

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 246646 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **444571**

(22) Data zgłoszenia: **2023.04.25**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.10.28 BUP 44/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.02.17 WUP 07/2025**

(51) MKP:

C07D 471/04 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:
UNIwersytet Śląski w Katowicach,
Katowice, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:
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:

**2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian
i jego zastosowanie**

PL 246646 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pyrido[2,3-d]pyrimidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonian, będący pochodną pyrido[2,3-d]pyrimidyny z ugrupowaniem tosylowym oraz jego zastosowanie do barwienia biologicznych struktur komórkowych.

Związki oparte na szkielecie pyrido[2,3-d]pyrimidyny znane są ze swoich właściwości przeciwnowotworowych oraz hamujących działanie kinaz białkowych. Wiele danych literaturowych wskazuje zastosowanie związków pyrido[2,3-d]pyrimidyny jako inhibitorów kinaz tyrozynowych, takich jak PDGFr, bFGFr oraz c-Src, czy też białek mTOR i Akt, które są odpowiedzialne za sygnalizację komórkową, związaną z procesami umożliwiającymi proliferację, przeżycie oraz rozsiew komórek nowotworowych. Związki te są opisane w dokumentach patentowych: US10618902, US2008194546, WO2007/060404 oraz w szeregu publikacji naukowych: Connolly C., Hamby J., Schroeder M., Barvian M., Fu G., Panek R., Amar A., Shen C., Kraker A., Fry D., Klohs D., Doherty A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7(18), 2415–2420; Kraker A., Hartl B., Amar A., Barvian M., Showalter H., Moore C., *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, 60(7), 885–898; Fares M., Abou-Seri S., Abdel-Aziz H., Abbas S., Youssef M., Eladwy R., *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 83, 155–166. Jednakże żadna z cytowanych prac nie dotyczy możliwości wykorzystania związków zawierających szkielet pyrido[2,3-d]pyrimidyny do barwienia struktur komórkowych.

Obrazowanie struktur komórkowych jest przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków badawczych, ponieważ ich efektywne i rzetelne zobrazowanie jest narzędziem do poznania mechanizmów wielu badań biomedycznych. Jest to istotne w szerokim zakresie, zarówno z punktu widzenia badań podstawowych, badań *in vivo*, późniejszych badań klinicznych jak i ich ostatecznego wykorzystania w medycynie. Pomimo dostępności wielu związków światłoczułych, nadal istnieje potrzeba do zapewnienia luk w zależności od potrzeb naukowych, medycznych i diagnostycznych. Charakterystyczne właściwości absorpcyjne, a co za tym idzie również i emisyjne pozwalają na wykorzystanie odpowiednich źródeł wzbudzenia w zależności od potrzeby badacza czy lekarza. Precyzyjne umiejscowienie organelli komórkowych pozwala na ocenę wielu zjawisk w procesie wczesnych badań, a co najważniejsze na dokładne ulokowanie zmian chorobowych w przypadku np. chirurgii onkologicznej. Obecnie istnieje wiele komercyjnie dostępnych barwników dedykowanych do poszczególnych struktur w komórce oraz posiadających maksimum emisji obejmujące cały zakres światła widzialnego. Gromadzenie się barwników w charakterystycznych miejscach komórki często jest wynikiem oddziaływania z elementami cytoszkieletu oraz kwasami nukleinowymi [US9102835, US5075556, US20100184042, US20040156782]. Z punktu widzenia diagnostyki i samej medycyny istotne jest, aby barwnik wiązał się z miejscem zmienionym chorobowo (np. nowotworem) i pozwalał na precyzyjne wskazanie miejsca przeznaczonego do resekcji wraz z obszarem marginesu [US6944493B2, US9044142B2 oraz Te Velde E.A., Veerman T., Subramaniam V., Ruers T., *Eur J Surg Oncol* **2010**, 36(1), 6–15].

