RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **212750** (13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **390766**

(22) Data zgłoszenia: **19.03.2010**

(51) Int.Cl.
C07D 311/36 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)

(54) **Złożone C-glikozydy pochodne genisteiny o działaniu cytotoksycznym i antyproliferacyjnym**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
26.09.2011 BUP 20/11

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.11.2012 WUP 11/12

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA ŚLĄSKA, Gliwice, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
WIESŁAW SZEJA, Żernica, PL
PIOTR ŚWIERK, Radlin, PL
MACIEJ CHRUBASIK, Rudy, PL
GRZEGORZ GRYNKIEWICZ, Łomianki, PL
ZDZISŁAW KRAWCZYK, Zabrze, PL
ALEKSANDRA RUSIN, Żernica, PL
JOANNA WIETRZYK, Wrocław, PL
MARIA ŚWITALSKA, Trzebnica, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Urszula Ziółkowska

PL 212750 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są złożone C-glikozydy pochodne genisteiny o działaniu cytotoksycznym i antyproliferacyjnym.

Źródłem wielu substancji biologicznie aktywnych są rośliny. Dużo uwagi poświęca się właściwościom flawonoidów, wtórnych metabolitów roślinnych. Dobrze udokumentowano ich aktywność przeciwnowotworową, antywirusową, przeciwbakteryjną właściwości przeciw utleniające. Naturalnymi postaciami izoflawonoidów w roślinach są ich pochodne glikozydowe oraz ich estry z niższymi kwasami karboksylowymi, zwłaszcza malonowym i octowym. Bogatym źródłem izoflawonów są nasiona roślin motylkowatych (*Legitminosae. Fubaceae*), zwłaszcza nasiona soi (*Glicynę max. Merill*). Genisteina, należąca do fitoestrogenowych izoflawonoidów jest uważana za perspektywiczny czynnik chemoprewencyjny i lek komplementarny w chorobach układu krążenia i nowotworowych. Na podstawie wieloletnich badań stwierdzono zróżnicowanie biologicznego działania genisteiny. [L.L.Marchand, Biomem. Pharmacother. **2002**, *56*, 296-201: R.A.Dixon. D-Ferreira, Phytochemistry **2002**, *60*, 205-211 i literatura cytowana]. Określono szereg celów molekularnych działania genisteiny ale zasadnicze oddziaływania decydujące o aktywności przeciwnowotworowej to inhibicja kinaz tyrozynowych, topoizomerazy II, blokowanie onkogenów.

Lipofilowe glikozydy izoflawonów są znacznie bardziej aktywnymi związkami o działaniu cytotoksycznym od niepodstawionych połączeń z tej grupy [K. Polkowski, J. Popiołkiewicz, P. Krzeczyński, J. Ramza,. W. Pucko, O. Zegrocka-Stendel, J. Boryski, J. S. Skierski, A. P. Mazurek, G. Grynkiewicz; *Cancer Lett*., **2004**, 203, 59-69. patent PL nr 205635]. Szczególnie aktywny był produkt glikozylacji genisteiny per-O-acetylową pochodną laktalu oznaczony symbolem G-21. Z kolei według zgłoszenia patentowego P 384578 aktywność przeciwnowotworową wykazują glikokoniugaty zawierające resztę acylowanego cukru 2,3-nienasyconego otrzymane w reakcji glikozylacji 7-O-hydroksyalkilowych pochodnych genisteiny. Wykazują one działanie cytotoksyczne i cytostatyczne w odniesieniu do szeregu linii komórek nowotworowych przy stężeniu znacznie niższym niż genisteina. Z uwagi na obecność wiązania O-glikozylowego otrzymane połączenia ulegają hydrolizie działaniem glikozydaz, co obniża ich biodostępność. Poszukując połączeń biomimetycznych zwrócono uwagę na glikokoniugaty w których cukier połączony jest z linkerem wiązaniem C-glikozydowym odpornym na działanie enzymów hydrolitycznych. Związki otrzymano w reakcji z C-glikozydów pochodnych acylowanych cukrów z 7-O-allilo-genisteiną. Otrzymane połączenia hamują proliferację komórek nowotworowych oraz progresję guza w badaniach na zwierzętach.

