(19) URZĄD PATENTOWY RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

(10) **PL 244510 B1**

(12) # Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438017**
(22) Data zgłoszenia: **2021.05.27**
(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.11.28 BUP 48/2022**
(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.02.05 WUP 06/2024**

(51) MKP:
A61K 31/69 *(2006.01)*
A61K 31/662 *(2006.01)*
A61P 35/00 *(2006.01)*

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ, Lublin, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:
MAGDALENA MIZERSKA-KOWALSKA, Lublin, PL
SYLWIA SOWA, Lublin, PL
BARBARA ZDZISIŃSKA, Lublin, PL
ANNA ZIARKOWSKA, Księżomierz Kościelna, PL
ALEKSANDRA TOMASIK, Wólka Nieliska, PL

(54) Tytuł:
Ester diizopropylowy kwasu [1-(N-p-bromofenyloamino)]-1-(p-nitrofenylo)metyloboranatofosfonawego do zastosowania w leczeniu kostniakomięsaka

PL 244510 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest ester diizopropylowy kwasu [1-(*N*-p-bromofenyloamino)]-1-(p-nitrofenylo)metyloboranatofosfonawego o wzorze 1 do zastosowania w leczeniu kostniakomięsaka.

Problem techniczny jaki rozwiązuje wynalazek, to nowe medyczne zastosowanie związku chemicznego o wzorze 1, jako składnika leku onkologicznego stosowanego w leczeniu kostniakomięsaka.

Kostniakomięsaki, inaczej mięsaki kościopochodne, to pierwotne nowotwory kości wywodzące się najczęściej z komórek tworzących kości – osteoblastów. Występują najczęściej u młodzieży i młodych dorosłych. Ogólny schemat leczenia kostniakomięsaków obejmuje głównie leczenie chirurgiczne wraz z przedoperacyjną i pooperacyjną chemioterapią z zastosowaniem cytostatyków, takich jak: cisplatyna, doksorubicyna, ifosfamid, metotreksat. Dość powszechnie używanym na świecie miernikiem skuteczności leczenia chorób nowotworowych są wskaźniki przeżyć, które w przypadku agresywnych form kostniakomięsaków są stosunkowo niskie. Ponadto, w przypadku wszystkich postaci kostniakomięsaków, wskaźniki przeżywalności nie zmieniły się od blisko trzydziestu lat ze względu na rozwijającą się często lekooporność i brak nowych leków. W związku z powyższym, istnieje duże zapotrzebowanie na nowe, skuteczne, a zarazem mniej toksyczne chemioterapeutyki.

Wśród związków chemicznych charakteryzujących się potencjalnym zastosowaniem medycznym, między innymi jako leki przeciwnowotworowe, są związki fosforoorganiczne, co zostało przedstawione m. in. w publikacji Mucha A. i in., J Med Chem., 2011, 54, 5955–5980 oraz Demkowicz S. i in., *RSC Advances*, 2016, 6, 7101–7112. Z kolei, aktywność przeciwnowotworową fosforoorganicznych pochodnych alfa aminokwasów wobec komórek wywodzących się z różnych nowotworów, np. ostrej białaczki szpikowej, raka płuca, raka jelita grubego, raka żołądka, raka piersi, raka skóry, neuroblastomy, raka wątroby wykazali w publikacjach Iwanejko J. i in., *Materials* (Basel), 2020, 13, 2393; Tiwari S.V. i in, *Molecules*, 2018, 23, 1981; Annapratima G. i in., *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2018, 18, 1267; Ewies E.F. i in., *Eur J Med Chem*., 2019, 15, 180:310–320; Mungara A.K. i in.. *Chem Pharm. Bull.* (Tokyo), 2012, 60, 1531–7. Z kolei, jak wynika z opisu patentowego US 4337201, proleku fozynoprylu – kwas (2S,4S)-4-cykloheksylo-1-[2-[(2-metylo-1-propanoiloksypropoksy)-(4-fenylobutylo) fosforylo]acetylo]pirolidyno-2-karboksylowy, pełni funkcję inhibitora konwertazy angiotensyny, stąd jego zastosowanie w terapii nadciśnienia tętniczego.