Przykładem zastosowania związków służących do wybarwiania struktur komórkowych jest pochodna para-iminostyrylochinoliny (PL 233179), mająca zastosowanie w diagnostyce chorób nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem nowotworu jelita grubego. Innym przykładem jest wykorzystanie pochodnych fenotiazyny zawierających w swojej strukturze sprzężony pierścień imidazolu do obrazowania komórek nowotworowych (P.438052).

Rozwijanie badań nad opracowaniem nowych związków i metod obrazowania komórkowego jest niezwykle istotne z powodu ograniczeń obecnie stosowanych barwników [Jensen E.C., *Anat Rec* **2012**, 295, 2031–2036]. Pożądane cechy dobrego barwnika nie ograniczają się tylko do korzystnych właściwości spektroskopowych takich jak wysoka kwantowa wydajność fluorescencji, duże przesunięcie Stokesa, brak zjawiska fotowybielenia, czyli inaczej stabilność fotochemiczna. Równie istotny jest brak cytotoksyczności (w przypadku barwień przeżyciowych) oraz wysokie powinowactwo do określonych struktur w komórce. Warto również nadmienić, że wartością progową obrazowania komórkowego jest barwa zielona ze względu na to, iż poniżej tej wartości absorbują molekuly zawarte w komórce. Dlatego też, barwniki emitujące zieloną barwę są najpopularniejsze i najbardziej uniwersalne z punktu widzenia możliwości sprzętowych [Swenson ES, Price JG, Brazelton T, Krause DS., *Stem Cells* **2007**, 25, 2593–2600]. Stąd obecnie prowadzone badania mają duże wyzwanie, aby sprostać wysokim standardom stawianym związkom mającym zastosowanie do obrazowania organelli komórkowych. Charakterystyczne właściwości barwników są podyktowane potrzebą uzyskania obrazów mikroskopowych najwyższej jakości przy wysokim sygnale fluorescencji w stosunku do szumu, generowanego przez autofluorescencję komórki.

Celem twórców niniejszego wynalazku było opracowanie nowej pochodnej pirydo[2,3-d]pirymidyny z ugrupowaniem tosylowym o korzystnych właściwościach spektroskopowych oraz wskazanie jej zastosowania jako barwnika fluorescencyjnego do barwienia biologicznych struktur komórkowych lub wykorzystania w diagnostyce chorób nowotworowych.

Istotę niniejszego wynalazku stanowi 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian, o postaci chemicznej przedstawionej wzorem 1.

Istotę wynalazku stanowi także zastosowanie 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonianu przedstawionego wzorem 1 jako barwnika fluorescencyjnego do barwienia biologicznych struktur komórkowych, przy czym stosuje się go, 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, 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian stosuje się rozpuszczony w dimetylosulfotlenku.

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

Korzystnie, 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych.

Korzystnie, 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów nabłonkowych płuc.

Korzystnie, 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów mózgu.

Korzystnie, 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów piersi.

Z przedstawionych badań w przykładzie 1 wynika, że 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian (oznaczenie kodowe związku: **ET-05**) posiada dwa pasma absorpcji w zakresie 300–350 nm oraz fluorescencję w zakresie 495 nm oraz 464 nm. Dodatkowo, istotnie korzystne parametry takie jak duże przesunięcie Stokesa (powyżej 110 nm) oraz wysoka intensywność fluorescencji umożliwiają zastosowanie związku jako barwnika fluorescencyjnego do barwienia biologicznych struktur komórkowych. Związek ET-05 może być stosowany pod postacią farmaceutycznie dostępnego preparatu, przykładowo jako roztwór rozpuszczony w korzystnym dla komórek rozpuszczalniku. Przy czym, takim rozpuszczalnikiem może być DMSO lub etanol. Za bezpieczną dawkę rozpuszczalnika uważa się nie więcej niż 0,3% objętości pożywki hodowlanej gotowej do podania do układu komórkowego. Zaletą opisaną pochodnej ET-05 jest brak długoterminowej cytotoksyczności (72 godziny) wobec komórek raka płuca, jak i znikoma cytotoksyczność względem kilku linii komórek nowotworowych, tj. nowotworu mózgu oraz piersi. Przykładowo, opisana pochodna ET-05 po 2-godzinnej inkubacji w środowisku komórkowym może być zastosowana do obserwacji nowotworów płuc, piersi oraz mózgu. Intensywna zielona fluorescencja związku pozwala na uzyskanie wysokiej jakości obrazu (przy zachowaniu dobrego stosunku sygnału do tła), który może być rejestrowany przy użyciu kamery CCD. Pochodna ET-05 dobrze wiąże się z elementami komórkowymi, na co wskazuje jej specyficzny mechanizm akumulacji w obszarach błoniastych komórek, jakie występują w mitochondriach oraz lizosomach.

