

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 243572 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438134**

(22) Data zgłoszenia: **2021.06.11**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.12.12 BUP 50/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.09.11 WUP 37/2023**

(51) MKP:

**C07H 15/26** (2006.01)

**C07H 1/00** (2006.01)

**C07D 475/08** (2006.01)

**A61K 31/7052** (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**

**SEBASTIAN MAKUCH, Skrzypne, PL**

**WIESŁAW SZEJA, Gliwice, PL**

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

**MONIKA KRAWCZYK, Olkusz, PL**

**JERZY WIŚNIEWSKI, Wrocław, PL**

**ANDRZEJ GAMIAN, Wrocław, PL**

**PIOTR ZIÓŁKOWSKI, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

**Anna Gdula, Wrocław, PL**

(54) Tytuł:

**Glikokoniugatowa pochodna metotreksatu i glukozy oraz sposób jej otrzymywania i jej zastosowanie w leczeniu i zapobieganiu nowotworom**

**PL 243572 B1**

## Opis wynalazku

Celowane proleki to nowoczesne podejście mające na celu zmniejszenie niepożądanych skutków chemioterapii nowotworowej, spowodowanych neselektywnym działaniem leków na tkanki ludzkie. W szeroko zakrojonych badaniach analogów leków przeciwnowotworowych sprawdzone i powszechnie stosowane w terapii substancje aktywne wiążą się poprzez linker z substancją, ligandem wykazującym powinowactwo do receptorów błonowych, nadekspresjonowanych w komórkach nowotworowych. Jako substancję aktywną wytypowano metotreksat.

Metotreksat (MTX) jest dobrze znanym i szeroko scharakteryzowanym środkiem przeciwnowotworowym, chemicznie odpowiednim do koniugacji z peptydami. Związek ten jest silnym inhibitorem enzymu reduktazy dihydrofolianowej, który odpowiada za recykling 7,8-dihydrofolianu do jego zredukowanej, fizjologicznie aktywnej postaci 6-(R)-tetrahydrofolianu. Chociaż MTX nie wpływa na wszystkie typy nowotworów, ten środek cytotoksyczny jest z powodzeniem stosowany w chemioterapii od ponad 4 dekad. Poszukując silniejszych analogów MTX, wykazano, że w łańcuchu bocznym jego ugrupowania kwasu glutaminowego można dokonać pewnych zmian bez utraty aktywności. Odnotowano również utrzymanie aktywności w pozycji t-karboksylowej jego reszty kwasu glutaminowego. To sprawia, że MTX nadaje się do sprzęgania nawet z dużymi „nośnikami”, takimi jak węglowodany. Te koniugaty mogą zachować aktywność antyfolianów podobną do MTX, a następnie być skierowane do komórek nowotworowych, które mają specyficzne receptory dla części cukrowej koniugatu.

Metotreksat (MTX) jest antymetabolitem kwasu foliowego, który wiąże się z receptorem kwasu foliowego na powierzchni komórek nowotworowych i odgrywa ważną rolę w celowaniu. Jest powszechnie stosowany w leczeniu różnych nowotworów złośliwych. Jest również powszechnie stosowanym lekiem przeciwreumatycznym. MTX ma również wiele wad w zastosowaniu medycznym, które mogą zwiększać toksyczność czynności wątroby i nerek, a ponieważ według mechanizmu działania leku działa on raczej na cytoplazmę komórek nowotworowych niż na jądro, hamuje on DNA komórek nowotworowych poprzez hamowanie reduktazy dihydrofolianowej.

MTX jest obecnie formułowany jako roztwory do iniekcji i tabletki do podawania doustnego. Chociaż jest to zdecydowanie jeden z najskuteczniejszych leków w leczeniu różnych guzów i reumatoidalnego zapalenia stawów, pewne ograniczenia zmniejszają stosowanie MTX. Właściwości farmakokinetyczne MTX są niezadowolające i mogą skutkować niewystarczającą odpowiedzią kliniczną. Biodostępność MTX w małych dawkach jest prawie całkowita, ale w dużych dawkach wynosi 10–20%. Duże ilości podanego MTX są wydalane przez nerki w krótkim czasie, co skutkuje krótkim okresem półtrwania w osoczu wynoszącym 5–8 godzin i niskim stężeniem leku w tkankach docelowych, np. w guzach, stawach objętych stanem zapalnym itp. Ogólnie głównym powodem odstawienia MTX nie jest brak skuteczności, ale jego toksyczność. Częściej występują objawy toksyczności żołądkowo-jelitowej, takie jak zapalenie jamy ustnej, nudności i dolegliwości brzuszne. Chociaż dokładne mechanizmy toksyczności nadal nie są jasne, niektóre skutki uboczne były bezpośrednio związane z zaangażowaniem MTX w szlaki metaboliczne. 7-OH-MTX, główny metabolit MTX, jest słabiej rozpuszczalny w wodzie i po podaniu dużych dawek leku może przyczyniać się do toksycznego działania na nerki. Te skutki uboczne ograniczają maksymalną dawkę, jaką można podać. W związku z rosnącą częstością występowania nowotworów nieustannie poszukuje się skutecznych terapii, w tym modyfikacji leków klasycznych, które pozwoliłyby zmniejszyć ich działania uboczne, jednocześnie zwiększając skuteczność terapeutyczną.

Aby poprawić skuteczność leku, konieczne jest opracowanie ukierunkowanych terapii, które umożliwią zwiększony wychwyty substancji aktywnej przez komórki rakowe w porównaniu z normalnymi komórkami [Srinivasarao M, Low PS. Ligand-Targeted Drug Delivery. Chemical Reviews. 2017; 117(19):12133–64]. W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań w celu przezwyciężenia tych ograniczeń przy użyciu nowych systemów dostarczania leków. Systemy te oferują wiele korzyści, takich jak ulepszone bezpieczeństwo i skuteczność leków, poprawienie biodostępności, przedłużenie działania leku w tkance docelowej oraz poprawa stabilności środków terapeutycznych przed degradacją chemiczną i enzymatyczną.

Właściwości metaboliczne komórek złośliwych różnią się znacznie od właściwości komórek prawidłowych, co zapewnia potencjał ukierunkowanego metabolizmu komórkowego w celu poprawy selektywności leków przeciwnowotworowych. Jedną z strategii ukierunkowanych na różnice metaboliczne komórek nowotworowych, to sprzęganie glukozy z lekiem. Wykorzystuje się zwiększone zapotrzebowanie glukozy przez guzy łitte w porównaniu ze spożyciem przez zdrową tkankę, po raz pierwszy zaobserwowane przez Otto Warburga w pierwszej połowie XX wieku. Aby ułatwić zaspokojenie zwiększonego

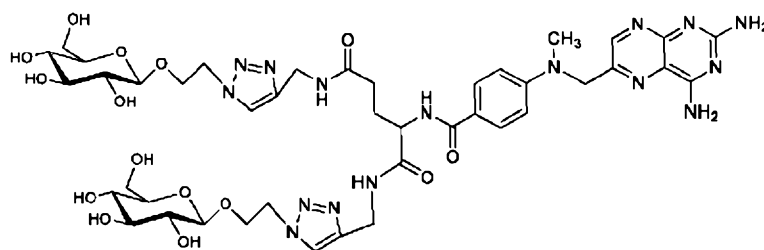
zapotrzebowania na glukozę, w wielu komórkach nowotworowych obserwuje się podwyższony poziom transporterów glukozy (GLUT). Złośliwe komórki wykazują do 12 razy wyższą aktywność GLUT niż normalne komórki. Koniugaty te są zaprojektowane tak, aby były rozpoznawane przez specyficzne receptory GLUT i wchłaniane przez komórki rakowe z większą szybkością niż przez zdrowe komórki [Calvarresi EC, Hergenrother PJ. Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer. Chem Sci. 2013; 4:2319–33].

Glikokoniugaty MTX zostały opracowane w celu poprawy swoistości leku, przewyciężenia lekooporności i przedłużenia jego zatrzymywania się w krwiobiegu. Selektywne celowanie wymaga nie tylko szlaku wychwytu zależnego od nośnika, ale także blokowania innych szlaków, takich jak bierna dyfuzja.

W przypadku metotreksatu strategia syntezy proleku koncentrowała się na opracowaniu metod dostarczania środka terapeutycznego przy użyciu koniugatu polimer-lek. Tak preparowane leki wielcząścietkzowe mają tę zaletę, że zwiększają siłę działania, jednocześnie zmniejszając oporność na terapię i toksyczne działanie obecnych leków przeciwnowotworowych [L. Abdulrahman, O. Bakare, M. Abdulrahman, The Chemical Approach of Methotrexate Targeting Frontiers in Biomedical Sciences Vol. 1, nr 2, 2016, str. 50–73].

W zgłoszeniu P. 426731 przedstawiono glikokoniugatową pochodną metotreksatu i glukozy, w której D-glukoza poprzez linker połączona jest z grupami aminowymi leku. Jednak, proponowana tam pochodna oraz sposób jej otrzymywania nie są pozbawione mankamentów. Wydajność oczekiwanego produktu nie przekraczała kilkunastu procent. Uzyskanie preparatu o wysokiej czystości wymaga prowadzenia kilkakrotnego oczyszczania metodą chromatografii. Otrzymany związek jest bardzo wrażliwy na działanie promieniowania oraz temperaturę, co znacząco wpływa na jego stabilność.

