

Tytuł pracy doktorskiej

**Synteza nowych pochodnych gemcytabiny o charakterze pronukleotydów
i hybryd molekularnych oraz badania ich aktywności cytotoksycznej**

*Synthesis of new gemcitabine derivatives as pronucleotides and molecular hybrids and studies
of their cytotoxic activity*

mgr Roksana Trznadel

Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim

Choroby nowotworowe stanowią jedno z największych zagrożeń cywilizacyjnych współczesnego świata. Niestety ich leczenie jest najczęściej utrudnione z racji wysokich kosztów, a także niskiego stopnia efektywności. Stosowanie cytostatyków stanowi jeden ze sposobów radzenia sobie z tym nierównym przeciwnikiem. Związek nazywa się cytotoksycznym, kiedy prowadzi do uszkodzeń podstruktury czy funkcji komórek. Niezoderżalnie wiąże się on również z terminem – toksyczność. Z racji ubogiej swoistości celu działania, podaż cytostatyków związana jest ze szkodliwym wpływem na cały organizm. Stąd też, jako święty Graal leczenia cytostatykami określa się strategię selektywnego dostarczania medykamentu wyłącznie do komórek nowotworowych. W świetle generowania leczniczych problemów zrozumiałe jest, iż istnieje coraz to większe zapotrzebowanie na skuteczniejsze cytostatyki nowej generacji.

Mając na uwadze powyższe, arbitralny cel chemików medycznych stanowi projektowanie bardziej wyrafinowanych, bezpieczniejszych i lepiej ukierunkowanych farmaceutyków. *Clue* tego typu podejść obejmuje syntezę związków wykazujących równowagę między stabilnością chemiczną a ich reaktywnością. Jedną z najatrakcyjniejszych strategii poszukiwania takich leków obejmuje modyfikacje dobrze już poznanych farmaceutyków, bowiem pamiętać należy, że najczęściej nawet subtelna zmiana w strukturze wiodącej leku prowadzi do rozległych zmian w profilu biologicznym. W przypadku chorób nowotworowych o charakterze wieloczynnikowym istotnym jest poszukiwanie takich rozwiązań, które pozwolą na odpowiednie wchłanianie, dystrybucję, metabolizm, a także wydalanie wraz z zachowaniem skutecznej aktywności farmakologicznej oraz niższym stopniem toksyczności.

Wśród cytostatyków przeciwnowotworowych ogromnym zainteresowaniem naukowców cieszą się antymetabolity. Zalicza się do nich analogi zasad azotowych, nukleozydów pirymidynowych i purynowych oraz ich nukleotydy. Jako fałszywy podstawnik kanonicznego zestawu bloków budulcowych DNA są one zdolne do wywoływania zakłóceń wybranych szlaków przemian metabolicznych. Jeden z ciekawszych reprezentantów ww. grupy cytostatyków stanowi gemcytabina (2'-deoksy-2',2'-difluorocytydyna, dFdC). Nurt badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej ukierunkowany był właśnie na ten analog nukleozydowy. Cel badawczy stanowiła

optymalizacja struktury chemicznej gemcytabiny wraz z podjęciem się próby korelacji wpływu danej modyfikacji strukturalnej na aktywność cytotoksyczną.

Gemcytabina jest jednym z najczęściej stosowanych chemioterapeutyków w przypadku leczenia zaawansowanych nowotworów złośliwych. Wyjątkowość gemcytabiny wyróżniająca ją wśród pozostałych analogów nukleozydów polega na skutecznym leczeniu guzów litych. Jednakże, aby gemcytabina wykazywała antyproliferacyjne działanie musi zostać przekształcona, tak jak każdy nukleozyd, do aktywnej postaci 5'-*O*-trifosforanu. Zasadniczy mechanizm inhibicyjny gemcytabiny polega na tzw. maskowanej terminacji łańcucha DNA. W wyniku inkorporacji 5'-*O*-trifosforanu do wydłużającej się nici łańcucha deoksyrybonukleotydu, polimeraza DNA jest zdolna do włączenia tylko jednej nukleotydujnej jednostki, co skutkuje zahamowaniem elongacji łańcucha. Niestety natura analogów nukleozydów zakłóca efektywność przebiegu doustnej aplikacji ze względu na ich słabą przepuszczalność jelitową, szybkie metaboliczne ścieżki dezaktywacji czy wysoki efekt pierwszego przejścia. Tak więc, udział deaminazy cytydynowej wyraźnie ogranicza stosowalność gemcytabiny na drodze pozajelitowej w praktyce klinicznej. Innym istotnym ograniczeniem klinicznej stosowalności gemcytabiny oprócz biodostępności i krótkiego okresu półtrwania stanowi wysoka toksyczność, która generowana jest przez duże jednorazowe wlewy terapeutyczne medykamentu. Ponadto przypisuje się jej słaby stopień konwersji do aktywnych di- i trifosforanów w wyniku zakłóceń strategicznej dla całego procesu pierwszej fosforylacji, a także ograniczony wychwyty przez transportery w komórkach nowotworowych. Co ważne, zaburzenie skuteczności terapeutycznej gemcytabiny zostaje pogłębione poprzez zdolność komórek nowotworowych do nabywania oporności, do której zalicza się spadek ilości enzymów przemian anabolicznych z jednoczesną nadekspresją kluczowego dezaktywującego enzymu oraz niedobór białek transporterów nukleozydowych.

