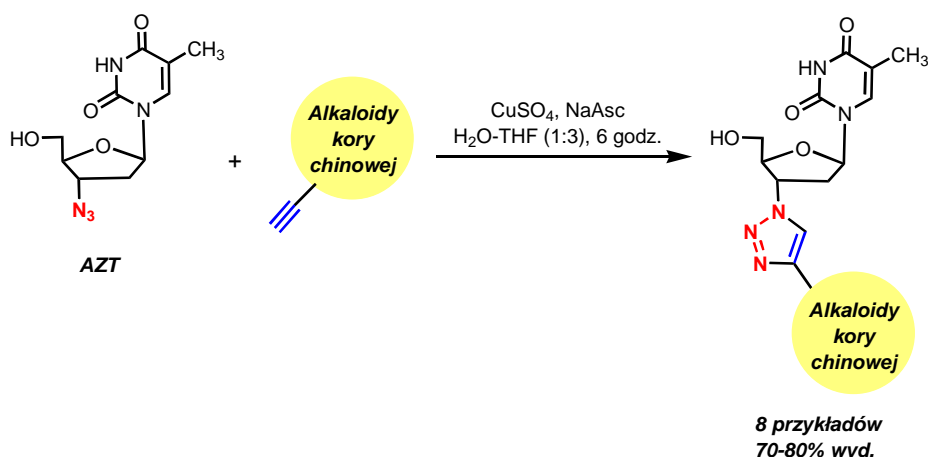


Streszczenie

Analogi nukleozydów znajdują szerokie zastosowanie w leczeniu chorób wirusowych i nowotworowych. Wśród nich główne miejsca zajmują 2',3'-dideoksynukleozydy (ddN), których ważnym przedstawicielem jest 3'-azydo-3'-deoksytymidyna (AZT). AZT, chociaż w oryginalnym zamierzeniu zsyntetyzowany został jako potencjalny środek przeciwnowotworowy, znalazł szerokie zastosowanie jako lek przeciwwirusowy (anty-HIV), a ostatnio znajduje coraz szersze zastosowanie ponownie jako lek przeciwnowotworowy, szczególnie w kombinacji z cisplatyną, metotreksatem i 5-fluorouracylem. Mechanizm działania ddN jako leków antywirusowych lub cytostatycznych wiąże się z ich przekształceniem wewnątrz komórki w aktywne biologicznie 5'-trifosforany, które działają jako inhibitory kompetycyjne odpowiednich enzymów w procesie replikacji (odwrotnej transkryptazy wirusa HIV lub polimerazy DNA), a w przypadku włączenia do rosnącego łańcucha DNA terminują jego syntezę z powodu braku grupy hydroksylowej w pozycji 3'. W ostatnich latach podejmowane są liczne próby zaprojektowania proleków ddN nie wymagających pierwszej fosforylacji.

Przedmiotem badań prezentowanej rozprawy doktorskiej była synteza, zbadanie aktywności cytotoksycznej oraz właściwości fluorescencyjnych nowej klasy połączeń – koniugatów nukleozydów z alkaloidami kory chinowej z zastosowaniem metod chemii "click".



W pierwszym etapie pracy przeprowadzono syntezę azydo-nukleozydów: 3'-azydo-3'-deoksytymidyny (AZT), 5'-azydo-5'-deoksytymidyny (5'-AZT), 5-fluoro-3'-azydo-2',3'-dideoksyurydyny (FAddU), 2-azydoadenozyny (2-N₃-A) oraz 2-azydo-N⁶-metyloadenozyny (2-N₃-N⁶-Me-A). Następnie otrzymano modyfikowane alkaloidy kory chinowej zawierające w swojej strukturze terminalne wiązanie potrójne: 10,11-didehydro- oraz 9-O-propargilo-

alkaloidy. Głównym założeniem prezentowanej pracy było opracowanie ogólnej metody syntezy adduktów nukleozydowo-alkaloidowych. W tym celu wykorzystano reakcję Huisgena katalizowaną jonami miedzi(I) (w skrócie: CuAAC), w której komponent azydowy stanowił analog nukleozydu, natomiast komponent alkinowy – modyfikowany alkaloid kory chinowej. Celem prowadzonych badań było również określenie aktywności cytotoksycznej otrzymanych związków metodą hodowli tkankowych komórek nowotworowych linii KB lub MCF-7. Dla każdego koniugatu wyznaczono parametr aktywności IC_{50} (stężenie inhibitorowe, ang. *inhibitory concentration*, czyli takie stężenie substancji testowanej, które hamuje w 50% patologiczne zmiany komórek nowotworowych) – im niższe jest IC_{50} tym aktywność związku wyższa. W ramach otrzymanych serii pochodnych najwyższą aktywność cytotoksyczną wykazuje koniugat 5-fluoro-3'-azydo-2',3'-dideoksyurydyny (FAddU) z 10,11-didehydrochininą (DDQn) dla którego wartość IC_{50} wynosi 0,13 $\mu\text{g/mL}$ i jest ona pięciokrotnie wyższa aniżeli aktywność stosowanego w medycynie leku przeciwnowotworowego – 5-fluorouracylu ($IC_{50} = 0,63 \mu\text{g/mL}$). Ponadto wysoką aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych wykazywały koniugaty: 5-fluoro-3'-azydo-2',3'-dideoksyurydyny z 9-O-propargilochinidyną ($IC_{50} = 0,85 \mu\text{g/mL}$), 3'-azydo-3'-deoksytymidyny z 10,11-didehydrochininą ($IC_{50} = 1,30 \mu\text{g/mL}$), 5'-azydo-5'-deoksytymidyny z 9-O-propargilochinidyną ($IC_{50} = 1,70 \mu\text{g/mL}$), 2-azydo- N^6 -metyloadenozyny z 10,11-didehydrochininą ($IC_{50} = 1,70 \mu\text{g/mL}$) oraz 5-fluoro-3'-azydo-2',3'-dideoksyurydyny z 9-O-propargilochinidyną ($IC_{50} = 1,70 \mu\text{g/mL}$).