Przedmiotem wynalazku jest związek o wzorze 1 do zastosowania w chemioterapii.



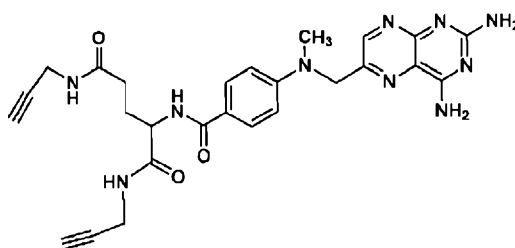
wzór 1

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

Korzystnie, związek do stosowania według wynalazku, otrzymany jest do stosowania w leczeniu i zapobieganiu nowotworom wybranym spośród: raka skóry, raka jelita grubego, raka piersi, raka żołądka, mięsaka i raka płuc.

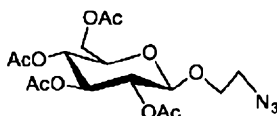
Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania związku o wzorze 1, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

- proceeds with the reaction of methotrexate with N-propargylamine, preferably in the presence of N,N-diisopropylcarbodiimide (DIC) and 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), and then with the reaction mixture the diamide, compound of formula 2:



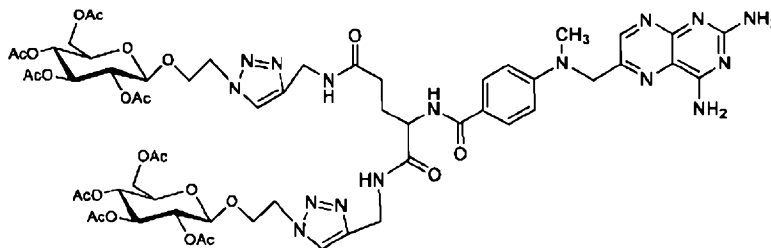
wzór 2

- b) prowadzi się reakcję propargiloamidowej pochodnej metotreksatu o wzorze **2** z azydkiem cukrowym o wzorze **3**:



wzór 3

korzystnie w obecności askorbinianu sodu i siarczanu miedzi, a następnie z mieszaniny reakcyjnej izoluje się związek o wzorze **4**:



wzór 4

- c) prowadzi się reakcję odbezpieczania glikokoniugatu o wzorze **4** w roztworze metanolu sodu w metanolu i izoluje związek o wzorze **1**.

W sposobie według wynalazku korzystnie w etapie a) reakcję prowadzi się w mieszaninie zawierającej metotreksat (MTX), N,N-diizopropylkarbodiimid (DIC), 1-hydroksybenzotriazol (HOBT) i N-propargiloaminę, w stosunku molowym MTX/DIC/HOBT/propargiloamina wynoszącym 1/1,1/0,5/2,2.

W sposobie według wynalazku korzystnie w etapie a) metotreksat rozpuszcza się w mieszaninie DMF i DCM.

W sposobie według wynalazku w etapie a) związek o wzorze **2** izoluje się techniką chromatografii kolumnowej, korzystnie na żelu krzemionkowym stosując jako eluent układ  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  w stosunku objętościowym od 50:1 do 10:1.

W sposobie według wynalazku etapie b) związek o wzorze **4** izoluje się techniką chromatografii kolumnowej, korzystnie na żelu krzemionkowym stosując jako eluent układ  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  w stosunku objętościowym od 20:1 do 5:1.

W sposobie według wynalazku w etapie b) związek o wzorze **2** rozpuszcza się w mieszaninie alkohol izopropylowy/THF o stosunku objętościowym 1/1.

W sposobie według wynalazku w etapie c) glikokoniugat o wzorze **4** rozpuszcza się w alkoholu metylowym.

W sposobie według wynalazku w etapie c) prowadzi się neutralizację mieszaniny reakcyjnej stosując kationit w formie wodorowej.

W sposobie według wynalazku w etapie c) reakcję prowadzi się chroniąc naczynia reakcyjne przed światłem.

Innym przedmiotem wynalazku jest związek o wzorze **2**.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest związek o wzorze **4**.

Zgodnie z wynalazkiem prolek zawiera D-glukozę połączoną poprzez difunkcyjny linker z metotreksatem. Połączenie difunkcyjnego linkera z cukrem i metotreksatem zaplanowano tak, aby po wprowadzeniu proleku do komórki nowotworowej następowało uwolnienie MTX w reakcjach hydrolizy wiązania glikozydowego i amidowego katalizowanej przez enzymy hydrolityczne glikozylohydrolazy i peptydazy. Substrat cukrowy to 3-azydopropilo tetra-O-acetylo- $\beta$ -D-glukozyd. Przejściowy substrat, pochodna metotreksatu to diamid, produkt reakcji N-propargiloaminy z grupami karboksylowymi metotreksatu. Przy planowaniu syntezy glikokoniugatu przyjęto szereg założeń decydujących o efektywności metody. I tak z uwagi na obserwowaną izomeryzację reszty kwasu glutaminowego w reakcjach funkcjonalizacji grup karboksylowych ten etap utworzenia wiązania amidowego zaplanowano w reakcji kondensacji katalizowanej przez karbodiimid w obecności 1-hydroksybenzotriazolu. Łączenie substratów za-

planowano w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydku do terminalnego wiązania potrójnego z utworzeniem triazyny. Końcowym etapem syntezy jest odacylowanie jednostki cukrowej. Konwencjonalna metoda to reakcja alkoholizy katalizowana przez metanolan sodowy w warunkach opisanych przez Zemplena. W dobranych warunkach deprotekcja cukru nie prowadziła do lizy wiązania amidowego. Produkt wydzielono techniką chromatografii kolumnowej.

Przedmiot wynalazku przedstawiono w przykładzie wykonania i na załączonych figurach rysunku, gdzie:

na figurze 1 przedstawiono wpływ Glu-MTX i metotreksatu na przeżywalność komórek SCC-25 (rak skóry),

na figurze 2 przedstawiono wpływ Glu-MTX i metotreksatu na przeżywalność komórek A427 (rak płuca),

na figurze 3 przedstawiono wpływ Glu-MTX i metotreksatu na przeżywalność komórek MCF-7 (rak piersi),

na figurze 4 przedstawiono wpływ Glu-MTX i metotreksatu na przeżywalność komórek MG-63 (mięsak kościopochodny),

na figurze 5 przedstawiono wpływ Glu-MTX i metotreksatu na przeżywalność komórek DLD-1 (rak jelita grubego),

na figurze 6 przedstawiono wpływ Glu-MTX i metotreksatu na przeżywalność zdrowych komórek ludzkich WI38 (fibroblasty),

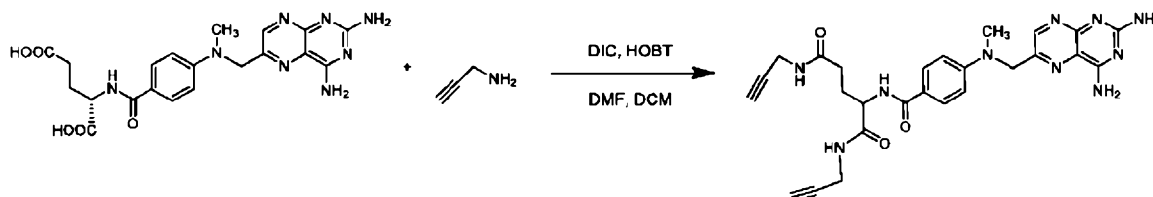
na figurze 7 przedstawiono wyniki analizy MS dla komórek nowotworowych raka piersi MCF-7,

na figurze 8 przedstawiono wyniki analizy MS dla komórek nowotworowych raka płuc A427.

Szczegółowo syntezę proleku przedstawiono na poniższym schemacie.

#### Przykład 1

#### Synteza chemiczna



Sposób otrzymywania proleku metotreksatu składa się z następujących etapów:

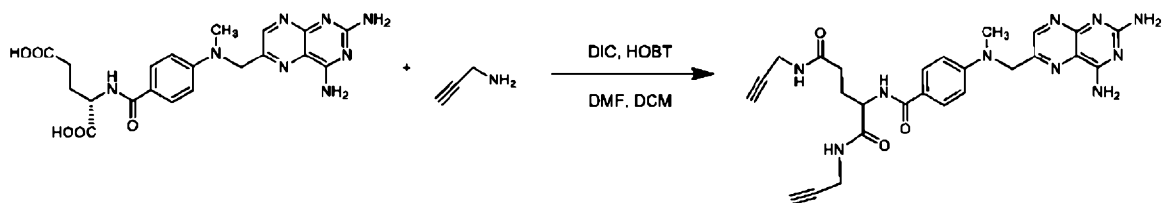
1) synteza amidu- rozpuszczenie MTX w bezwodnym DMF, ogrzewanie w temperaturze od 20°C do 30°C, do rozpuszczenia MTX, dodanie chlorku metylenu do otrzymania nasyconego roztworu MTX, a następnie schłodzenie do temperatury 0°C, dodanie N,N-diizopropylkarbodiimidu (DIC), 1-hydroksybenzotriazolu (HOBT) i propargiloaminy, Stosunek molowy MTX/DIC/HOBT/ amina wynosi 1/1.2/0,5/2,2. Reakcję amidowania prowadzono w temperaturze pokojowej mieszając zawartość naczynia przez 10 dni. Następnie po zateżeniu mieszaniny reakcyjnej wydzielono produkt metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym.