Stąd też jak najbardziej uzasadnionym jest poszukiwanie optymalnych modyfikacji strukturalnych gemcytabiny omijających wszystkie nadmienione niedogodności, które w konsekwencji prowadzą do wzrostu klinicznego sukcesu. Na ten sukces składa się między innymi poprawa parametrów farmakokinetycznych i toksykologicznych, co często idzie w parze ze zwiększeniem aktywności biologicznej analogu nukleozydu.

W pracy przedstawione zostały wyniki prac nad syntezą 5'-*O*-fosforanów i hybryd molekularnych gemcytabiny w postaci dupleksów nukleozydów. Zastosowanie pronukleotydydowego podejścia prowadzi do wyeliminowania istotnych mechanizmów oporności gemcytabiny takich jak transport dkomórkowy, a także procesy biochemiczne przebiegające w przestrzeni wewnątrzkomórkowej, które kontrolowane są przez kinazy. Z kolei obie zaadaptowane koncepcje generują zrównoważoną biodostępność oraz utratę swoistości substratowej w kierunku destrukcyjnej aktywności deaminazy cytydynowej. Do badań nad 5'-*O*-amidofosforanami i 5'-*O*-fosforanotriestrami zaangażowano udoskonalone warunki z użyciem aktywowanego di(1,2,4-triazolo)fosforanu 4-chlorofenylu jako czynnika fosforylującego, co pozwoliło otrzymać zaplanowane aranżacje z dobrymi wydajnościami z bogatym wachlarzem substratowym (m.in. nośnik alkiloaminowy z nasyconym

i nienasyconym łańcuchem, ester metylowy L-alaniny, metformina, metronidazol, chinina, cholesterol) i łatwością eksperymentalną. W toku badań opracowano warunki skutecznej chemo- i regioselektywnej 5'-*O*-amidofosforylacji z zastosowaniem obniżonego zakresu temperaturowego, niemniej jednak ustalono, że faworyzowane jest podstawienie w pozycji 3', prawdopodobnie z racji zmiany konformacji pierścienia w kierunku formy C3'-*endo* stanowiącej skutek wpływu geminalnie usytuowanych fluorowych podstawników w pozycji 2'. Dodatkowo, przeprowadzano oksydatywną aminację w tzw. reakcji Athertona-Todda z wykorzystaniem H-fosfonianu difenyłu. W przypadku syntezy dinukleozydowych biokoniugatów stosowano 1,3-dipolarną cykloaddycję Huisgena azydek-alkin katalizowaną jonami miedzi(I) (CuACC, ang. *copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*) generującą 1,4-dipodstawiony-1,2,3-triazol.

Struktura nowo zsyntetyzowanych funkcjonalizacji gemcytabiny została potwierdzona na podstawie analizy widm ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P NMR oraz ESI-MS/MALDI-QTOF-MS.

Kolejno, we współpracy z zespołem badawczym dra Piotra Ruskowskiego z Zakładu Farmakologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu przeprowadzono wstępną ewaluację biologiczną nowo zsyntetyzowanych pochodnych gemcytabiny. Aktywność cytotoksyczna określona została z udziałem testu SRB na wybranych liniach komórkowych: raka szyjki macicy (HeLa), raka nosogardzieli (KB), niedrobnokomórkowego raka płuc (A549), raka mózgu (glejaka wielopostaciowego) (U87), raka wątrobowokomórkowego (HepG2), a także linii zdrowych komórek ludzkich fibroblastów skórnych (płodowych) (HDF).