Wśród związków fosforoorganicznych znajdujących medyczne zastosowanie, a zwłaszcza w leczeniu onkologicznym, brak jest informacji na temat medycznego zastosowania estru diizopropylowego kwasu [1-(*N*-*p*-bromofenyloamino)]-1-(*p*-nitrofenylo)metyloboranatofosfonawego (wzór 1). Z uwagi na fakt, iż związek ten, w pewnym zakresie stężeń, nie wykazuje toksyczności w stosunku do ludzkich prawidłowych osteoblastów, podjęto badania *in vitro* w kierunku jego zastosowania w leczeniu nowotworów.

Nieoczekiwanie, w badaniach przeprowadzonych na komórkach nowotworowych wywodzących się z kostniakomięsaka, okazało się, że ester według wynalazku o, wzorze 1, zastosowany w stężeniach nie wpływających na, żywotność ludzkich, prawidłowych osteoblastów, wykazuje aktywność hamowania proliferacji, komórek tego nowotworu i zatrzymuje cykl komórkowy i/lub indukuje apoptozę.

Istotą wynalazku jest ester diizopropylowy kwasu [1-(*N*-*p*-bromofenyłolmino)]-1-(*p*-nitrofenylo)metyloboranatofosfonawego o wzorze 1 do zastosowania w leczeniu kostniakomięsaka.

Wynalazek przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

Przykład I. Działanie estru według wynalazku na żywotność ludzkich, prawidłowych osteoblastów.

Ludzkie, prawidłowe osteoblasty, linii hFOB 1.19 o numerze CRL-11372™ prowadzono w płynie DMEM/F-12, bez czerwieni fenolowej, z dodatkiem 10% surowicy płodowej. Z roztworu wyjściowego estru w DMSO o stężeniu 10 mM, wykonano szereg rozcieńczeń we właściwym dla linii komórkowej płynie DMEM/F12 bez czerwieni fenolowej, z dodatkiem 2% surowicy płodowej, o stężeniach 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 60; 80 i 100 μM.

Do każdego dołka 96-dołkowej płytki wlewano po 100 μl zawiesiny komórek linii hFOB 1.19 o gęstości 3x105 komórek/ml, sporządzonej w płynie hodowlanym DMEM/F-12, bez czerwieni fenolowej, z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej. Po 24 godzinach inkubacji w atmosferze 5% CO_2 i temp. 37°C usunięto płyn znad wyrośniętej hodowli, a następnie, do każdego dołka dodano 100 μl estru o określonym stężeniu. Kontrolę stanowiły komórki poddane działaniu samego płynu hodowlanego z 2% zawartością płodowej surowicy bydlęcej. Komórki poddano 24-godzinnej inkubacji, po czym określano wpływ estru według wynalazku na żywotność ludzkich prawidłowych osteoblastów, znanym sposobem

– kolorymetryczną metodą MTT. Podstawą testu MTT jest przekształcenie przez dehydrogenazę bursztynianową obecną w żywych, aktywnych metabolicznie komórkach żółtych soli tetrazoliowych, MTT, do nierozpuszczalnego w wodzie, fioletowego formazanu. W tym celu, do każdego dołka wprowadzano po 20 µl roztworu MTT 5 mg/ml w zbuforowanym płynie fizjologicznym z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+}. Płytki inkubowano 3 godziny. Zgromadzone w komórkach kryształki formazanu rozpuszczano w detergencie, to jest 10% roztworze SDS o pH 7,4 w 0,01N HCl, dodawanym po 100 µl na dołek. Po 24-godzinnej inkubacji, dokonano odczytu absorbancji w każdym dołku z użyciem spektrofotometru przy długości fali λ=570 nm. Wartość %, określająca żywotność prawidłowych osteoblastów w zależności od wartości stężenia dodanego estru, wyrażona jako średni procent z trzech niezależnych doświadczeń, została odniesiona do absorbancji czystej hodowli kontrolnej, wynoszącej 100% żywotności komórek prawidłowych osteoblastów i przedstawiona na rysunku jako fig. 1. Obniżenie żywotności komórek linii hFOB 1.19 zaobserwowano w stężeniach powyżej 60 µM, co wskazało, że stężenia powyżej 60 µM są toksyczne dla prawidłowych, osteoblastów i tym samym wyznaczyło granicę stężeń estru używanego do badań opisanych w dalszych przykładach wykonania.

