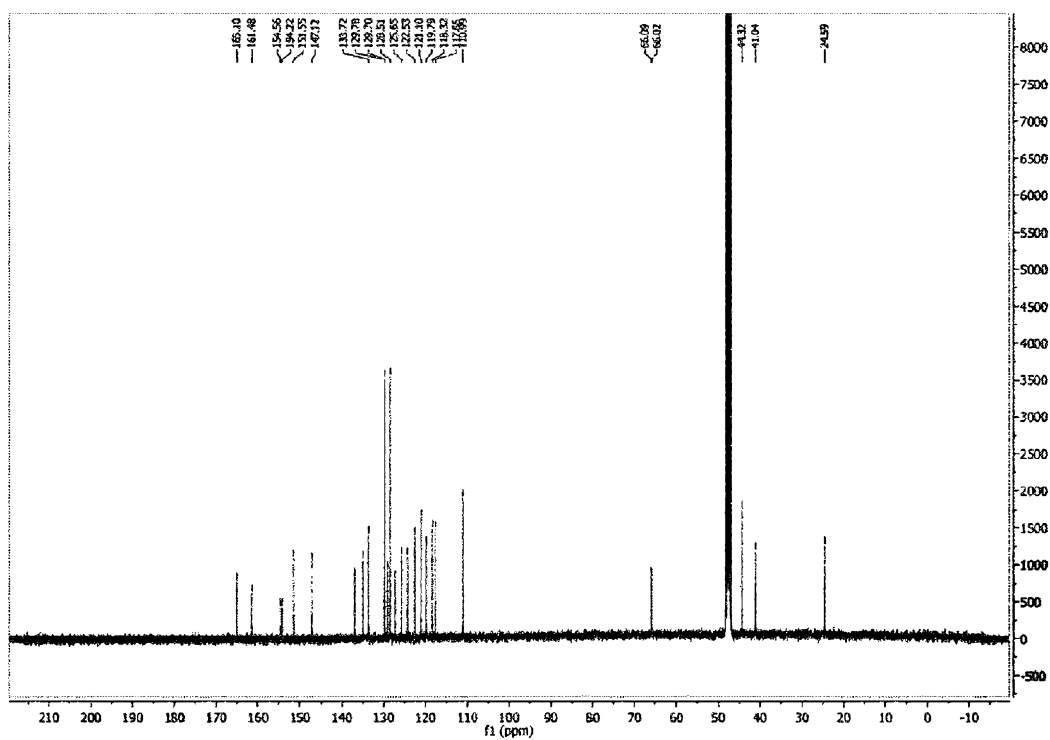


Fig.2

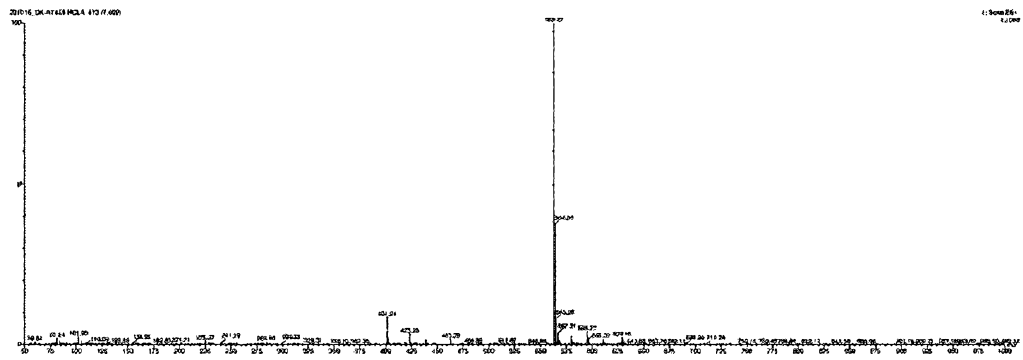
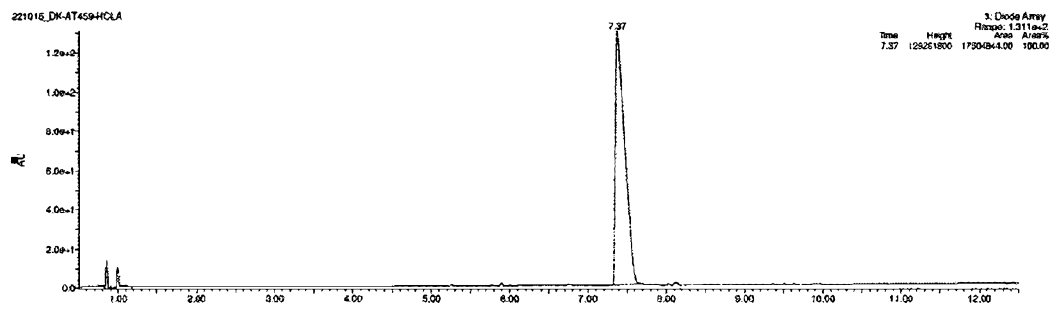