2) synteza glikokoniugatu w 1,3-dipolarnej cykloaddycji: – wydzielony, chromatograficznie czysty diamid rozpuszczono w mieszaninie alkohol izopropylowy/ THF (1/1; v/v). Do uzyskanego roztworu dodano 3-azydopropyl tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozyd i mieszano do uzyskania żółtego roztworu. Następnie dodano wodny roztwór askorbinianu sodowego i wodny roztwór siarczanu miedzi II. Reakcję prowadzono w temp pokojowej przez 24 godziny. Po zakończeniu reakcji (pełne przereagowanie diamidu) odsączono osad, przesącz zateżono, produkt wydzielono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym.

3) metanoliza- odacylowanie uzyskany glikokoniugat rozpuszczono w alkoholu metylowym (5 ml) dodano roztwór metanolanu sodowego w metanolu (1 ml), mieszano w temperaturze pokojowej przez 30 minut, dodano kationit w formie wodorowej do neutralizacji roztworu, odsączono kationit, przemyto metanolem, przesącz zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując koniugat, prolek metotreksatu, chromatograficznie czysty w postaci żółtego osadu.

Opisane reakcje prowadzono chroniąc naczynia reakcyjne przed światłem.

### Etap I: Synteza N-propargiloamidu, pochodnej metotreksatu



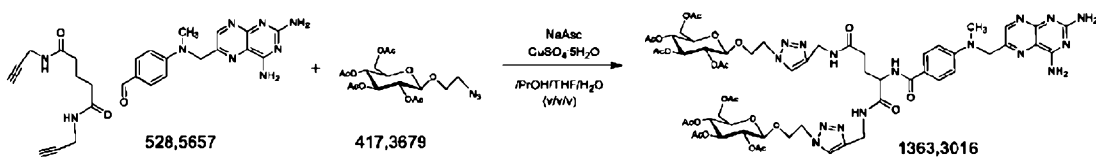
Metotreksat (500 mg, 1.10 mmol) rozpuszczono w bezwodnym DMF (10 mL) i bezwodnym DCM (2 mL). Kolbę zabezpieczono przed światłem i umieszczono w łaźni wodno-lodowej. Do mieszaniny reakcyjnej w temperaturze 0°C wkroplono DIC (210  $\mu$ L, 1.34 mmol), dodano HOBT (77 mg, 0.57 mmol), a następnie propargiloaminę (155  $\mu$ L, 2.42 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 10 dni. Po przerwaniu reakcji zawartość kolby zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (elucja gradientem układu  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3:\text{OH}$ , 50:1 do 10:1), otrzymując żółty osad (407 mg, 70%; t.t.: 105°C,  $\alpha_D^{23} = 16$  (c = 1.0, DMSO)).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.80-2.05 (m, 2H, 2xCH<sub>MTX</sub>), 2.07-2.24 (m, 2H, CH<sub>2MTX</sub>), 3.06 (m, 1H, CH), 3.16 (m, 1H, CH), 3.22 (s, 3H, CH<sub>3MTX</sub>), 3.80-3.85 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 4.33 (m, 1H, CH<sub>MTX</sub>), 4.80 (s, 2H, CH<sub>2MTX</sub>), 6.78-6.85 (m, 4H, 2xH-PH<sub>MTX</sub>, NH<sub>2MTX</sub>), 7.63 (bs, 1H, NH<sub>MTX</sub>), 7.72-7.77 (m, 2H, 2xH-PH<sub>MTX</sub>), 7.85 (bs, 1H, NH<sub>MTX</sub>), 8.09 (m, 1H, NH<sub>MTX</sub>), 8.23-8.31 (m, 2H, 2xNH), 8.58 (s, 1H, H-7<sub>MTX</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  27.36, 27.76, 27.94, 31.77, 38.87, 52.90, 54.82, 72.81, 72.83, 81.13, 81.17, 110.92, 110.99, 121.17, 121.46, 128.90, 128.97, 146.61, 149.06, 150.82, 152.54, 160.82, 162.64, 166.07, 171.38, 171.58.

HRMS (ESI-TOF): obliczono dla C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>10</sub>O<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): m/z 529.2424, oznaczono: m/z 529.2421.

### Etap II: Synteza glikokoniugatu, pochodnej metotreksatu



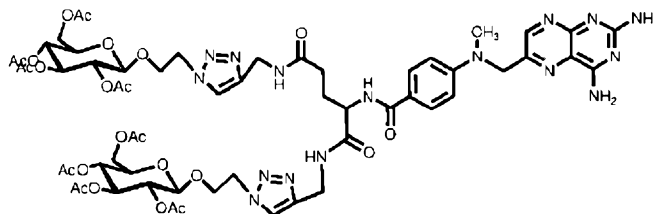
Otrzymaną w poprzednim etapie propargiloamidową pochodną metotreksatu (407 mg, 0.77 mmol) oraz azydek cukrowy (643 mg, 1.54 mmol) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników i-PrOH (6 ml) oraz THF (6 ml). W dwóch fiolkach przygotowano układy katalityczne: askorbinian sodu (123 mg, 0.62 mmol) rozpuszczony w H<sub>2</sub>O (3 ml) i CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (77 mg, 0.31 mmol) rozpuszczony w H<sub>2</sub>O (3 ml), zmieszano je ze sobą i wprowadzono do mieszaniny reakcyjnej. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 h. Po zakończeniu reakcji zawartość kolby zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (elucja gradientem układu  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3:\text{OH}$ , 20:1 do 5:1), otrzymując żółty osad (724 mg, 69%; t.t.: 114°C,  $\alpha_D^{23} -6$  (c = 1.0, DMSO)).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.87-1.91 (m, 2H, 2xCH<sub>MTX</sub>), 1.92, 1.98, 2.01, 2.02 (4s, 24H, 8xCH<sub>3</sub>CO), 2.11-2.24 (m, 2H, CH<sub>2MTX</sub>), 3.21 (s, 3H, CH<sub>3MTX</sub>), 3.84-3.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.97 (ddd, 2H, J = 2.4 Hz, J = 4.9 Hz, J = 9.8 Hz, 2xH-5<sub>glu</sub>), 4.03 (dd, 2H, J = 2.4 Hz, J = 12.3 Hz, 2xH-6a<sub>glu</sub>), 4.05-4.12 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 4.17 (dd, 2H, J = 4.9 Hz, J = 12.3 Hz, 2xH-6b<sub>glu</sub>), 4.22-4.32 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>O), 4.36 (m, 1H, CH<sub>MTX</sub>), 4.42-4.54 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>N), 4.72 (dd~t, 2H, J = 8.2 Hz, J = 9.4 Hz 2xH-2<sub>glu</sub>), 4.79 (s, 2H, CH<sub>2MTX</sub>), 4.82 (d, 2H, J = 8.2 Hz, 2xH-1<sub>glu</sub>), 4.89 (dd~t, 2H, J = 9.4 Hz, J = 9.4 Hz, 2xH-3<sub>glu</sub>), 5.22 (dd~t, 2H, J = 9.4 Hz, J = 9.8 Hz, 2xH-4<sub>glu</sub>), 6.65 (bs, 2H, NH<sub>2MTX</sub>), 6.81 (m, 2H, 2xH-PH<sub>MTX</sub>), 7.74 (m, 2H, NH<sub>2MTX</sub>), 7.78 (m, 2H, 2xH-PH<sub>MTX</sub>), 8.08 (m, 1H, NH<sub>MTX</sub>), 8.26-8.38 (m, 2H, 2xNH), 8.56 (s, 2H, 2xH-5<sub>triaz</sub>), 8.59 (s, 1H, H-7<sub>MTX</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  20.19, 20.22, 20.34, 20.47, 27.55, 31.91, 34.15, 38.89, 49.11, 53.08, 54.83, 61.62, 67.38, 68.08, 70.52, 70.64, 71.91, 99.13, 110.99, 121.21, 121.41, 122.98, 128.96, 144.67, 146.16, 149.10, 150.86, 154.71, 162.55, 162.66, 166.09, 168.95, 169.23, 169.48, 170.02, 171.62, 171.76.

HRMS (ESI-TOF): obliczono dla C<sup>58</sup>H<sup>74</sup>N<sup>16</sup>O<sup>23</sup> ([M+H]<sup>+</sup>): m/z 1363.5191, oznaczono: m/z 1363.5137.