Pochodną według wynalazku można otrzymać z wykorzystaniem metod znanych ze stanu techniki, na przykład z wykorzystaniem procedury syntezy, opisaną 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 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonianu (oznaczenie kodowe związku: **ET-05**) oraz przykładowy sposób jego otrzymywania. W tym przykładzie przedstawiono także właściwości pochodnej ET-05, które

są istotne dla jej zastosowania, przy czym wskazano właściwości spektroskopowe omawianej pochodnej wraz z przykładowymi widmami absorpcji i emisji oraz cytotoksyczność badanej pochodnej ET-05 wobec różnych typów komórek nowotworowych.

W przykładach 2–5 przedstawiono możliwość zastosowania 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonianu w barwieniu biologicznych struktur komórkowych.

Przykład 1

2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonian (**ET-05**) o postaci chemicznej przedstawionej wzorem 1.

Związek według wynalazku, tj. 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonian otrzymano według przykładowej metody, która polega na tym, że w naczyniu umieszczono (0,2 mmol, 56 mg) bezpośredni prekursor związku ET-05: [2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4(3H)-on. Dodano chlorek metylenu – CH_2Cl_2 (3 mL), DIPEA – N,N-diizopropyletyloaminę (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 prekursora. Następnie dokonano identyfikacji sygnału za pomocą cienkiej warstwy TLC (CH_2Cl_2 :heksan – 1:1). Związek wydzielano poprzez rozdział chromatograficzny stosując kartridż wypełniony żelalem krzemionkowym (40–63 μm , 60 Å). ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) 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), 7,11–7,04 (m, 2H), 4,07 (s, 3H).

Natomiast bezpośredni prekursor ET-05, to jest [2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4(3H)-on otrzymano uprzednio w wyniku przykładowej trzyetapowej syntezy:

- 1) W pierwszym kroku wykonano 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 był 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 wydzielano poprzez filtrację.
- 2) W drugim etapie 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 powodowało precipitację produktu 2-metylopirydo[2,3-d]pirymidin-4(3H)-onu, który zbierano na lejku filtracyjnym i przemywano 2-propanolem – otrzymując chinazolon 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 ostatnim 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 krystalizowano 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 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonianu.

W tabeli nr 1 przedstawiono zbiór najważniejszych parametrów spektroskopowych związku 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonianu rozpuszczonego w DMSO jako najkorzystniejszym rozpuszczalniku, które potwierdzają przydatność wskazanej pochodnej z przykładu 1 do barwienia biologicznych struktur komórkowych.

Zgodnie z przedstawionymi danymi można zaobserwować, że badana pochodna ET-05 wykazuje dwa pasma absorpcji przy długości fali 307 nm oraz 358 nm oraz maksimum fluorescencji przy długości fali 495 nm. Pochodna prezentuje także istotnie wysoką intensywność fluorescencji oraz duże przesunięcie Stokesa, które wynosi 137 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 według niniejszego wynalazku.

Przykładowe widma absorpcji i emisji 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonianu.