Fig.3

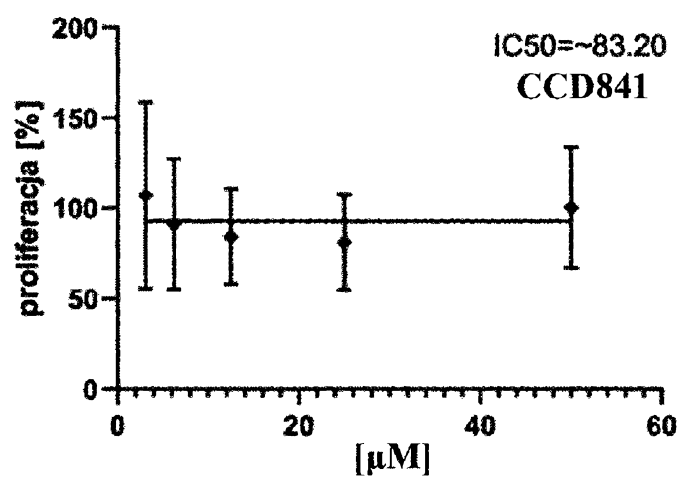
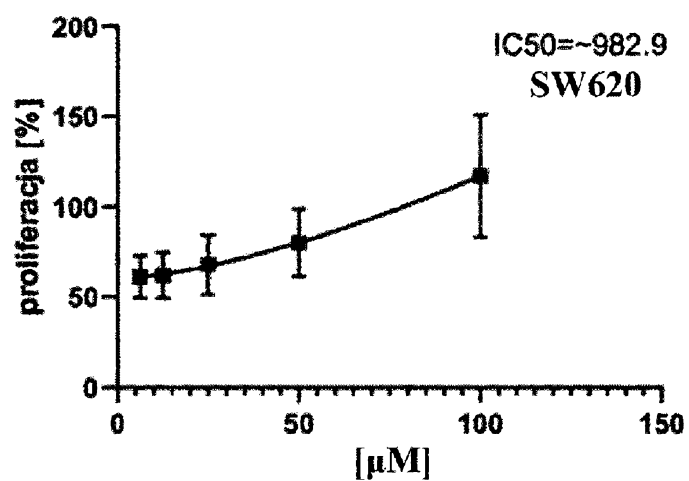
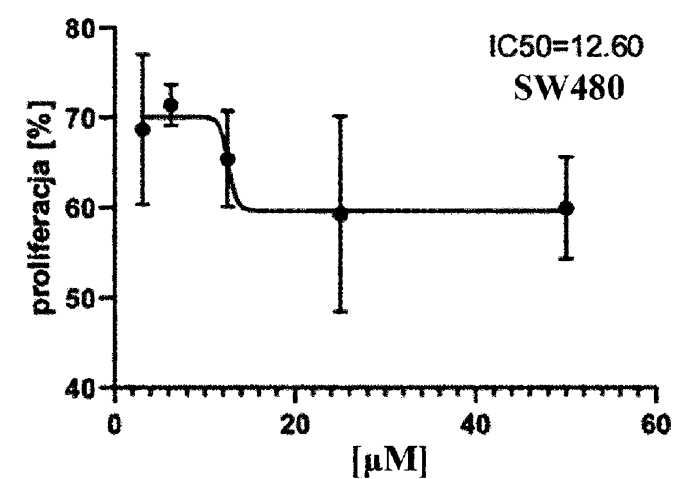


Fig. 4

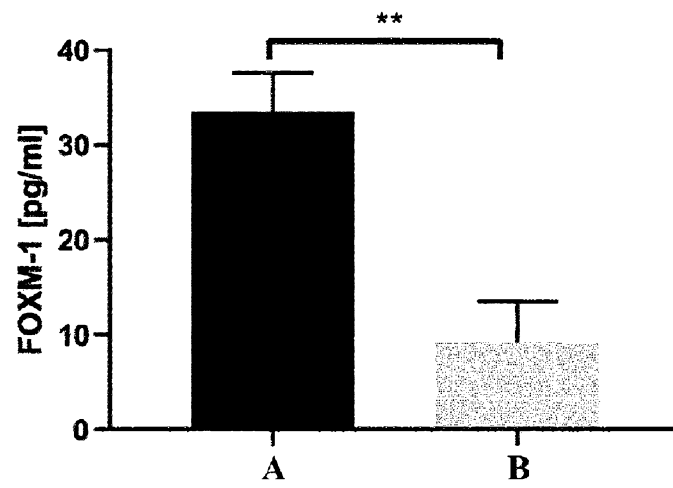


Fig. 5