### Etap III: Metanoliza, usuwanie grup acetylowych



Odważoną porcję otrzymanego glikokoniugatu (300 mg, 0.22 mmol) rozpuszczono w metanolu (20 ml), a następnie dodano 1M roztwór metanolanu sodu w metanolu (600 µl, 0.6 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 3 h. Po zakończeniu reakcji zawartość kolby zneutralizowano za pomocą żywicy jonowymiennej Amberlyst-15, którą następnie odsączono, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując odbezpieczony glikokoniugat w postaci żółtego osadu (183 mg, 81%; t.t.: 107–108°C,  $\alpha_D^{23} = 42$  (c = 1.0, DMSO).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.85-2.10 (m, 2H, 2xCH<sub>MTX</sub>), 2.13-2.28 (m, 2H, CH<sub>2MTX</sub>), 3.21 (s, 3H, CH<sub>3MTX</sub>), 2.93-3.01 (m, 2H, 2xH-2<sub>Glu</sub>), 3.03-3.08 (m, 2H, 2xH-4<sub>Glu</sub>), 3.09-3.16 (m, 4H, 2xH-3<sub>Glu</sub>, 2xH-5<sub>Glu</sub>), 3.39-3.49 (m, 2H, 2xH-6a<sub>Glu</sub>), 3.63-3.70 (m, 2H, 2xH-6b<sub>Glu</sub>), 3.83-3.93 (m, 4H, CH<sub>2NH</sub>), 4.01-4.10 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 4.19-4.24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.25-4.32 (m, 4H, 2xH-1<sub>Glu</sub>, 2xCH<sub>2</sub>), 4.38 (m, 1H, CH<sub>MTX</sub>), 4.47-4.56 (m, 4H, 4xOH), 4.78 (s, 2H, CH<sub>2MTX</sub>), 6.60 (bs, 2H, NH<sub>2MTX</sub>), 6.81 (m, 2H, 2xH-PH<sub>MTX</sub>), 7.66 (bs, 2H, NH<sub>2MTX</sub>), 7.74 (m, 2H, 2xH-PH<sub>MTX</sub>), 8.15 (m, 1H, NH<sub>MTX</sub>), 8.32-8.44 (m, 2H, 2xNH), 8.47 (s, 2H, 2xH-5<sub>triaz</sub>), 8.56 (s, 1H, H-7<sub>MTX</sub>).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  30.24, 31.99, 34.21, 34.31, 38.62, 48.31, 49.31, 51.01, 54.55, 60.77, 66.99, 69.71, 73.00, 76.35, 76.73, 102.66, 110.74, 111.70, 120.34, 121.54, 123.25, 128.76, 144.35, 145.70, 148.86, 150.88, 154.88, 162.39, 162.55, 165.58, 171.57, 172.61.

HRMS (ESI-TOF): obliczono dla C<sub>42</sub>H<sub>58</sub>N<sub>16</sub>O<sub>15</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): m/z 1027.4346, oznaczono: m/z 1027.5416.

#### Przykład 2

**Analiza aktywności biologicznej in vitro związku GLU-MTX w porównaniu z wolnym MTX na liniach komórkowych nowotworów litych**

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

Komórki w ilości 5-10 x 10<sup>3</sup> komórek na studzienkę wysiano na płytkę 96-studzienkową. Po 24 godzinach ziano pożywkę hodowlaną i podano po 100 µl 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 72 godzinach inkubacji ziano pożywkę i dodano 100 µl roztworu żółtego rozpuszczalnego bromku 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowego (MTT) w stężeniu 0,5-1 mg/ml. Po 4 godzinach inkubacji, roztwór MTT ziano i podano 50 µl/studzienkę DMSO. Po 3 godzinach gęstość optyczną rozpuszczonego formazanu analizowano kolorymetrycznie w czytniku płytek BioTek. Stężenie DMSO w badanych próbach nie przekroczyło 0,2%.

Ponieważ żywe komórki powodują redukcję MTT do formazanu, 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:

$$X = 100\% \times GO \text{ Z} / GO \text{ K}$$

Podane wyniki stanowią wartość średnią z 3 powtórzeń analizy cytotoksyczności.

Badania oceny przeżywalności za pomocą testu MTT na liniach komórkowych licznych nowotworów, w tym: raka piersi, jelita grubego, płuc, skóry oraz mięsaka kości wykazały, że związek Glu-MTX działa cytotoksycznie in vitro. **Na Figurach 1–6** oraz w Tabeli 1 pokazano porównawcze wyniki badania oceny przeżywalności (IC<sub>50</sub>) dla różnych linii komórek nowotworowych oraz zdrowych fibroblastów, na które oddziaływało samym metotreksatem lub pochodną według wynalazku glukoza-metotreksat (związek o wzorze 1). Działanie cytotoksyczne koniugatu metotreksatu z glukozą jest zbliżone do działania niezmodyfikowanego metotreksatu. W badaniu zastosowano: GLU-MTX 10 µM, Metotreksat 10 µM; inkubacja 72 godzin; analiza MTT.

Tabela 1

Związek	Wartości IC50 ( $\mu\text{M}$ ) poszczególnych linii komórkowych						
	MCF-7 (pierś)	DLD-1 (jclito grube)	SCC25 (skóra)	A427 (płuco)	MG-63 (mięsak kości)	SW480 (jclito grube)	WI38 (zdrowc fibroblasty)
GLU- MTX	16,24±0,2 2	9,81±0,32	71,42±2,1 2	7,35±0,0 6	79,15±0,44	6,8±0,36	52,15±1,22
MTX	9,61±0,12	6,85±0,21	80,64±1,8 7	6,02±0,3 2	60,97±0,76	4,82±0,3 1	16,88±1,94

### Analiza MS

Komórki w ilości  $2,5 \times 10^5$  komórek/studzienkę wysiano na płytkę 6-studzienkową w 1 ml/studzienkę. Kiedy komórki osiągnęły 80% konfluencji, ziano pożywkę hodowlaną i podano odpowiednio po 1 ml na studzienkę świeżej pożywki do studzienek kontrolnych lub 1ml na studzienkę badaną pożywki z metotreksatem w stężeniu  $10 \mu\text{M}$  lub pochodną metotreksatu w stężeniu  $10 \mu\text{M}$ . Płytkę owinięto folią i inkubowano 2 godziny w inkubatorze. Po tym czasie ziano pożywkę, każdą studzienkę płukano  $2 \times 1$  ml PBS o temperaturze pokojowej. Następnie, płytkę ułożono na lodzie i do każdej studzienki podano 500  $\mu\text{l}$  mieszaniny 3:1 metanolu i ultraczystej wody o temperaturze  $-20^\circ\text{C}$ . W każdej studzienke kilkakrotnie pipetowano mieszaninę i pobrano ją do probówki. Następnie procedurę powtórzono i przygotowane próbki (każda o objętości 1 ml) włożono do zamrażarki niskotemperaturowej  $-80^\circ\text{C}$ . 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 7** można zauważyć, że pole powierzchni dla MTX w komórkach nowotworowych MCF7 rosnących z MTX wynosi około 308 jednostek, a w przypadku zastosowania związku według wynalazku (określonego na fig. 7 jako 77\_1) – 525, czyli jest około 1,7 razy mniejsze niż w przypadku koniugatu. Na **figurze 8** analogicznie dla komórek A427, pole powierzchni dla MTX jest 1,7 razy mniejsze w porównaniu do pola powierzchni koniugatu. Komórki nowotworowe, ze względu na nadekspresję transportera GLUT-1, efektywniej akumulują wewnątrzkomórkowe koniugat metotreksatu z glukozą (GLU-MTX) po 2 godzinach, w porównaniu do wolnego metotreksatu.

### Przykład 3

#### Ocena in vivo profilu farmakokinetycznego koniugatu według wynalazku

Zbadano profil farmakokinetyczny będącej przedmiotem wynalazku pochodnej glukozowej metotreksatu (GMTX; wzór chemiczny:  $\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{N}_{16}\text{O}_{15}$ ), w stosunku do profilu klasycznej formy tego leku (MTX), po jednokrotnym podaniu dożylnym do żyły ogonowej. Podawane zwierzętom roztwory przygotowywano w dniu podania.

GMTX miał postać proszku o barwie pomarańczowej, nie posiadał zapachu. Związek przechowywano w temperaturze  $4-8^\circ\text{C}$  w zamkniętym oryginalnym opakowaniu.

GMTX podawano myszom dożylnie do żyły ogonowej, w dawce jednorazowej, w postaci roztworów (o stężeniach zapewniających podanie zwierzętom właściwych dawek) przygotowanych w 5%

DMSO i soli fizjologicznej w stosunku 1:20, w objętości nieprzekraczającej 0,2 cm<sup>3</sup>/mysz. Nośnik materiału badanego stanowił roztwór chlorku sodu do wstrzykiwać z dodatkiem DMSO (stosunek DMSO i soli fizjologicznej wynosił 1:20 – 5% DMSO).

Metotreksat (wzór chemiczny: C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub>; Nr CAS: 59-05-2) użyty w badaniu pochodził z firmy EBEWE Pharma Ges.m.b.H.Nfg. (Methotrexat-Ebewe, 100 mg/cm<sup>3</sup>), był w postaci koncentratu do sporządzania roztworu do infuzji.

Badanie przeprowadzono na 40 dojrzałych płciowo – nie młodszych niż 8 tygodni, ale nie starszych niż 12 tygodni, samcach myszy domowej (*Mus musculus*; szczep wsobny BALB/ccmdb) o masie ciała 18,05–20,80 g (różniące się nie więcej niż ± 20%). Zwierzęta doświadczalne pochodziły z hodowli Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, z Centrum Medycyny Doświadczalnej.

Wyboru zwierząt do badania dokonano na drodze doboru losowego w barierze hodowlanej. Przed przeniesieniem myszy z bariery hodowlanej do bariery eksperymentalnej lekarz weterynarii przeprowadził ocenę stanu zdrowia zwierząt w barierze hodowlanej celem ich kwalifikacji do eksperymentu. Myszy poddano 5-dniowej aklimatyzacji przed podaniem materiału badanego. W trakcie eksperymentu zwierzęta utrzymywano w statusie pozbawionym specyficznych patogenów (SPF; ang. specific pathogen free), w systemie indywidualnie wentylowanych klatek (IVC; model 1284 i 1285 firmy Tecniplast S.p.A, Włochy). Sprzęt i materiały wykorzystywane w badaniu poddano myciu oraz sterylizacji. Zwierzęta doświadczalne przez cały okres eksperymentu żywiono sterylną (dezynfekowaną nadtlenkiem wodoru) paszą bytową dla myszy (ssniff Spezialdiäten GmbH) i sterylną wodą pitną wolnymi od zanieczyszczeń. Myszy miały zapewniony nieograniczony dostęp do paszy i wody.