Zaprezentowane w formie wizualnej widma absorpcji dla pochodnej ET-05 w DMSO (przedstawione na Fig. 1) oraz widma emisji (wzbudzenie 358 nm) dla pochodnej ET-05 w DMSO (przedstawione na Fig. 2) potwierdzają korzystne własności spektroskopowe badanej pochodnej ET-05. Na wszystkich prezentowanych widmach widoczna jest zależność intensywności położenia pasm absorpcji oraz fluorescencji od badanego stężenia związku. Co ważne, zastosowanie związku ET-05 w niskim stężeniu: $6,25 \cdot 10^{-6}$ M nadal potwierdza wysoką intensywność fluorescencji (powyżej 2000). W związku z tym, tak korzystne parametry spektroskopowe zakwalifikowały związek do dalszych badań komórkowych.

Właściwości spektroskopowe 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonianu w zależności od stosowanego rozpuszczalnika.

W tabeli nr 2 przedstawiono zmiany właściwości spektroskopowych pochodnej ET-05 w zależności od stosowanego rozpuszczalnika (polarności). Rozpuszczalniki uporządkowane wg indeksu polarności (klasyfikacja Burdick & Jackson).

Zgodnie z przedstawionymi danymi, pochodna ET-05 prezentuje szczególnie korzystne parametry spektroskopowe w rozpuszczalniku polarnym, takim jak DMSO. Rozpuszczalnik ten jest uważany za najkorzystniejszy z uwagi na rozpuszczenie substancji przeznaczonej do obrazowania 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 rozpuszczalnika nie przekraczała 0,3% objętości pożywki hodowlanej gotowej do podania do układu komórkowego.

Podsumowując, przedstawione korzystne parametry spektroskopowe zakwalifikowały związek ET-05 do dalszych badań komórkowych nad jego zastosowaniem.

Cytotoksyczności badanego 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonianu wobec różnych typów komórek nowotworowych.

Aktywność antyproliferacyjną związku ET-05 oznaczono wobec ludzkich komórek nowotworów mózgu (linie komórkowe: U251, U87, LN-229), piersi (linia komórkowa MCF-7) oraz płuca (linia komórkowa A549). Komórki wysiewano na 96-dółkową płytkę w ilości 5 tysięcy na dółek (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-05 (rozpuszczonego 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 dółkach 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 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonianu w postaci wyliczonych wartości IC₅₀ przedstawiono w tabeli 3.

Zgodnie z przedstawionymi wynikami, dla badanego 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonianu nie obserwowano cytotoksyczności wobec nowotworu nabłonkowego płuc. Dodatkowo, prezentowane dane wskazują na nieznaczną cytotoksyczność pochodnej o wzorze 1 wobec kilku komórek nowotworowych mózgu oraz piersi. Jednakże, warto podkreślić jest to, że wyniki te prezentują nieznaczną cytotoksyczność związku w wydłużonym (do 72 godzin) czasie inkubacji w stosunku do czasu eksperymentu barwienia, który wynosił 2 godziny. W związku z powyższym, zachowanie związku w środowisku komórkowym uważa się za korzystne i wartościowe względem zastosowania opisanego w niniejszym wynalazku. Związki mogą zostać aplikowane w stężeniu pozwalającym na osiągnięcie wysokiej fluorescencji.

Przykład 2

Zastosowanie 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonianu 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 (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 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. 3.

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

Przykład 3

Zastosowanie 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonianu do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów mózgu.

Przykładowa procedura barwienia komórek ludzkiego nowotworu mózgu linii U251, U87 lub 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 (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. 4.

Przedstawiony obraz, wyraźnie wskazuje na akumulację pochodnej ET-05 we wnętrzu komórek nowotworów mózgu, przykładowo linii U251. Związek charakteryzuje się intensywną zieloną fluorescencją, która może występować w obszarach błoniastych komórek.

Przykład 4

Zastosowanie 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonianu do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów piersi.