Przykład 2. Działanie estru według wynalazku na proliferację ludzkich komórek kostniakomięsaka linii HOS i Saos-2.

Linię komórkową HOS o numerze CRL-1543™ prowadzono w płynie hodowlanym MEM z dodatkiem 10% surowicy płodowej, zaś linię komórek Saos-2 o numerze HTB-85™, w płynie McCoy z dodatkiem 10% surowicy płodowej.

Z 10 mM roztworu wyjściowego estru w DMSO, wykonano szereg rozcieńczeń estru w płynie hodowlanym MEM dla linii HOS i McCoy dla linii Saos-2, z dodatkiem 10% surowicy płodowej, o wartości stężeń: 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 60 µM. Oznaczanie proliferacji komórek linii HOS i Saos-2 wykonano w oddzielnych doświadczeniach, sporządzając hodowle na odrębnych płytkach 96-dołkowych po 100 µl zawiesiny w dołku poszczególnego rodzaju komórek, o niskiej gęstości $3x10^4$ komórek/ml, sporządzonej w płynie hodowlanym MEM dla linii HOS i McCoy dla linii Saos-2, z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej. Po 24 godzinach inkubacji w atmosferze 5% CO2 i temp. 37°C usunięto płyn znad hodowli, a następnie, dodawano po 100 µl na dołek, estru o określonym stężeniu. Kontrolę stanowiły komórki poddane działaniu samego płynu hodowlanego z 10% zawartością płodowej surowicy bydlęcej. Tak przygotowane hodowle wraz z kontrolą poddano 96-godzinnej inkubacji w atmosferze 5% CO_2 i temp. 37°C i dalsze badania wpływu estru według wynalazku na proliferację komórek kostniakomięsaka linii HOS i Saos-2 wykonano znaną kolorymetryczną metodą MTT opisaną w przykładzie 1. Poziom absorbancji uzyskany dla hodowli kontrolnych był równoznaczny 100% aktywności proliferacyjnej komórek. Uzyskane wyniki przedstawiono jako % proliferacji komórek poddanych działaniu określonego stężenia estru, w porównaniu z hodowlami kontrolnymi i wyznaczony został na podstawie wartości absorbancji uzyskanych dla poszczególnych prób. Stopień proliferacji komórek nowotworowych w zależności od stężenia estru według wynalazku, wyrażony jako średni z trzech niezależnych doświadczeń procent kontroli, przedstawiono na rysunku jako fig. 2 dla linii HOS i fig. 3 dla linii Saos-2. Zahamowanie proliferacji komórek linii HOS obserwowane było w granicach stężeń estru od 12,5 do 60 µM. Natomiast zahamowanie proliferacji komórek linii Saos-2 obserwowane było w granicach stężeń od 25 µM do 60 µM.

Przykład 3. Badanie działania estru według wynalazku na cykl komórkowy komórek kostniakomięsaka linii HOS i Saos-2.

Hodowle komórek linii HOS i Saos-2 prowadzono jak opisano w przykładzie 2. Z estru o wzorze 1 sporządzono roztwór wyjściowy w DMSO o stężeniu 10 mM, z którego wykonano dwukrotne rozcieńczenia uzyskując stężenia 12,5; 25 i 50 µM dla zastosowania wobec komórek linii HOS i stężenia 15, 30 oraz 60 µM dla bardziej opornych na działanie estru komórek linii Saos-2. Rozcieńczenia wykonano we właściwym dla linii komórkowej płynie MEM i McCoy z dodatkiem. 10% surowicy płodowej. Stężenia estru, nie obniżające żywotności prawidłowych ludzkich osteoblastów, dobrano w oparciu o wyniki eksperymentu opisanego w przykładzie 1. Wpływ estru według wynalazku na cykl komórkowy komórek kostniakomięsaka oceniono na podstawie zmian ilości komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w hodowli poddanej jego działaniu. Dość komórek określano przy zastosowaniu cytometru przepływowego po uprzednim ich wybarwieniu jodkiem propidyny. Oznaczenie cyklu komórkowego linii HOS i Saos-2 wykonano w oddzielnych doświadczeniach. Do każdego dołka płytki 6-dołkowej wlewano po 2 ml zawiesiny komórek o niskiej gęstości $3x10^4$ komórek/ml, sporządzonej w płynie hodowlanym MEM dla linii HOS lub McCoy dla linii Saos-2 z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej. Po 24 godzinach inkubacji w atmosferze 5% CO_2 i temp. 37°C usunięto płyn znad hodowli,