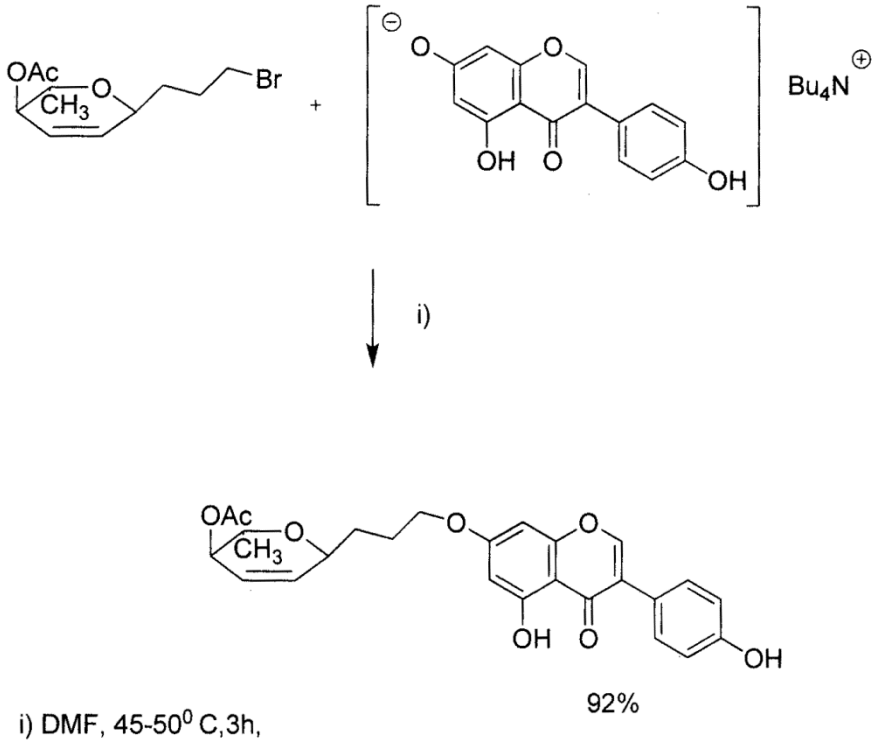
Złożone C-glikozydy według wynalazku o strukturze przedstawionej wzorem 1, gdzie jednostka cukrowa którą stanowi per-O-acylowany mono- di- lub trisacharyd, 2,3-nienasycony mono-, di-, lub trisacharyd połączona jest wiązaniem C-glikozydowym z łącznikiem R zawierający od dwu do dziesięciu atomów węgla w którym grupa funkcyjna A, to wiązanie podwójne, a łącznik związany jest wiązaniem 7-O-eterowym z genisteiną.

W toku badań nieoczekiwanie stwierdzono, że glikokoniugaty pochodne genisteiny powodują znaczące zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych *in vitro*, oraz spowolnienie wzrostu guza nowotworowego *in vivo* w badaniach na myszach, w związku z czym mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych.

Niżej podane przykłady ilustrują wynalazek.

P r z y k ł a d 1

Otrzymywanie 7-O-[3-(4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-α-L-erytro-heks-2-enopyranosyl)-propylo genisteiny (**R3**)



Schemat 1. Otrzymywanie C-glikokoniugatu przez alkilowanie genisteiny.