Przykładowa procedura barwienia komórek ludzkiego nowotworu piersi linii MCF-7. 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. 5.

Zgodnie z przedstawionym obrazem, badana pochodna wykazuje jasną, intensywną zieloną fluorescencję w komórkach raka piersi. Umieszczenie sygnału fluorescencyjnego na obrzeżach obszaru komórki może wskazywać powinowactwo do struktur błoniastych.

Przykład 5

Zastosowanie 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzeno-1-sulfonianu do selektywnego barwienia zmian w błoniastych strukturach komórkowych i diagnostyki chorób nowotworowych 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

zakończonych 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 pozwalają na specyficzne wybarwienie wybranych struktur wewnątrzkomórkowych: lizosomów oraz mitochondriów.

Wobec tego zastosowanie powyższych barwników ułatwia 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.

Prezentowany przykład barwienia potwierdza specyficzny mechanizm związku i tendencję do akumulacji w komórkowych strukturach błoniastych, jakie występują w mitochondriach oraz lizosomach. Nałożenie obrazów powstałych w wyniku przeprowadzonego kontrbarwienia 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonianu z barwnikami komercyjnie dostępnymi (dedykowanymi dla poszczególnych organelli komórkowych, tj. mitochondriów lub lizosomów) pozwala jednoznacznie stwierdzić umiejscowienie badanego związku w komórce.

Zastrzeżenia patentowe

1. 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian, o postaci chemicznej przedstawionej wzorem 1.
2. Zastosowanie 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonianu przedstawionego wzorem 1 jako barwnika fluorescencyjnego do barwienia biologicznych struktur komórkowych, przy czym stosuje się go, 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 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian rozpuszczony 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 któregokolwiek z zastrzeżeń 2 do 5 **znamiennie tym**, że 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych.
7. Zastosowanie według któregokolwiek z zastrzeżeń 2 do 6 **znamiennie tym**, że 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów nabłonkowych płuc.
8. Zastosowanie według któregokolwiek z zastrzeżeń 2 do 6 **znamiennie tym**, że 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów mózgu.
9. Zastosowanie według któregokolwiek z zastrzeżeń 2 do 6 **znamiennie tym**, że 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]pirydo[2,3-d]pirymidino-4-ylo-4-metylobenzono-1-sulfonian stosuje się jako barwnik fluorescencyjny do barwienia błoniastych struktur komórkowych nowotworów piersi.

Tabela 1.

Związek	Zakres absorpcji [nm]	Położenie pasm absorpcji λ [nm]	Maksimum fluorescencji $\lambda_{\max}$ [nm]	Intensywność fluorescencji	Przesunięcie Stokesa [nm]
ET-05	280-430	307; 358	495	8030	137

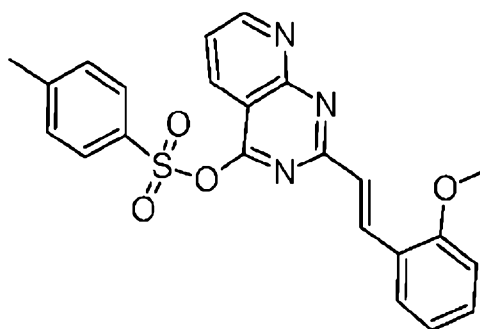
Tabela 2.

Związek	Rozpuszczalnik	Położenie pasm absorpcji λ [nm]	Maksimum fluorescencji $\lambda_{\max}$ [nm]	Intensywność fluorescencji	Przesunięcie Stokesa [nm]
ET-05	DMSO	307; 358	495	8030	137
	metanol	304; 358	499	1880	141
	chloroform	305; 358	440	5872	82
	toluen	303; 353	423	3700	70

Tabela 3.