Ponieważ alkaloidy chinowca wykazują silne właściwości fluorescencyjne, zbadano ich właściwości fluorescencyjne w acetonitrylu i buforze octanowym o $\text{pH} = 4$ oraz obliczono wydajności kwantowe fluorescencji. Uzyskane wyniki pokazały, że maksimum emisji zależy od użytego rozpuszczalnika oraz struktury związku, jednak najczęściej obserwowane było przy 360 nm i wzbudzeniu 320 nm (w acetonitrylu). Omawiane silne pasmo emisji pochodzi od fluoroforu – 6-metoksychinoliny obecnej w alkaloidach kory chinowej. Zastosowanie buforu octanowego z użyciem octanu (0,01 mol/L $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, $\text{pH} = 4$) miało na celu zbadanie, czy omawiane koniugaty mogą służyć do budowy sond fluorescencyjnych. Eksperyment potwierdził, iż emisja omawianych koniugatów zarejestrowana w buforze octanowym jest bardziej długofalowa (400÷450 nm), co ma istotne znaczenie, gdyż związki te mogą być wzbudzane w dalszym zakresie. Dla niektórych koniugatów zaobserwowano zmniejszenie intensywności emisji fluorescencji, prawdopodobnie jest to spowodowane przestrzennym ułożeniem części alkaloidowej, która oddziałuje z pierścieniem zasady azotowej nukleozydu. Wzbudzona reszta barwnika, zamiast fluoryzować, przekazuje energię

nukleozydowi przez co dochodzi do innej drogi dezaktywacji stanu wzbudzonego i wygaszania fluorescencji.

Przeprowadzano także syntezy połączeń 5'-amidofosforanów AZT z 10,11-didehydrochininą (DDQn). Nukleozydy o strukturze 5'-amidofosforanów mogą łatwiej przenikać przez fosfolipidową membranę komórkową, a po wnikięciu do wnętrza komórki ulegają hydrolizie do 5'-fosforanów, przez co nie muszą ulegać procesowi pierwszej fosforylacji. Stąd idea syntezy potencjalnych proleków z maskowaną grupą fosforanową, do których zaliczamy omawiane koniugaty. W oparciu o ten pomysł zaplanowano syntezę fosforylowanych komponentów alkaloidowych, a dokładnie 9-*O*-(amido)fosforanów 10,11-didehydrochininy, które w wyniku reakcji sprzęgania z AZT dały nowe koniugaty. Dodatkowo, komponent alkaloidowy w postaci 9-*O*-(amido)fosforanu DDQn stanowi nową klasę związków wcześniej nie występującą w literaturze.

W pracy przedstawiono wyniki badań nad syntezą kluczowych koniugatów – analogów nukleozydów z modyfikowanymi alkaloidami kory chinowej, które otrzymano na drodze 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowanej jonami Cu(I) w oparciu o koncepcję *click chemistry* opracowaną przez Sharpless'a. Prawie wszystkie przebadane koniugaty, zsyntetyzowane w ramach niniejszej pracy, wykazywały wysoką lub umiarkowaną aktywność cytotoksyczną, a zatem stanowią one cenny materiał badawczy do rozwiniętych badań cytostatycznych (*in vitro* oraz *in vivo*). Ponadto, otrzymane koniugaty z uwagi na wolną grupę hydroksylową w pozycji 3' lub 5' mogą zostać włączone do nowo syntetyzowanego łańcucha DNA (RNA) odpowiednio na końcu 5' lub 3'. Natomiast aromatyczny pierścień chinolinowy, dzięki swej płaskiej strukturze, umożliwia im wiązanie z DNA poprzez wsunięcie się pomiędzy pary zasad podwójnej helisy, czyli tzw. interkalację. Taka indukowana zmiana konformacyjna lub uszkodzenie DNA są wykorzystywane w nowoczesnych sposobach walki m.in. z nowotworami. Potwierdzono, iż silne właściwości fluorescencyjne, dzięki fluoroforowi chininowemu, stały się cechą charakterystyczną otrzymanych koniugatów i mogą być wykorzystywane do budowy oligo(deoksy)nukleotydowych sond fluorescencyjnych (markerów fluorescencyjnych).