Myszom podawano drogą dożylną (i.v.) GMTX i MTX oraz pobierano krew (celem uzyskania osocza) w 4 punktach czasowych od iniekcji (po 1 h, 2 h, 4 h i 8 h), jak również w tzw. czasie 0 (pobranie krwi od zwierząt, którym nie podano ani MTX, ani GMTX). Badanie przeprowadzono na 40 samcach myszy szczepu BALB/ccmdb. Szesnastu samcom podano MTX w dawce 32,5 mg/kg m.c. (½ LD<sub>50</sub> MTX dla myszy przy podaniu dożylnym, LD<sub>50</sub> = 65 mg/kg m.c.). Kolejnym 16 samcom podano GMTX w dawce 400 mg/kg m.c. stanowiącej ½ MTD tego związku (wyznaczonej w badaniu własnym o kodzie T425/001/2020), a pozostałym 8 osobnikom nie podano ani MTX w formie klasycznej, ani jego glikokoniuogatu (GMTX). Dwie godziny przed podaniem zwierzętom MTX lub GMTX odstawiono paszę, a po 30 minutach od podania zwierzęta miały ponownie dostęp do paszy.

MTX i GMTX podawano myszom w postaci roztworów przygotowanych do iniekcji odpowiednio o stężeniach 0,783 mg/0,2 cm<sup>3</sup> i 9,04 mg/0,2 cm<sup>3</sup>.

Niezwłocznie po uśpieniu (podanie wziewne izofluranu), po upływie określonych czasów, tj. 0, 1, 2, 4 i 8 h, od każdego zwierzęcia pobrano krew w maksymalnej objętości do próbek z wersenianem dipotasu (K<sub>2</sub>-EDTA). Całkowite skrwawienie spowodowało śmierć zwierzęcia. Krew pełną odwirowano (3000 obrotów przez 15 minut) przy użyciu wirówki 5810R firmy Eppendorf AG (Niemcy) celem uzyskania osocza, które niezwłocznie zamrożono w próbkach typu Eppendorf w -80 ± 5°C.

Próbki osocza rozmrażano w temperaturze 6°C. Do 100 µl osocza dodawano po 10 µl standardu wewnętrznego (IS) o stężeniu 2 µM (koniugat 63/2). Następnie do próbek przeniesiono po 400 µl metanolu (-20°C) i całość wytrząsano przez 5 minut w temperaturze 6°C. W kolejnym etapie próbki wirowano (22000 ref, 4°C, 7 minut), a powstały supernatant przenoszono do polipropylenowych naczynek chromatograficznych i poddawano analizie LC-MS. Krzywa wzorcowa do oznaczeń MTX oraz GMTX została przygotowana w osoczu mysim. Stężenie MTX i GMTX w osoczu myszy oznaczono z wykorzystaniem spektrometru mas (Xevo G2 Q-TOF) sprzęgniętego z chromatografem ciekłym Acquity UPLC (LC-MS) firmy Waters. Pomiar MS prowadzono w trybie podwyższonej czułości (Sensitivity Mode) w polaryzacji dodatniej. W celu zapewnienia wysokiej dokładności pomiaru wartości m/z, zastosowano LockSpray – enkefalinę leucynową o stężeniu 50 pg/cm<sup>3</sup>, która była w sposób ciągły podawana do źródła jonów. Zastosowano następujące parametry pracy źródła jonów spektrometru masowego: Napięcie przyłożone do kapilary (kV) 0,5; Napięcie przyłożone do stożka (V) 15; Temperatura źródła jonów (°C) 125; Temperatura desolvatacji (°C) = 450; Przepływ gazu osłonowego (l/h) 65; Przepływ gazu desolvatacyjnego (l/h) 800.

Wyniki oznaczeń stężenia MTX i GMTX w osoczu myszy poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu komputerowego Statistica 13. Wyniki wyrażono w postaci stężenia średniego (± odchylenie standardowe – SD) w poszczególnych punktach czasowych. Celem oceny zmian stężenia MTX i GMTX w osoczu w czasie do 8 h od podania dożylnego zastosowano nieparametryczny test Kruskala – Wallisa. Różnice uznaje się za znamienne statystycznie przy p < 0,05.

Analiza zmian stężeń MTX i GMTX wykazała, że MTX, jak i unikalna pochodna tego leku i glukozy – glikokoniugat metotreksatu są szybko eliminowane z krążenia ogólnego w ciągu pierwszych 4 h od podania dożylnego.

Ponadto eliminacja GMTX z krążenia ogólnego dwie godziny od podania dożylnego jest szybsza niż eliminacja MTX. Eliminacja GMTX w porównaniu do wolnego MTX po 2 h jest 6.58 razy szybsza. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

**Tabela 2.** Średnie stężenie MTX oraz GMTX w nM po 1, 2, 4, 8 godzinach po podaniu dożylnym w próbkach osocza myszy

MTX 1h	MTX 2h	MTX 4h	MTX 8h	GMTX 1h	GMTX 2h	GMTX 4h	GMTX 8h
1740,6	330	20,7	71,6	20884,7	311,4	62,5	12,2
2164,9	298,7	29,4	20,3	23409,9	1021,4	54,1	69,4
2328,5	222,8	22,6	7,2	29781,6	523,5	55,6	33,5
1672,4	311,4	32,1	23,1	36666,4		39,9	6,8
<b>1976,6</b>	<b>290,725</b>	<b>26,2</b>	<b>30,55</b>	<b>27685,65</b>	<b>618,7667</b>	<b>53,025</b>	<b>30,475</b>
100,00%	14,71%	1,33%	1,55%	100,00%	2,23%	0,19%	0,11%

#### Przykład 4

##### Ocena toksyczności ostrej in vivo koniugatu według wynalazku

W badaniu oceniono toksyczność ostrej glikokoniugatu metotreksatu (GMTX) (jednorazowe podanie dożylnie) z wyznaczeniem maksymalnej dawki tolerowanej (MTD).

Ocenę toksyczności ostrej GMTX przeprowadzono metodą większej – mniejszej dawki według procedury OECD nr 425, która uwzględnia dążenie do poprawy dobrostanu zwierząt i zasadę 3R (ang. Replacement – Zastąpienie, ang. Reduction – Redukcja, ang. Refinement – Udoskonalenie).

GMTX podawano myszom dożylnie do żyły ogonowej, w dawce jednorazowej, w postaci roztworów (o stężeniach zapewniających podanie zwierzętom właściwych dawek) przygotowanych w 5% DMSO w soli fizjologicznej w stosunku 1:20, w objętości nieprzekraczającej 0,2 cm<sup>3</sup>/mysz. Nośnik materiału badanego stanowił roztwór chlorku sodu do wstrzykiwać z dodatkiem DMSO (stosunek DMSO i soli fizjologicznej wynosił 1:20 – 5% DMSO). Materiał badany przechowywano przez okres trwania badania w oryginalnym opakowaniu w temperaturze 4–8°C. Roztwory GMTX, które podawano zwierzętom każdorazowo przygotowywano w dniu podania. Przygotowane roztwory materiału badanego i nośnika, podgrzewano do temp. 35°C bezpośrednio przed podaniem zwierzętom.

Badanie przeprowadzono na 14 dojrzałych płciowo – nie młodszych niż 8 tyg., ale nie starszych niż 12 tygodni, samicach (nierodzących i nieciążarnych) myszy domowej (*Mus musculus*; szczep wsozny BALB/cmdb) o masie ciała 20,60–22,00 g (różniące się nie więcej niż ± 20%). Zwierzęta doświadczalne pochodziły z hodowli Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Zwierzęta kwalifikowano do badania na drodze doboru losowego w barierze hodowlanej. Przed przeniesieniem myszy z bariery hodowlanej do bariery eksperymentalnej lekarz weterynarii dokonał oceny stanu zdrowia zwierząt celem ich kwalifikacji do eksperymentu. Myszy poddano minimum 5-dniowej aklimatyzacji przed rozpoczęciem podawania nośnika lub materiału badanego. W trakcie doświadczenia kontrolowano śmiertelność myszy oraz prowadzono ogólne i szczegółowe obserwacje zwierząt w celu uchwycenia ewentualnych objawów działania toksycznego materiału badanego i nośnika. W doświadczeniu wykorzystano łącznie 14 myszy, w tym 11 zwierząt do oceny toksyczności ostrej GMTX i 3 osobniki do oceny toksykologicznej jego nośnika.