Związek	Aktywność antyproliferacyjna - IC ₅₀ [μM]				
	U251	U87	LN-229	MCF-7	A549
ET-05	6,006 ± 0,760	5,134 ± 0,743	5,632 ± 0,925	10,21 ± 1,24	>25

Rysunki



Wzór 1

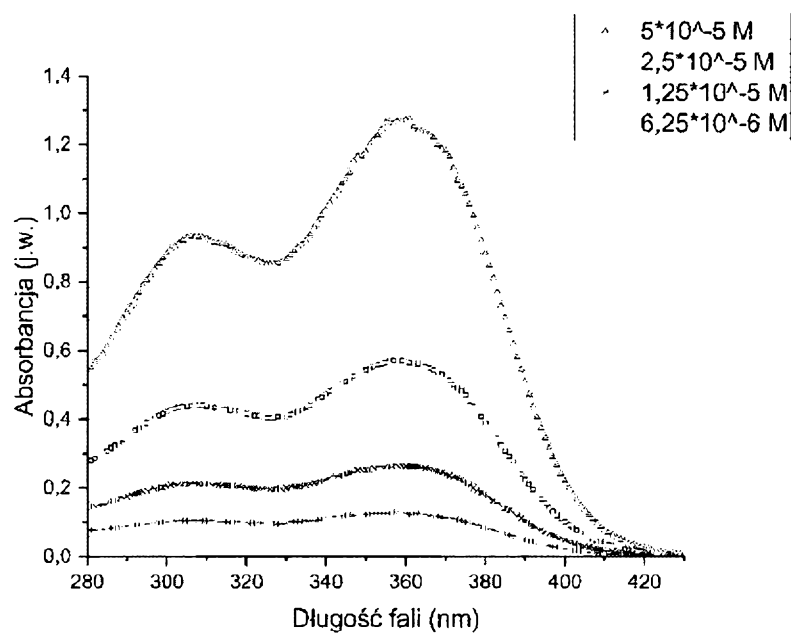


Fig. 1.

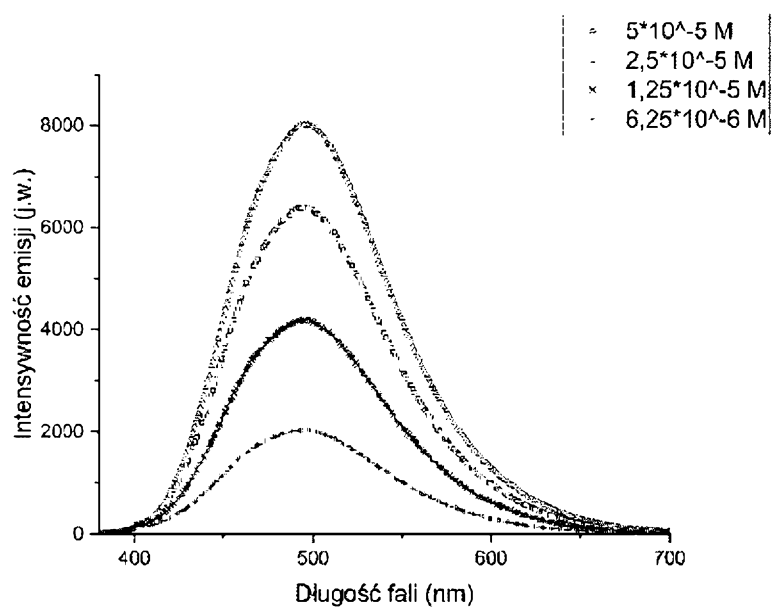


Fig. 2.