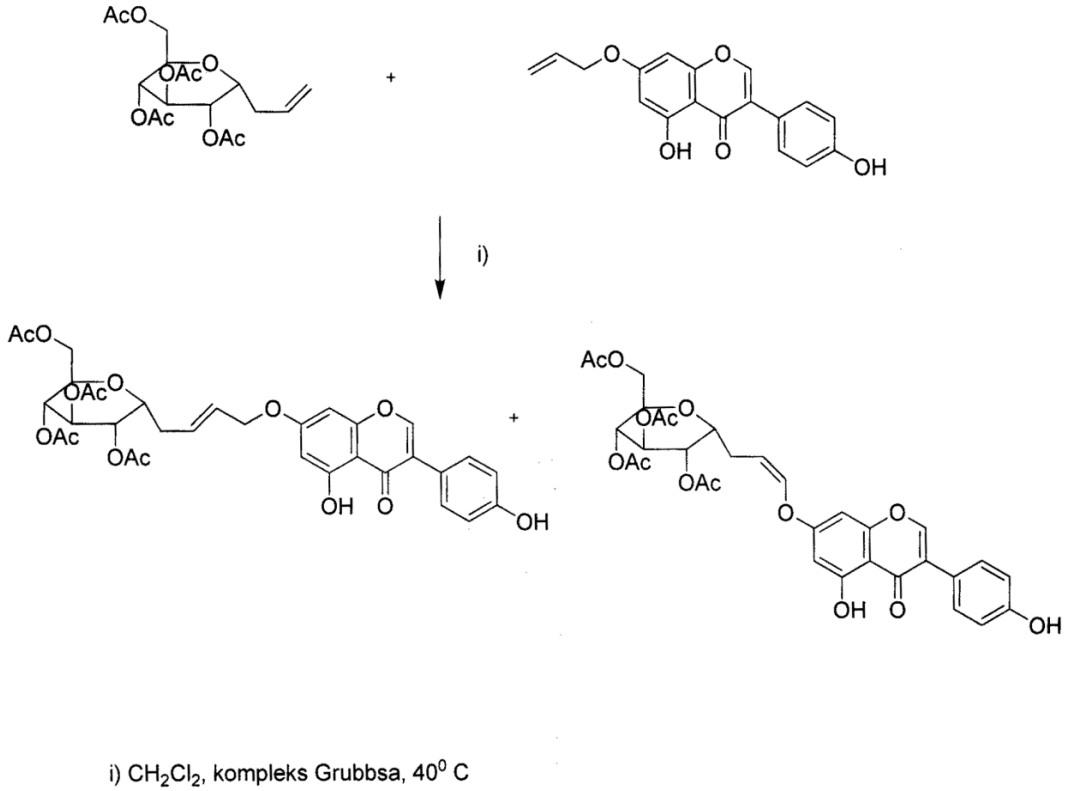
Mieszaninę C-glikozydu (1 mmol, 277 mg), soli tetrabutyloamoniowej genisteiny (1,05 mmol, 537 mg) DMF (4 ml) ogrzewano w temperaturze 45-50°C do momentu całkowitego rozpuszczenia soli (około 4 godzin). Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną wlano do wody i ekstrahowano chloroformem. Ekstrakt suszono siarczanem sodowym zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem w wyparce rotacyjnej, zaś pozostałość oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej (eluent: chlorek metylenu-aceton (50:1 - 30:1) Uzyskano 429 mg produktu (92% wydajności) w postaci białych kryształów.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): δ (ppm) 1,27 (d, 3H, J=6,6 CH_3 ram.), 1,68-2,05 (m, 4H, CH_2CH_2), 2,10 (s, 3H, CO-CH_3), 3,91 (dq, 1H, J=6,6, J=4,6 H-5), 3,95 (t, 2H, J=6,1, OCH_2), 4,24 (m, 1H, H-1), 4,91 (m, 1H, H-4), 5,78 (ddd, 1H, J=10,3, J=3,6, J=2,0 H-3), 5,94 (ddd, 1H, J=10,3, J=10,3, J=2,1, J=1,1 H-2), 6,29 (s, 1H, 4'-OH), 6,37 (dd, 2H, H-6g, H-8g, J=7,8, J=2,4), 6,84 (d, 2H, H-3'g, H-5'g, J=8,7), 7,34 (d, 2H, H-2'g, H-6'g ,1=8,7), 7,84 (s, 1H, H-2g), 12,80 (s, 1H, 5g-OH).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ(ppm) 16,82(CH_{3ram}), 21,19($\underline{CH_3}$CO), 25,23($CH_2\underline{CH_2}CH_2$), 29,91($\underline{CH_2}CH_2CH_2$), 68,24(C-5), 68,72(CH_2O), 69,53(C-4), 69,55(C-1), 92,82(C-8g), 98,64(C-6g), 106,12(C-4a), 115,67 (C-3'g, C-5'g), 122,52(C-1'g) 122,85(C-3), 123,71(C-3g), 130,22(C-2'g, C-6'g) 133,82(C-2), 152,80 (C-2g), 156,26(C-4'g), 157,94(C-8a), 162,50(C-5g), 164,99(C-7g) 171,00(C=O), 180,94(C-4g)

P r z y k ł a d 2.

Otrzymywanie 7'-O-(4''-(2,3,4,6-tetra-O-acetylo-glukopiranozylo)-but-2''-en-1''yl)-genisteiny.(**C2**)



Schemat 2. Otrzymywanie glikokoniugatu w reakcji metatezy

Przy gotowanie katalizatora kompleksu Grubbsa w parafinie:

Parafinę (1,385 g) oraz kompleks Grubbsa (0,112 g; 0,1361 mmol) naważono do kolbki którą następnie zamknięto za pomocą septy. Wypompowano powietrze (obniżono ciśnienie do około 50 mmHg) i wprowadzono argon - operację powtórzono trzy razy. Kolbkę umieszczono na łaźni ultradźwiękowej, ogrzanej do około 60°C, co spowodowało stopienie parafiny i homogenizację całego układu.