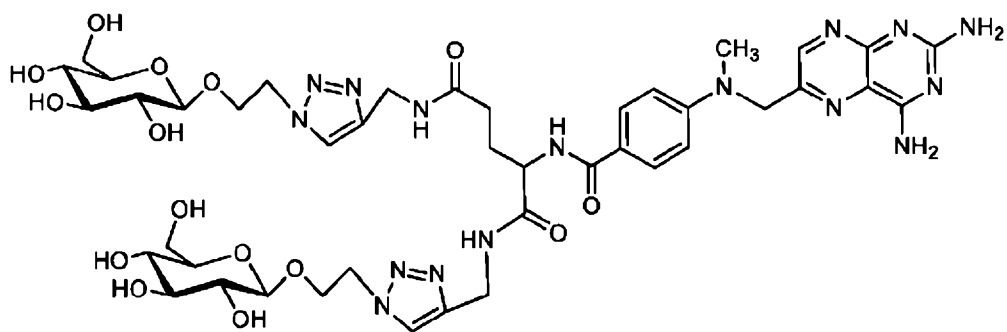
Zastosowano procedurę większej – mniejszej dawki oceny toksyczności ostrej polegającą na podawaniu pojedynczemu zwierzęciu materiału badanego w dawce jednorazowej niższej od oczekiwanej wartości LD<sub>50</sub>. W zależności od efektów uzyskanych po podaniu pierwszej dawki, kolejnemu osobnikowi podawano dawkę powiększoną lub pomniejszoną o stały współczynnik. Postępowanie to kontynuowano do osiągnięcia takiej dawki, której zwiększenie powodowało zgon, a obniżenie skutkowało przeżyciem 3 kolejnych zwierząt. Następnie prowadzono obserwację myszy codziennie przez 14 dni od podania, po czym zwierzęta poddano pełnemu badaniu sekcyjnemu z pobraniem krwi z serca w maksymalnej objętości oraz pobraniem materiału do badań histopatologicznych.

U wszystkich myszy, którym podano materiał badany stwierdzono brak jakichkolwiek objawów toksyczności ostrej w okresie 14 dni od podania 800 mg GMTX/kg m.c. Zatem, MTD glukozowej pochodnej metotreksatu przy jednorazowym podaniu dożylnym jest większa niż 800 mg/kg m.c.

Uwzględniając fakt, iż MTD metotreksatu dla myszy szczepu BALB/c przy podaniu dożylnym wynosi 94 mg/kg m.c. [Moura JA, Valduga CJ, Tavares ER, Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. Int J Nanomedicine. 2011; 6:2285–2295.] w oparciu o wyniki przeprowadzonej oceny toksyczności ostrej dla GMTX, można stwierdzić, że nowa pochodna tego leku i glukozy – glukozowa pochodna metotreksatu charakteryzuje się mniejszą toksycznością ostrą niż klasyczna forma leku, ponieważ maksymalna tolerowana dawka GMTX to 800 mg/kg m.c. Wysoka dawka tolerowana stanowi największą korzyść w przypadku stosowania GMTX, ponieważ diametralnie pozwala zmniejszyć toksyczność ogólną preparatu przy zachowaniu jego działania, a tym samym zmniejszyć śmiertelność wywołaną toksycznością.

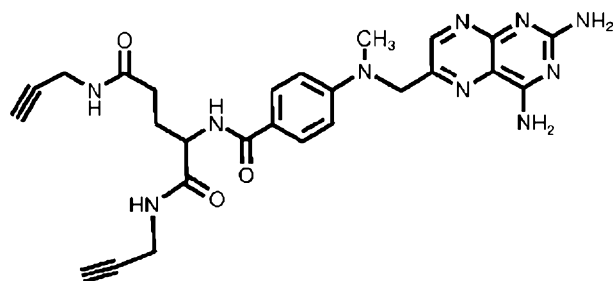
### Zastrzeżenia patentowe

1. Związek o wzorze 1



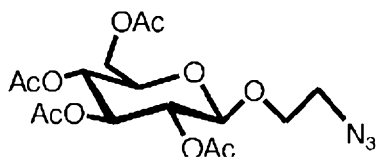
wzór 1

2. Związek o wzorze 1 do stosowania w medycynie.
3. Związek o wzorze 1 do stosowania w leczeniu i zapobieganiu
4. Związek do stosowania według zastrz. 3, **znamienny tym**, że nowotwór jest wybrany spośród: raka skóry, raka jelita grubego, raka piersi, raka żołądka, mięsaka i raka płuc.
5. Sposób otrzymywania związku o wzorze 1, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
  - a) prowadzi się reakcję metotreksatu z N-propargiloaminą, korzystnie w obecności N,N-dizopropylkarbodiimidu (DIC) i 1-hydroksybenzotriazolu (HOBT), a następnie z mieszaniny reakcyjnej izoluje się diamid, związek o wzorze 2:



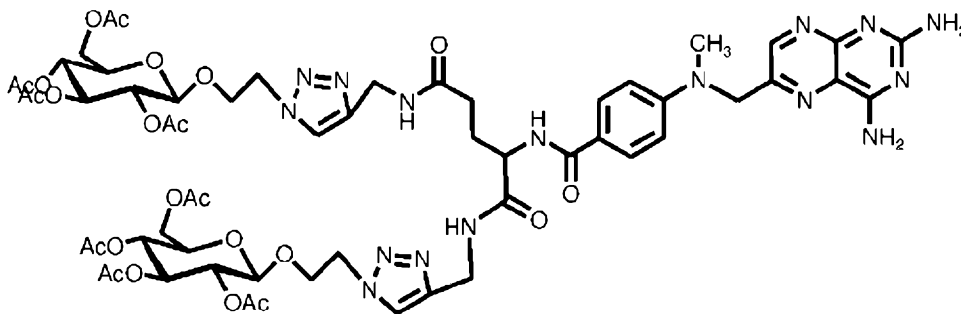
wzór 2

- b) prowadzi się reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydo-alkinowej N-propargiloamidu, pochodnej metotreksatu o wzorze 2 z azydkiem cukrowym o wzorze 3:



wzór 3

korzystnie w obecności askorbinianu sodu i siarczanu miedzi, a następnie z mieszaniny reakcyjnej izoluje się związek o wzorze 4:



wzór 4

- c) prowadzi się reakcję odbezpieczania glikokoniugatu o wzorze 4 w roztworze metanolanu sodu w metanolu i izoluje związek o wzorze 1.
6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie a) reakcję prowadzi się w mieszaninie zawierającej metotreksat (MTX), N,N-diizopropylkarbodiimid (DIC), 1-hydroksybenzotriazol (HOBT) i N-propargiloaminę, w stosunku molowym MTX/DIC/HOBT/propargiloamina wynoszącym 1/1,1/0,5/2,2.
  7. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie a) metotreksat rozpuszcza się w mieszaninie DMF i DCM.
  8. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie a) związek o wzorze 2 izoluje się metodą chromatografii kolumnowej, korzystnie na żelu krzemionkowym stosując jako eluent układ  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  w stosunku objętościowym od 50:1 do 10:1.
  9. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie b) związek o wzorze 4 izoluje się metodą chromatografii kolumnowej, korzystnie na żelu krzemionkowym stosując jako eluent układ  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  w stosunku objętościowym od 20:1 do 5:1
  10. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie b) związek o wzorze 2 rozpuszcza się w mieszaninie alkohol izopropylowy/THF/woda o stosunku objętościowym 1:1:1.
  11. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie c) glikokoniugat o wzorze 4 rozpuszcza się w alkoholu metylowym.
  12. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie c) prowadzi się neutralizację mieszaniny reakcyjnej stosując kationit w formie wodorowej.
  13. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie c) reakcję prowadzi się chroniąc naczynia reakcyjne przed światłem.
  14. Związek o wzorze 2.
  15. Związek o wzorze 4