a następnie dodano po 2 ml na dołek rozcieńczenia estru o wyżej wymienionych stężeniach. Kontrolę stanowiły komórki poddane działaniu samego płynu hodowlanego z 10% zawartością płodowej surowicy bydlęcej. Po 72-godzinnej inkubacji, zebrane z dołków komórki zostały utrwalone i permeabilizowane 70% etanolem w temp. -20°C przez 24 godziny, po czym wybawione jodkiem propidyny, według instrukcji producenta testu, i poddane analizie przy zastosowaniu cytometru przepływowego FACS Calibur. Jodek propidyny, jako barwnik fluorescencyjny wiążący się z kwasami nukleinowymi, pozwala na ocenę zmian ilości materiału genetycznego w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, a na tej podstawie określenie liczby komórek kostniakomięsaka znajdujących się w określonej fazie cyklu komórkowego w zależności od stężenia użytego estru. Liczbę komórek w określonych fazach cyklu komórkowego, wyrażoną jako średni procent wszystkich komórek poddanych analizie w danej próbie z trzech niezależnych doświadczeń, przedstawiono na rysunku jako fig. 4 dla linii HOS i fig. 5 dla linii Saos-2. W przypadku komórek kostniakomięsaka linii HOS obserwowano istotny wzrost ilości komórek w fazie sub-G1 (wzrost ilości komórek ulegających śmierci przez apoptozę) oraz w fazie G2 (zatrzymanie cyklu w fazie G2) po inkubacji z estrem według wynalazku w zakresie stężeń od 25 do 50 μM. W przypadku komórek linii Saos-2 obserwowano istotny wzrost ilości komórek będących w fazie sub-G1 po inkubacji z estrem w zakresie stężeń od 30 do 60 μM.

Przykład 4. Badanie wpływu estru według wzoru 1 na indukcję apoptozy w komórkach kostniakomięsaka linii HOS i Saos-2.

Hodowle komórek linii HOS i Saos-2 prowadzono jako opisano w przykładzie 2. Stężenia estru, nie obniżające żywotności prawidłowych ludzkich osteoblastów dobrano w oparciu o wyniki eksperymentu opisanego w przykładzie 1. Rozcieńczenia estru wykonano we właściwym dla linii komórkowej płynie MEM Sub McCoy z dodatkiem 2% surowicy płodowej.

Wpływ estru według wynalazku na indukcję apoptozy w obydwu liniach komórkowych kostniakomięsaka, oceniono na podstawie ilości komórek, w których kaspaza 3 występuje w formie aktywnej, co świadczy o aktywacji apoptozy. Oznaczenie poziomu apoptozy w komórkach linii HOS i Saos-2 wykonano w oddzielnych doświadczeniach. Do każdego dołka płytki 6-dołkowej wlewano po 2 ml zawiesiny komórek o gęstości $1x10^5$ komórek/ml w przypadku linii HOS i $2x10^5$ komórek/ml w przypadku komórek linii Saos-2, sporządzonych w płynie hodowlanym MEM dla linii HOS lub McCoy dla linii Saos-2 z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej. Po 24 godzinach inkubacji w atmosferze 5% CO_2 i temp. 37°C usunięto płyn znad wyrośniętej hodowli, a następnie dodano po 2 ml na dołek ester według wynalazku, w stężeniach jakie użyto w przykładzie 3. Kontrolę stanowiły komórki poddane działaniu samego płynu hodowlanego z 2% płodową surowicą bydlęcą. Komórki poddano 72-godzinnej inkubacji, po czym zostały zebrane z dołków i wyznakowane przeciwciałami sprzężonymi z barwnikiem fluorescencyjnym, tj. fikoerytryną oraz rozpoznającymi aktywną formę kaspazy 3, według instrukcji producenta zastosowanego testu. Następnie komórki poddano analizie przy zastosowaniu cytometru przepływowego FACS Calibur.