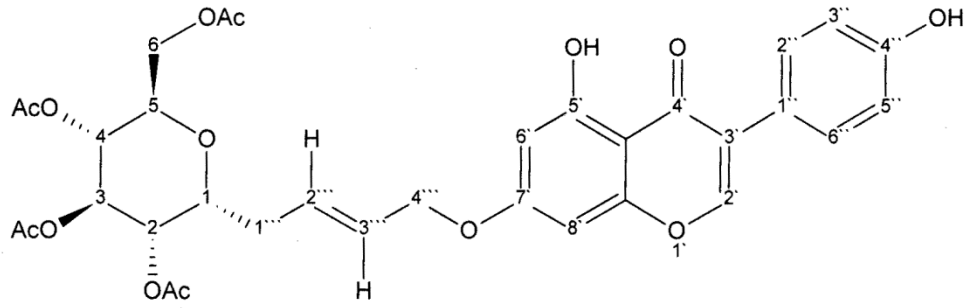
Po ochłodzeniu otrzymano brązowy wosk, który przechowywano w temperaturze pokojowej w atmosferze powietrza. Nie zaobserwowano utraty właściwości katalitycznvch tak zabezpieczonego kompleksu Grubbsa po 6 miesiącach.

Stosowane stężenie kompleksu Grubbsa w parafinie: 0,098 mmol / 1g mieszanin)

Synteza 7'-O-(4''-(2,3,4,6-tetra-O-acetylo-glukopiranozylo)-but-2''-en-1''-yl)-genisteiny:

1-allilo-1-deoksy-2,3,4,6-tetra-O-acetylo-D-glukopiranozyd, (84 mg; 0,226 mmola) oraz 7-O-allilo-genisteinę (127 mg, 0,41 mmol; 1,8 eq) naważono do kolbki i rozpuszczono w dichlorometanie (10 cm^3). Kompleks Grubbsa w parafinie (55 mg; 0,0054 mmola; 0,024eq) umocowano na wewnętrznej ściance chłodnicy zwrotnej, którą zamontowano na kolbkę zawierającą roztwór z reagentami. Całość zamknięto za pomocą septy. Wypompowano powietrze (obniżono ciśnienie do około 50 mmHg) i wprowadzono argon - operację powtórzono trzy razy. Mieszaninę ogrzewano na łaźni wodne). Reakcja rozpoczęła się, gdy kompleks Grubbsa w parafinie został spłukany przez wrzący rozpuszczalnik z chłodnicy zwrotnej. Po 3 godzinach, ochłodzono mieszaninę do temperatury pokojowej. Odsączono osad homodimeru, przemyto na sączku chlorkiem metylenu. Połączone przesącze zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem w wyparce rotacyjnej. Otrzymano 70 mg kremowego ciała stałego w postaci mieszanin) homodimerów cukru i glikokoniugatów genisteiny. Składniki mieszaniny rozdzielono metodą chromatografii kolumnowej. Układy eluujące: (heksan: wydzielono parafinę), (heksan : octan etylu 5 : 1 v/v, wydzielono substraty), (heksan : octan etylu 2 : 1 wydzielono produkty reakcji w następującej kolejności: glikokoniugaty genisteiny (64 mg, wydajność 43% mieszanina izomerów E : Z = 2,5 : 1) oraz homodimer cukrowy (6 mg, wydajność 8%).

E izomer)
7'-O-(1'''-C-(2.3.4.6-tetra-O-acetylo-α-D-glukopiranozylo)-but-2'''-en-4'''-ylo)-genisteina