## Rysunki

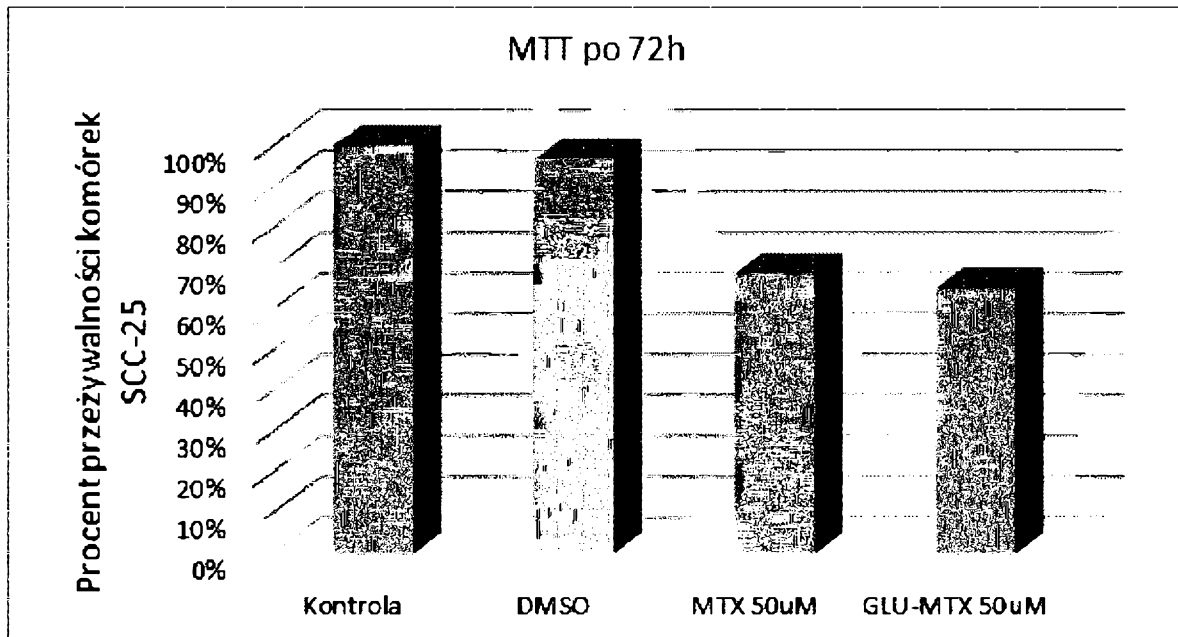


Figura 1

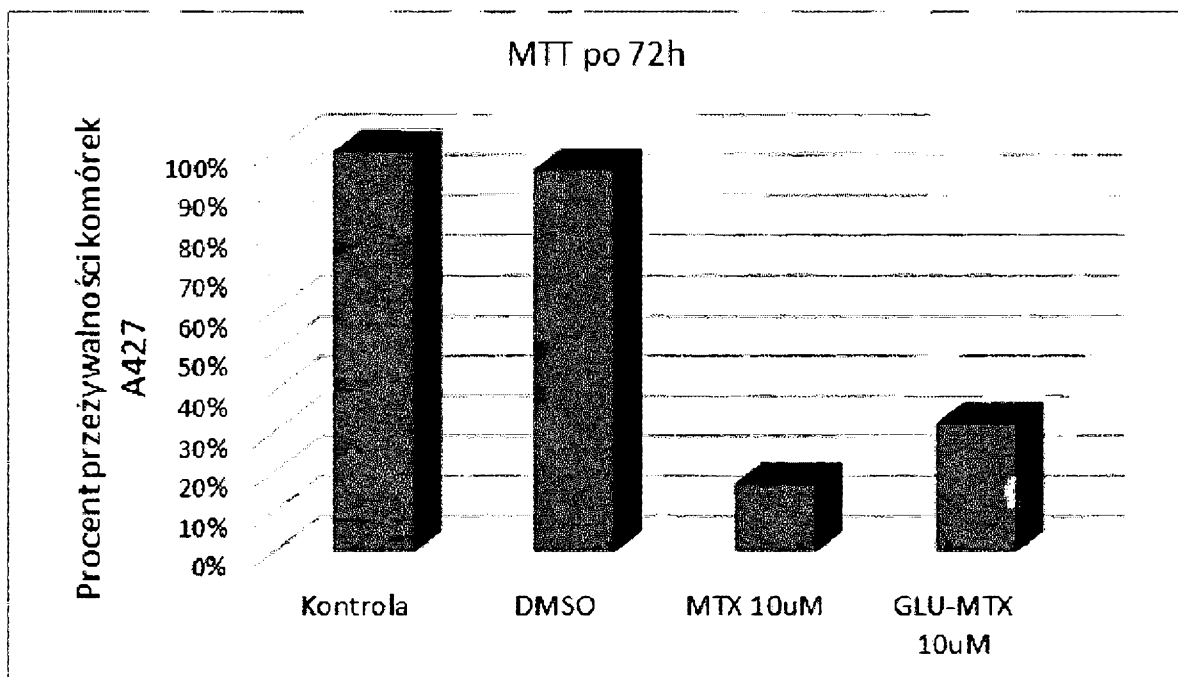


Figura 2

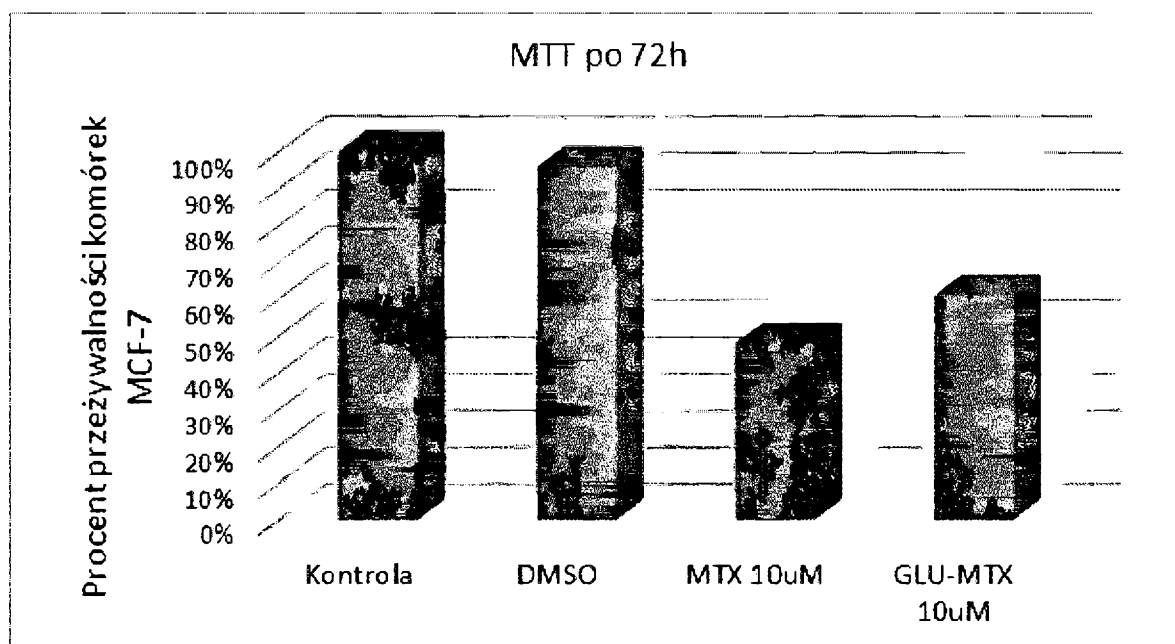


Figura 3

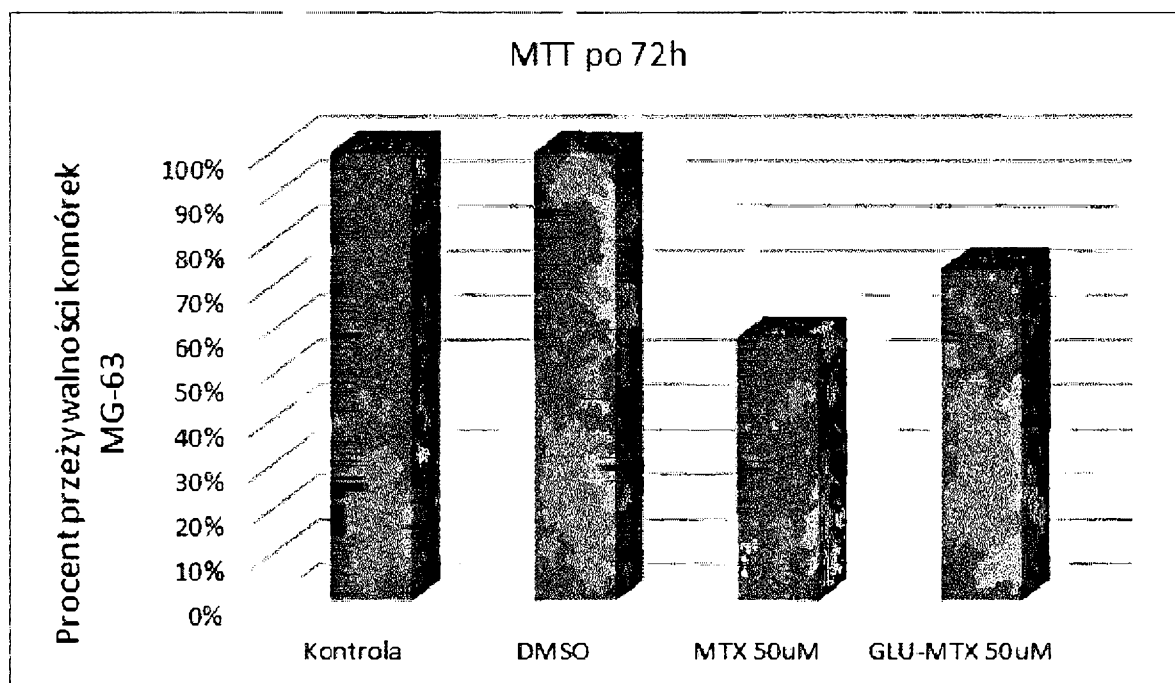