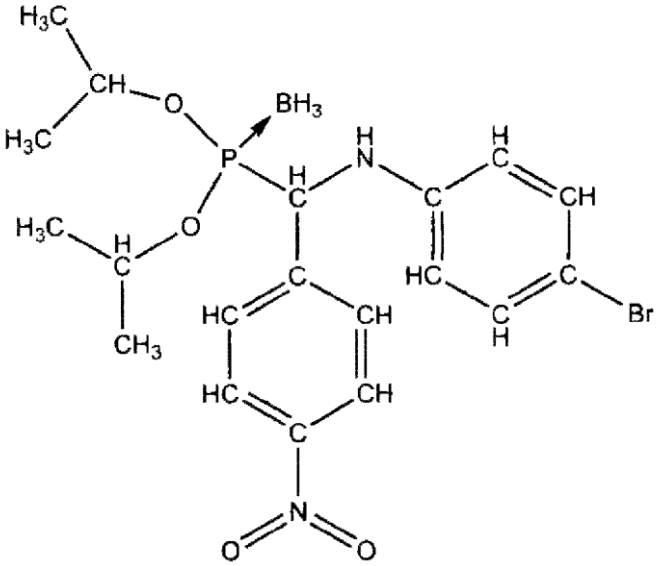
Ilość komórek z aktywną formą kaspazy 3 w zależności od stężenia estru, wyrażona jako średni procent wszystkich komórek poddanych analizie w danej próbie z trzech niezależnych doświadczeń, przedstawiono na rysunku jako fig. 6 dla linii HOS i fig. 7 dla linii Saos-2. W przypadku komórek kostniakomięsaka linii HOS istotny wzrost ilości komórek z aktywną kaspazą 3 obserwowany był po inkubacji komórek z estrem według wynalazku w granicach stężeń od 25 do 50 μM, natomiast w przypadku komórek linii Saos-2 w granicach stężeń od 30 do 60 μM.

Udowodnione w przykładach właściwości estru diizopropylowego kwasu [1-(*N*-*p*-bromofenyloamino)]-1-(*p*-nitrofenylo)metyloboranatofosfonawego, uzasadniają jego zastosowanie w leczeniu kostniakomięsaka.

Zastrzeżenie patentowe

1. Ester diizopropylowy kwasu [1-(*N*-*p*-bromofenyloamino)]-1-(*p*-nitrofenylo)metyloboranatofosfonawego o wzorze 1 do zastosowania w leczeniu kostniakomięsaka.