Izomer E

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-D6) δ ppm: 12.94 (**OH-5`** ; s ; 1H) 9.60 (**OH-4``** ; s ; 1H ) 8.39 ( **H-2`** ; s ; 1H ) 7.39 (**H-2`` , H-6``** ; d ; $J_{11`-12`,\ 15`-14`}$ = 8.8 ; 2H ) 6.83 ( **H-3``, H-5``** ; d ; $J_{12`-11`,\ 14`-15`}$ = 8.8 ; 2H) 6.65 (**H-8`** ; d ; $J_{5`-7`}$ = 2.4 ; 1H ) 6.40 ( **H-6`** ; d ; $J_{7`-5`}$ = 2.4 ; 1H) 5.87 (**H-3```** ; dt ; $J_{3``-2``}$ = 14.6 ; $J_{3``-4``}$ = 5.4 × 2 ; 1H) 5.81 (**H-2```** ; ddd ; $J_{2``-3``}$ = 14.6 ; $J_{2``-1L``}$ = 6.8 ; $J_{2``-1``a}$ = 6.3 ; 1H) 5.30 (**H-3** ; dd ; J_{3-2} = 8.8 ; J_{3-4} = 8.8 ; 1H) 4.91 (**H-2** ; dd ; J_{2-3} = 8.8 ; J_{2-1} = 5.9 ; 1H) 4.86 (**H-4** ; dd ; J_{4-3} = 9.1 ; J_{4-5} = 9.1 ; 1H) 4.64 (**H-4``** ; d ; $J_{4``-3``}$ = 5.4 ; 2H) 4.21-4.13 (**H-1, H-6a** ; m ; 2H) 4.00-3.93 (**H-5, H-6b** ; m ; 2H) 2.71 (**H-1```a** ; m ; $J_{1``a-1``b}$ = 15.0 ; $J_{1``a-2``}$ = 10.9 ; $J_{1``a-1}$ = 7.6 ; 1H) 2.32 (**H-1```b** ; m ; 1H) 2.03; 2.00; 1.99; 1.98 (**CH_3-** ; 12H)

^{13}C NMR (300 MHz, DMSO-D6) δ ppm:
180.37 (**C-4`** ) 170-169 (**C=O × 4, C-6`**) 164.12 (**C-5`**) 161.74 (**C-4``**) 157.49 (**C-9`** ) 154.28 ( **C-2`**) 130.67 (**C-2```**) 130.13 (**C-2``, C-6``**) 126.79 (**C-3```**) 122.51 (**C-3`**) 121.04 (**C-1``** ) 115.08 (**C-3``, C-5``**) 105.42 (**C-10`** ) 98.49 ( **C-8`**) 92.96 (**C-6`**) 71.13 (**C-1**) 69.81 (**C-2**) 69.46 (**C-3**) 68.38 (**C-4, C-5**) 68.79 (**C-4```**) 61.80 (**C-6**) 28.42 (**C-1```**) 20.45 (**CH_3- × 4**)