Figura 4

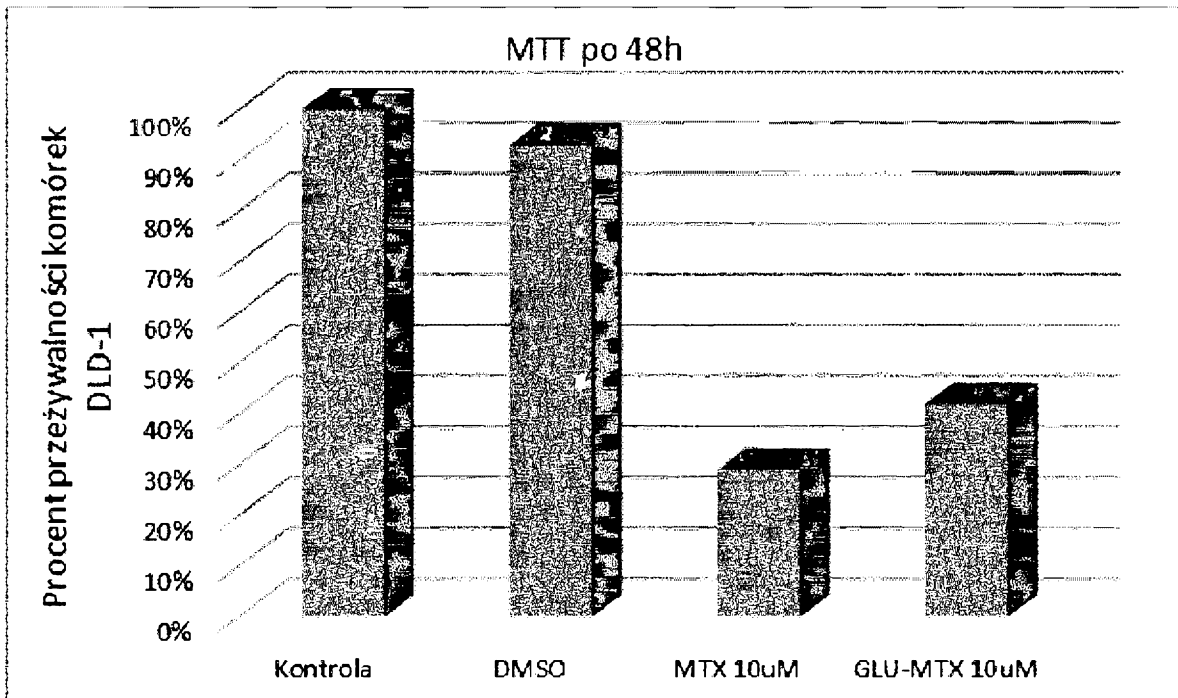


Figura 5

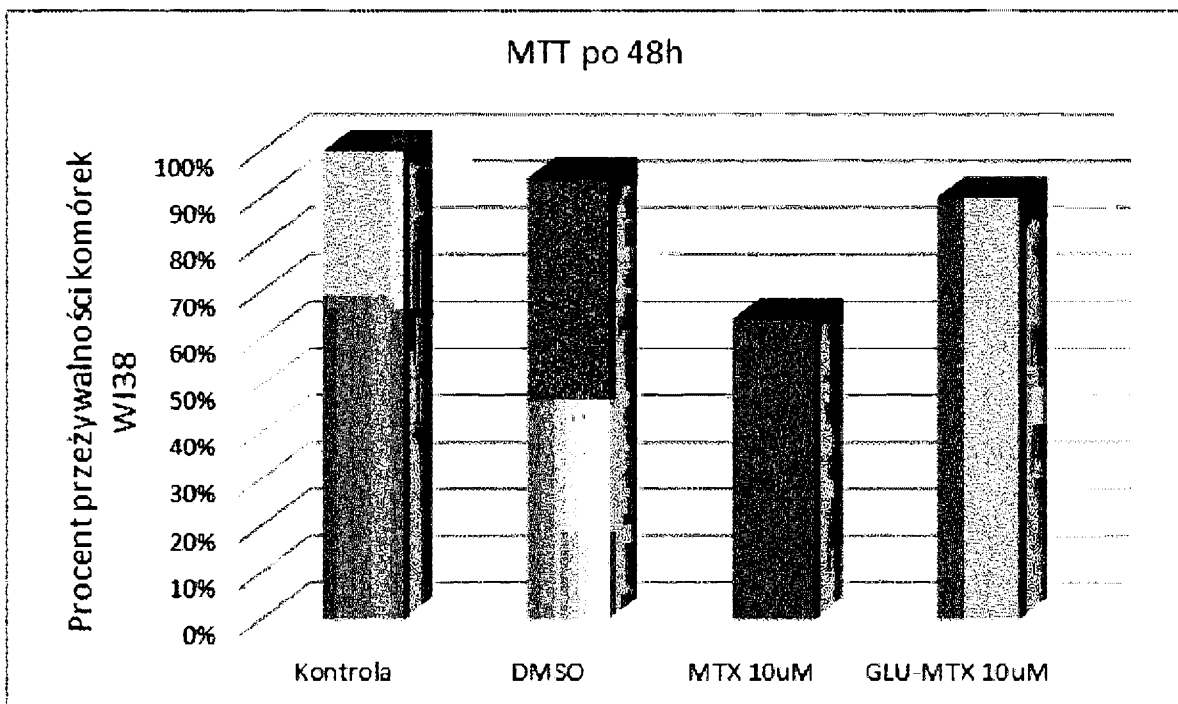


Figura 6

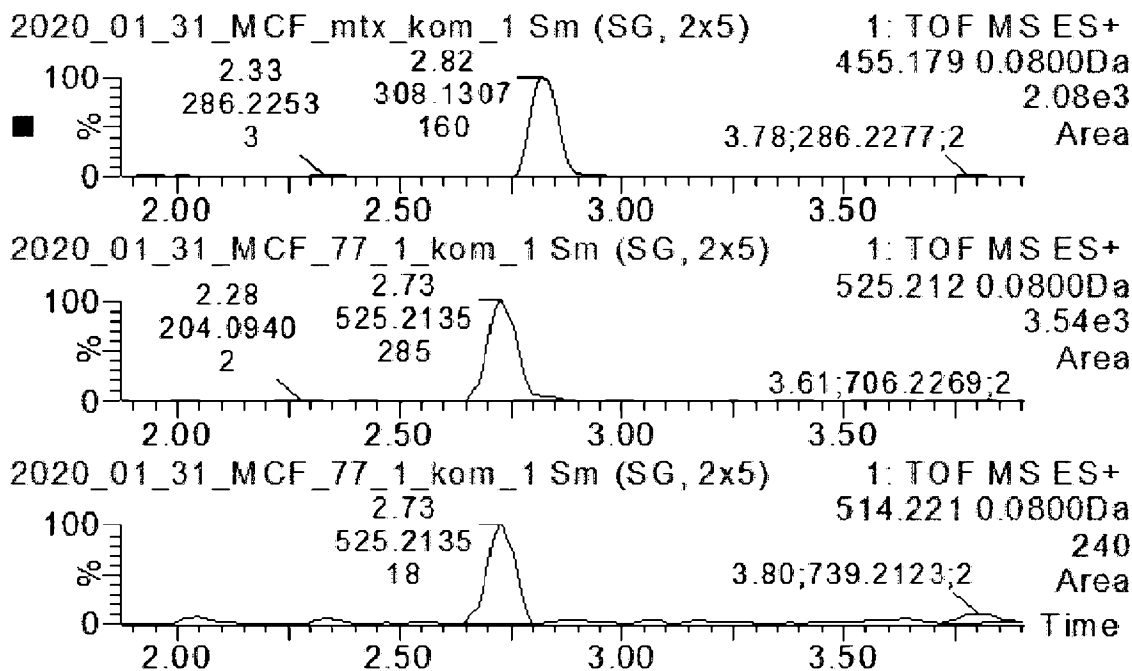


Figura 7

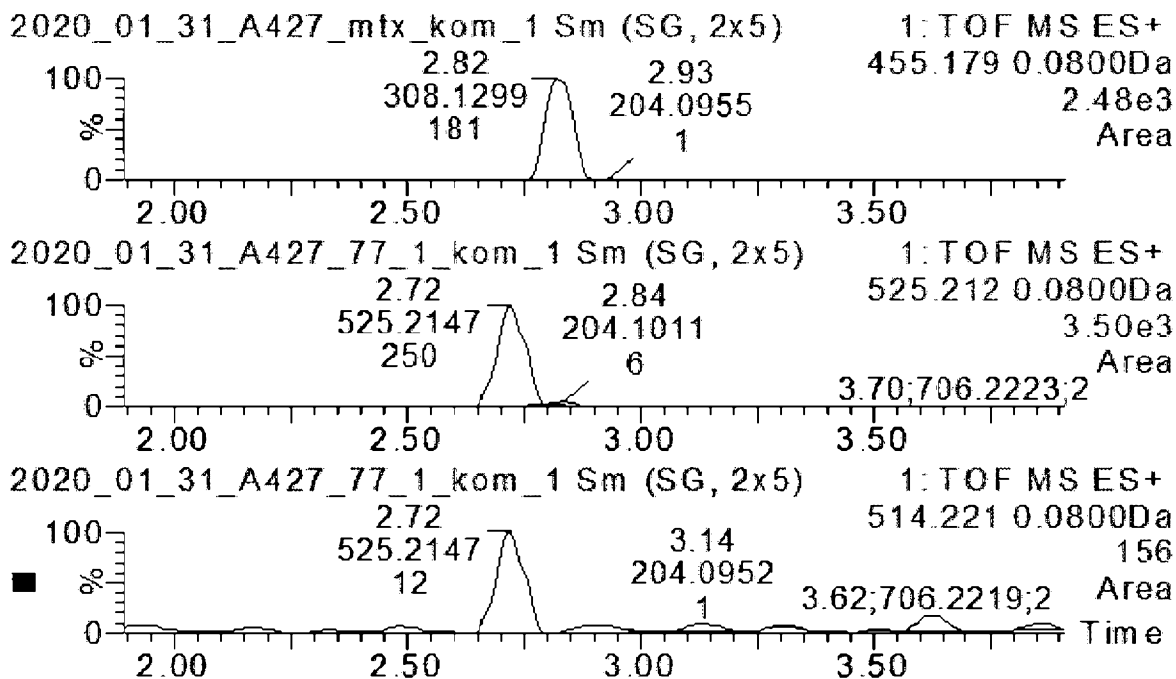


Figura 8