Rysunki



wzór 1

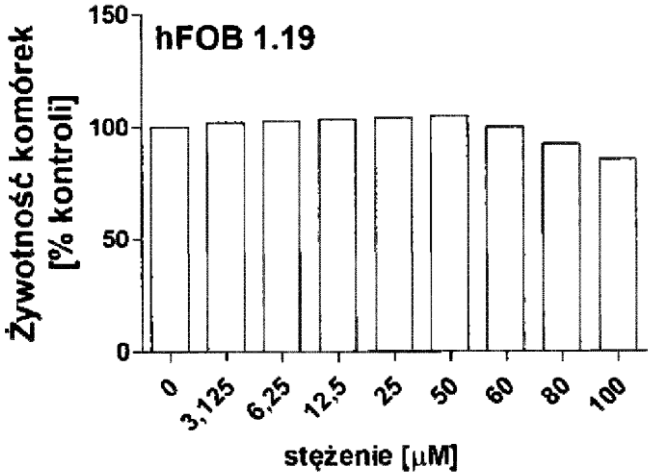


fig.1

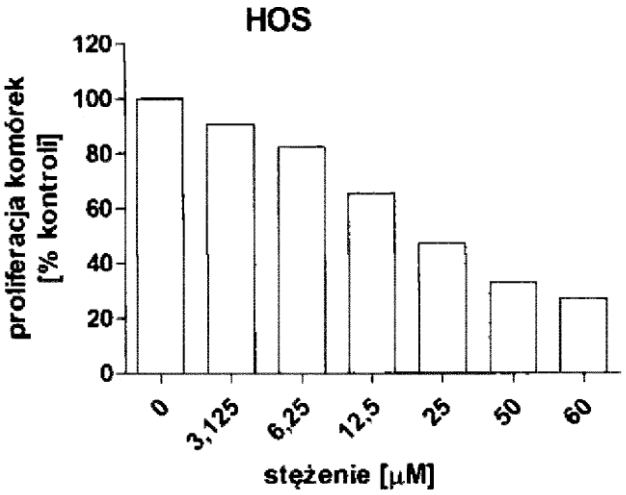

HOS
proliferacja komórek
[% kontroli]
120
100
80
60
40
20
0
0
3,125
6,25
12,5
25
50
60
stężenie [μM]

fig.2

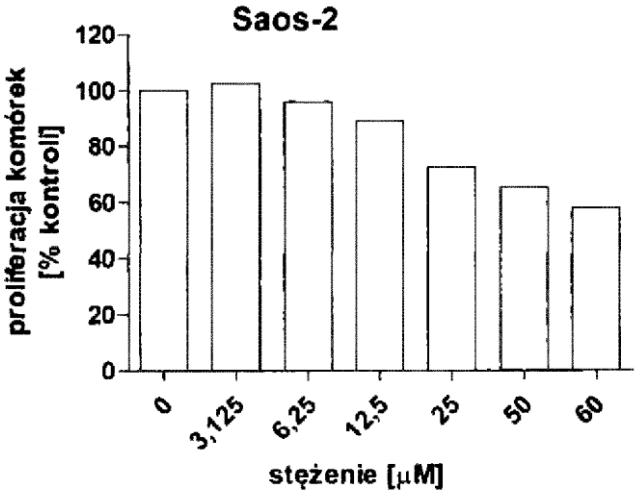

Saos-2
proliferacja komórek
[% kontroli]
120
100
80
60
40
20
0
0
3,125
6,25
12,5
25
50
60
stężenie [μM]

fig.3

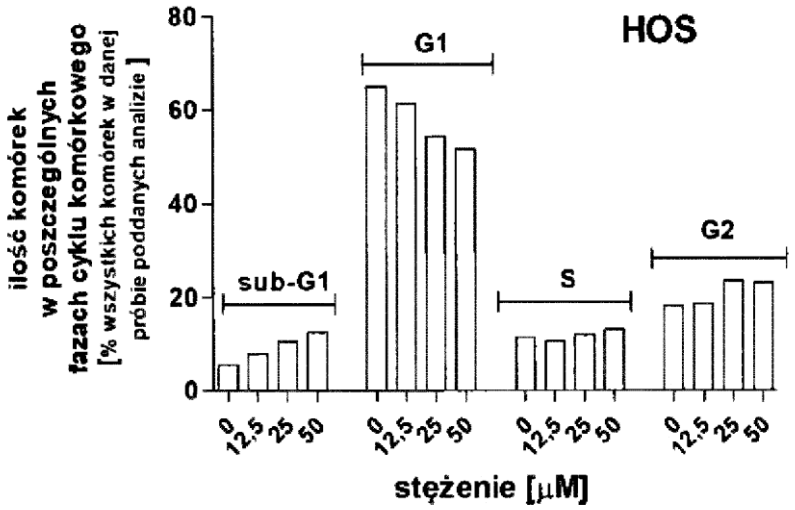

HOS
ilość komórek
w poszczególnych
fazach cyklu komórkowego
[% wszystkich komórek w danej
próbie poddanych analizie]
80
60
40
20
0
sub-G1
G1
S
G2
0
12,5
25
50
stężenie [μM]