Izomer Z

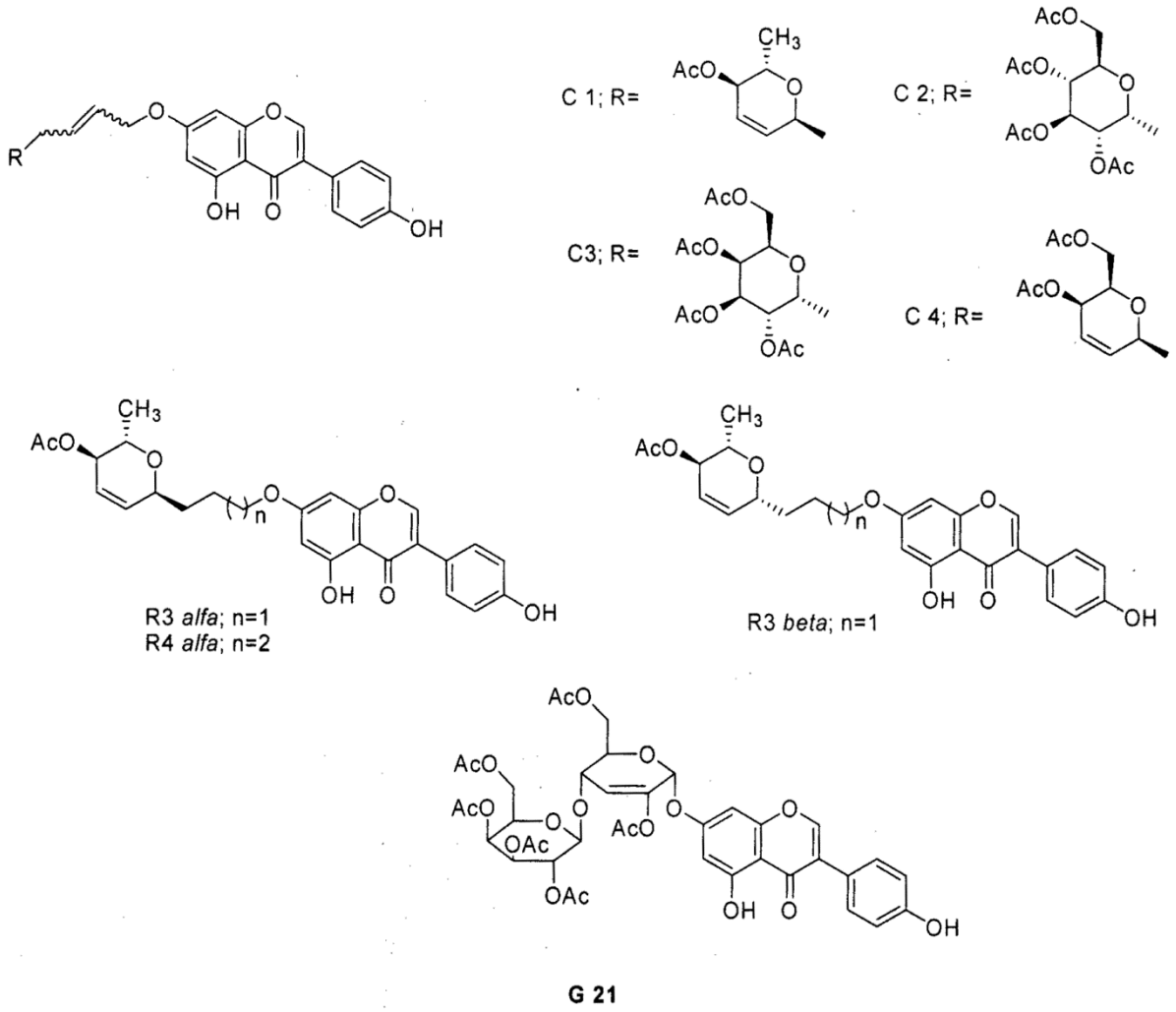
^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-D6) δ ppm 12.96 (**OH-5`** ; s ; 1H) 9.60 (**OH-4``** ; s ; 1H ; zakryty ) 8.40 ( **H-2`** ; s ; 1H ) 7.39 (**H-2`` , H-6``** ; 2H ; zakryty) 6.83 (**H-3``, H-5``** ; 2H ; zakryty) 6.69 (**H-8`** ; d ; $J_{5`-7`}$ = 2.35 ; 1H ) 6.45 ( **H-6`** ; d ; $J_{7`-5`}$ = 2.35 ; 1H) 5.76 (**H-3```** ; dt ; $J_{3``-2``}$ = 10.50 ; $J_{3``-4``}$ = 5.40 × 2 ; 1H) 5.63 (**H-2```** ; ddd ; $J_{2``-3``}$ = 10.50 ; $J_{2``-1``b}$ = 6.80 ; $J_{2``-1``a}$ = 6.30 ; 1H) 5.37 (**H-3** ; dd ; J_{3-2} = 9.10 ; J_{3-4} = 9.10 ; 1H) 4.94 (**H-2** ; dd ; J_{2-3} = 9.10 ; J_{2-1} = 5.87 ; 1H) 4.86 (**H-4** ; 1H ; zakryty) 4.80 (**H-4```** ; d ; $J_{4``-3``}$ = 5.40 ; 2H) 4.21-4.13 (**H-1, H-6a** ; m ; 2H) 4.00-3.93 (**H-5, H-6b** ; m ; 2H) 2.82 (**H-1```a** ; m ; $J_{1``a-1``b}$ = 15.26 ; $J_{1``a-2``}$ = 9.39 ; $J_{1``a-1}$ = 9.39 ; 1H) 2.38 (**H-1```b** ; m ; 1H) 2.02; 2.01; 1.99; 1.98 (**CH_3-** ; 12H)

^{13}C NMR (300 MHz, DMSO-D6) δ ppm: 180.37 (**C-4`** ; zakryty) 170-169 (**C=O × 4, C-6`**) 164.23 (**C-5`**) 161.74 (**C-4``** ; zakryty$^{x}$ ) 157.42 ( **C-9`** ) 154.28 ( **C-2`** ; zakryty ) 130.13 (**C-2``, C-6``** ; zakryty^{x}) 129.98 (**C-2```**) 126.00 (**C-3```**) 122.51 (**C-3`** ; zakryty^{x}) 121.04 (**C-1``** ; zakryty$^{x}$ ) 115.08 (**C-3``, C-5``** ; zakryty^{x}) 105.42 (**C-10`** ; zakryty$^{x}$ ) 98.49 ( **C-8`** ; zakryty^{x}) 93.12 (**C-6`**) 71.55 (**C-1**) 69.90 (**C-2**) 69.46 (**C-3** ; zakryty^{x}) 68.38 (**C-4, C-5** ; zakryty^{x}) 64.89 (**C-4```**) 61.80 (**C-6** ; zakryty^{x}) 24.58 (**C-1```**) 20.45 (**CH_3 × 4**; zakryty^{x})

^{x} Termin „zakryty" zastosowano w przypadku analizy widm NMR mieszanin izomerów E:Z, gdy pik izomeru E (występującego w mieszaninie w przewadze) zakrywał pik izomeru Z. Przypisanie sygnałów izomeru Z odbywało się wtedy na podstawie widm korelacyjnych 2D NMR: ^{1}H-^{1}H cosy oraz ^{1}H-^{13}C hetcor.