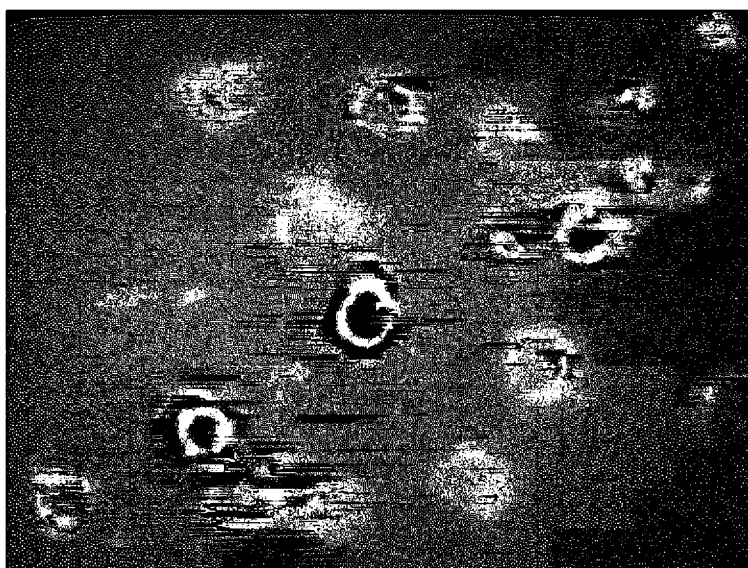


Fig. 3

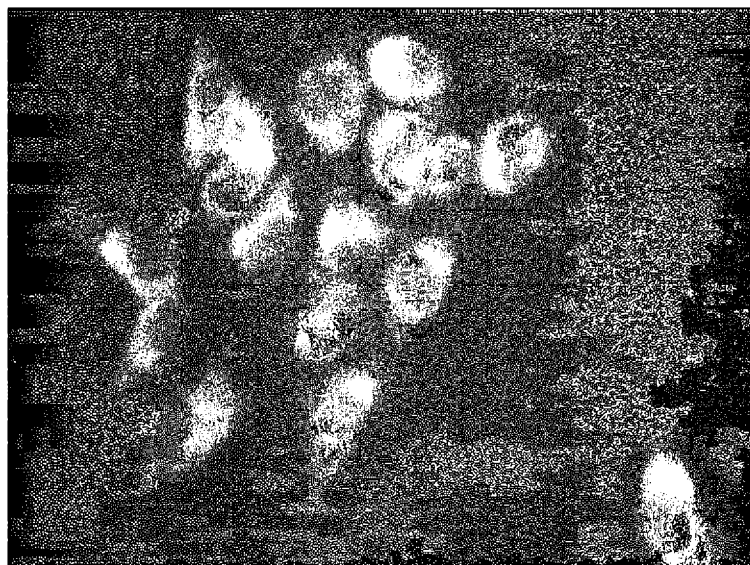


Fig. 4

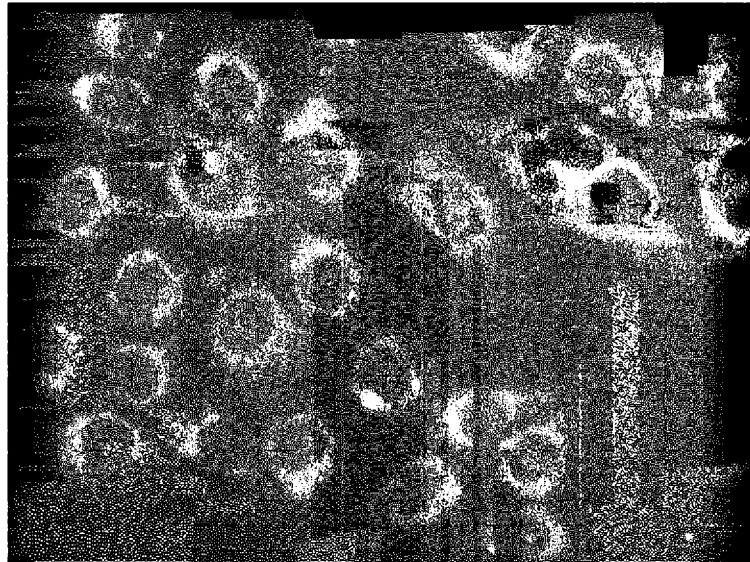


Fig. 5