fig.4

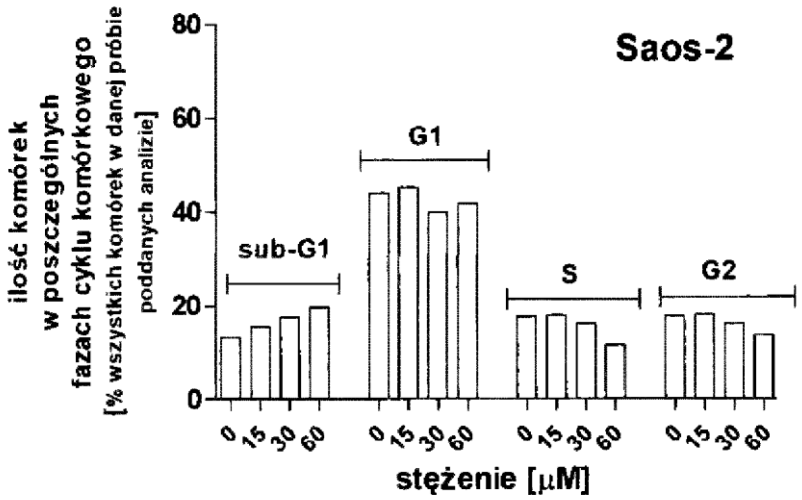

Saos-2
ilość komórek
w poszczególnych
fazach cyklu komórkowego
[% wszystkich komórek w danej próbie
poddanych analizie]
80
60
40
20
0
sub-G1
G1
S
G2
0
15
30
60
stężenie [μM]

fig.5

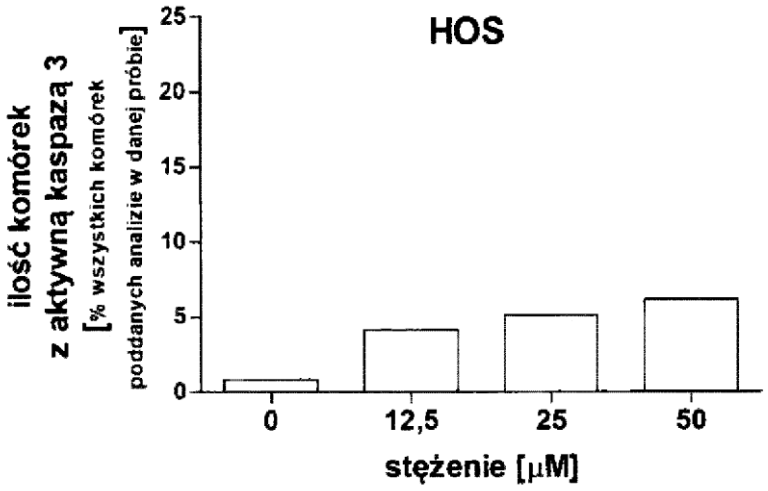

HOS
ilość komórek
z aktywną kaspazą 3
[% wszystkich komórek
poddanych analizie w danej próbie]
25
20
15
10
5
0
0
12,5
25
50
stężenie [μM]

fig.6

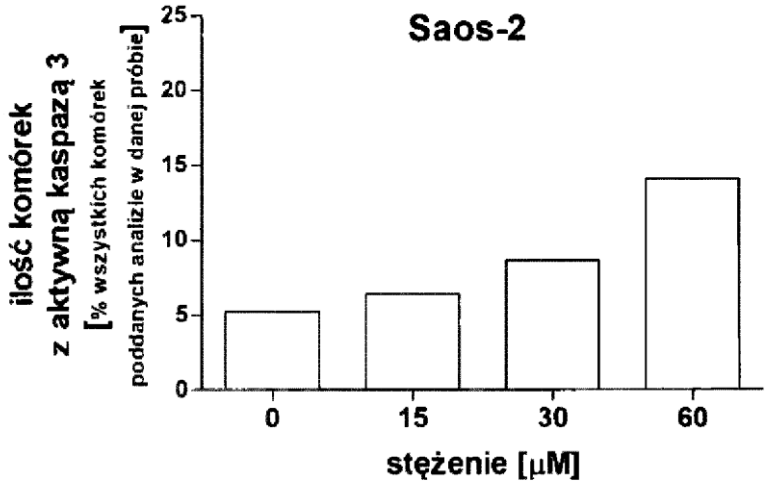

Saos-2
ilość komórek
z aktywną kaspazą 3
[% wszystkich komórek
poddanych analizie w danej próbie]
25
20
15
10
5
0
0
15
30
60
stężenie [μM]

fig.7