Zastosowanie złożonych C-glikozydów pochodnych genisteiny w chemioterapii przedstawiono na przykładach poniżej.

Jako związki do badań zastosowano pochodne przedstawione na schemacie 3.



Schemat 3. Modele do badań biologicznych

Wpływ flawonoidów na cykl komórkowy badano przy użyciu cytometru przepływowej. Indeks mitotyczny w komórkach barwionych DAPI badano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego.

P r z y k ł a d 3

Hamowanie proliferacji komórek nowotworowych *in vitro*.

Glikokoniugaty zawierające resztę acylowanego cukru nienasyconego połączoną poprzez łącznik (spacer) z genisteiną w pozycji 7 wykazują działanie cytotoksyczne i cytostatyczne w odniesieniu do linii komórkowych wywodzących się z nowotworów jelita grubego i gruczołu krokowego przy stężeniu niższym niż genisteina.

Proliferację komórek rosnących w obecności różnych stężeń genisteiny i jej glikokoniugatów badano z użyciem MTT [bromek 3-4,5-dietylotiazolo-2-ilo)-2,-difenylotetrazoliowy].

T a b e l a 1
Hamowanie proliferacji komórek wyrażone wartością IC 50 (IC50 - stężenie substancji, przy którym proliferacja komórek ulega zahamowaniu do połowy wartości kontrolnej).

Linia komórkowa i jej pochodzenie	Badany związek	IC50 [μM]
DU145 (rak stercza)	Genisteina	47,29±11,78
	C1	29,61±15,45
	C2	9,50±2,21
	C3	25,43±11,58
	C4	113±59
	R3-*alfa*	15,47±9,69
	R4-*alfa*	19,24±7,46
	R3-*beta*	19,24±5,56
HCT116 (rak jelita grubego)	Genisteina	34,90±9,84
	C1	8,99±2,41
	C2	4,20±1,11
	C3	4,31±2,55
	C4	64,63±17,93
	R3-*alfa*	6,86±1,07
	R4-*alfa*	6,66±1,19
	R3-*beta*	10,62±6,27

P r z y k ł a d 4

Hamowanie cyklu komórkowego

Badania cyklu komórkowego z użyciem cytometru przepływowego wskazują, że niektóre glikokoniugaty-genisteiny są zdolne do hamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M przy niższym stężeniu niż genisteina. Szczególnie silne hamowanie cyklu komórkowego po 24 godzinnym traktowaniu komórek 20 μM stężeniem badanych związków obserwuje się dla związków R3 i R4. Nieznaczne hamowanie cyklu w fazie G2/M obserwuje się dla związku C2. Dla związków: C2, C3, R3, R4 obserwuje się wzrost odsetka komórek hipodiploidalnych, co wskazuje, że w komórkach ulega nasileniu proces apoptozy. Spośród badanych związków nieznaczny blok mitotyczny wywołuje związek C2. Pozostałe związki nie powodują zmian indeksu mitotycznego. Oznacza to, ze blok G2/M, obserwowany po traktowaniu komórek związkami R3 i R4 zachodzi w fazie G2.

T a b e l a 2
Indeks mitotyczny w komórkach linii HCT 116 wyznaczany po 24 godzinnym traktowaniu pochodnymi genisteiny w stężeniu 20 μM.

Kontrola	1,8%
Genisteina	1,7%
C1	2,2%
C2	6,3%
C3	3,3%
C4	1,2%
R3-*alfa*	2,3%
R4-*alfa*	1,3%
R3-*beta*	3,3%

P r z y k ł a d 5

Aktywność przeciw nowotworowa glikokoniugatu genisteiny (R3-α) w podaniu doguzowym na modelu mysiego czerniaka B16

Związki G21 i (R3-α) - rozpuszczono w DMSO i 0,9%NaCl (10%+90%) i sonifikowano 15-30 mm, w ten sposób, aby stężenie końcowe wynosiło 1 mg/50 µl.

Myszy

Myszy szczepu C57B1/6 (samiczki) zaszczepiono podskórnie w prawy bok komórkami mysiego czerniaka B16 (3 x 10^5 mysz).

Dawkowanie

W eksperymencie użyto G21 i (R3-α) w dawce 1 mg /50 µl/ guz /dzień. Grupa kontrolna otrzymywała mieszankę rozpuszczalnika (DMSO) z 0,9%NaG. Oba badane związki były podawane doguzowo w dniach 9-14 po wszczepieniu nowotworu.

Ocena aktywności

Parametrem oceny działania przeciw nowotworowego związku była objętość guza i parametr TGI (% zahamowania wzrostu guza). Oceniano także masę ciała myszy.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w objętości guzów między grupami badanymi a grupą kontrolną. Poniższa tabelka obrazuje kinetykę wzrostu guzów w trakcie eksperymentu. Jednakże zaobserwowano znaczne, dochodzące do 50% zahamowanie wzrostu guzów (TGI) pod wpływem (R3-α).

T a b e l a 3

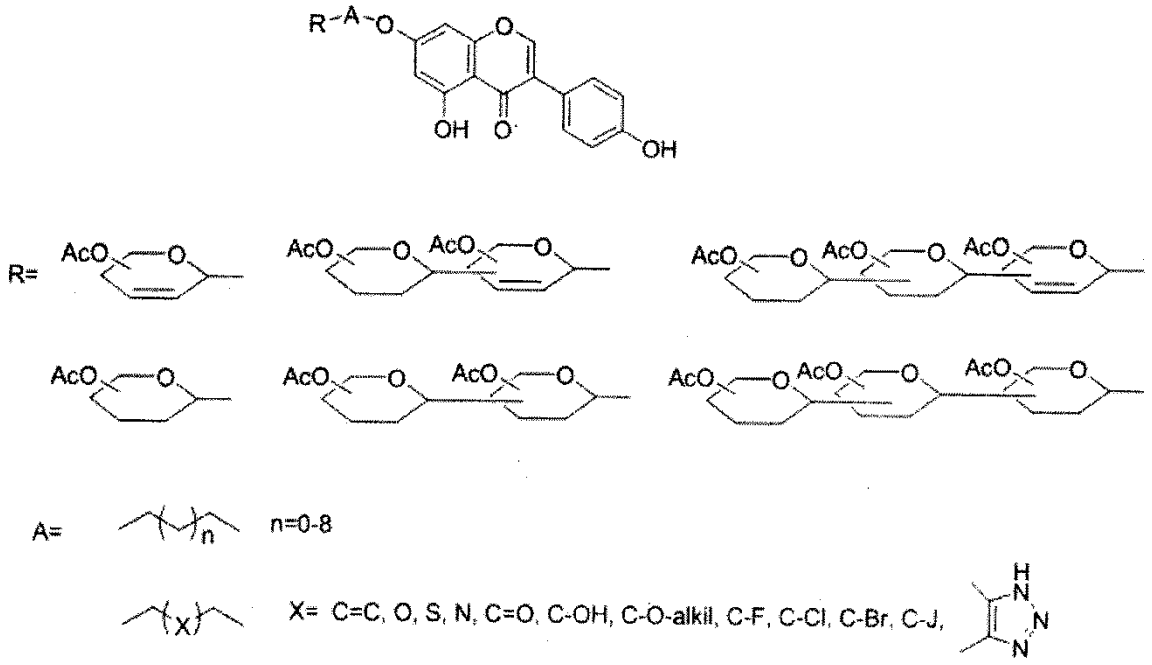
Kinetyka wzrostu guzów mysiego czerniaka B16

Dzień eksperymentu	Objętość guzów [mm^3]		
	Kontrola	G21	R3-α
8	10	0	0
10	250	100	50
12	400	300	150
14	1100	600	500
16	1600	1200	700

Zastrzeżenie patentowe

Złożone C-glikozydy pochodne genisteiny o działaniu cytotoksycznym i antyproliferacyjnym o strukturze przedstawionej wzorem I, gdzie jednostka cukrowa którą stanowi per-O-acylowany mono- di- lub trisacharyd, 2,3-nienasycony mono-, di-, lub trisacharyd połączona jest wiązaniem C-glikozydowym z łącznikiem R zawierający od dwu do dziesięciu atomów węgla w którym grupa funkcyjna A, to wiązanie podwójne, a łącznik związany jest wiązaniem 7-O-eterowym z genisteiną.

Rysunek



Wzór 1

Departament Wydawnictw UP RP
Cena 2,46 zł (w tym 23% VAT)