Wyniki badań pokazały, że aranżacja 3'-*O*-*tert*-butoksykarbonylo-4-*N*-benzyloksykarbonylo gemcytabiny implikuje najlepsze aktywności inhibitorowe, co tłumaczy się wyważoną dostępnością i dystrybucją. Dodatkowo, wykazano zależność najniższych wartości stężenia inhibitorowego IC_{50} od obecności następujących grup maskujących na centrum fosforanowym: 4-chlorofenyłu, 2,2,2-trifluoroetylu, estru metylowego L-alaniny, a także wariantu z niepodstawioną funkcją amidową. Z kolei w przypadku dinukleozydowych modyfikacji odnotowano wyraźny wzrost aktywności cytotoksycznej w kierunku pochodnych z *estro*-metylenotriazolowym łącznikiem w porównaniu do metylenotriazolowych odpowiedników. Z wykorzystaniem metod analizy statystycznej ustalono, iż każdy z zaprojektowanych analogów wykazuje wzrost wartości współczynnika podziału $\log P$, przy czym ocena trwałości chemicznej reprezentatywnych pochodnych przeprowadzona w warunkach hydrolizy chemicznej w układach buforowych o zróżnicowanym pH sugeruje, iż zrównoważony charakter lipofilowo-hydrofilowy przypisuje się funkcjonalizacjom z $\log P < 3$. Co ważne, wykazano podatność zsyntetyzowanych 5'-*O*-fosforanów do uwolnienia protekcji z reszty fosforanowej na drodze hydrolizy chemicznej w kwasowym/zasadowym medium. Dodatkowo, wybrane hybrydowe analogi inkubowano z komórkami HeLa celem wstępnej oceny ścieżki przemian metabolicznych. Analiza lizatów potwierdziła enzymatyczny przebieg rozpadu obu typów łącznika z uwolnieniem gemcytabiny.

Przeprowadzone prace eksperymentalne w ramach niniejszej pracy doktorskiej dowiodły słuszności postawionego na wstępie badań celu, bowiem 98 z 158 zsyntetyzowanych końcowych

związków przypisać można poprawę parametru cytotoksyczności, z czego aż 7 pochodnych cechuje bardzo wysoki potencjał terapeutyczny z najwyższą wartością indeksu SI = 13,76 dla biokonjugatu gemcytabiny z metronidazolem.

Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim

Cancer stands as one of the most pressing civilisational threats in the modern world. Regrettably, its treatment often proves challenging, primarily due to exorbitant costs and limited efficacy. One potential approach to address this problem involves the utilisation of cytostatic drugs. These compounds exert their effects by damaging the substructure or functionality of cells, a process also linked with toxicity. However, their usage is marred by a broad impact on the entire body owing to their low specificity towards intended targets. Consequently, achieving selective delivery of drugs to cancerous cells represents the holy grail of cytostatic treatment strategies. Given the persisting therapeutic hurdles, there is an escalating demand for the development of more effective next-generation medication.

Considering the aforementioned points, the overarching objective of medicinal chemists is to design more sophisticated, safer, and better-targeted drugs. Achieving a balance between chemical stability and reactivity in compound synthesis stands as the crux of this endeavour. One of the paramount concepts entails the modification of well-established drugs. It is important to acknowledge that even subtle alterations to the primary structure of a drug can lead to significant changes in its biological profile. In the context of multifactorial cancers, the quest for solutions must encompass considerations of optimal absorption, distribution, metabolism, and excretion, alongside the pursuit of enhanced pharmacological efficacy and reduced toxicity.

Among anticancer drugs, antimetabolites hold significant allure. These encompass pyrimidine and purine nucleosides, nucleotides, or base analogs capable of disrupting selected metabolic pathways by masquerading as false substituents of canonical DNA building blocks. One of the most compelling representatives of these drugs is gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine, dFdC). The focal point of this doctoral thesis revolved around this nucleoside analogue. The research aimed to optimise the chemical structure of gemcitabine and explore the correlation between structural modifications and cytotoxic activity.

Gemcitabine stands as one of the most frequently utilised antimetabolites in the treatment of malignant tumours. Among other nucleoside analogues, gemcitabine's uniqueness lies in its effectiveness in treating solid tumours. However, akin to every nucleoside, dFdC must undergo conversion into the active form of 5'-*O*-triphosphate to exhibit cytotoxicity. The primary inhibitory mechanism of gemcitabine is termed masked chain termination. Upon incorporation of 5'-*O*-triphosphate into the growing DNA strand, DNA polymerase can only accommodate a single nucleotide unit, leading to the inhibition of chain elongation. Unfortunately, the nature of nucleoside analogues hampers the effectiveness of oral administration due to their poor intestinal permeability, rapid metabolic deactivation pathways, and high first-pass effect. Consequently, cytidine deaminase

significantly restricts gemcitabine usage via the parenteral route. Aside from issues related to bioavailability and short half-life, the high toxicity resulting from large single therapeutic infusions of the drug poses another significant constraint on the clinical use of gemcitabine. Moreover, gemcitabine's efficacy is hampered by its poor conversion to the di- and triphosphate active forms due to disruptions in the initial phosphorylation process, as well as limited uptake by transporters in cancer cells. Importantly, the effectiveness of gemcitabine is further curtailed by cancer cells' ability to develop resistance, which involves a decrease in anabolic enzymes, an over-expression of key deactivating enzymes, and a deficiency of nucleoside transporter proteins.

Therefore, it is entirely justified to pursue optimal modifications of gemcitabine to circumvent all the aforementioned inconveniences, ultimately leading to an increase in clinical success. This success encompasses improvements in pharmacokinetic and toxicological parameters, which often coincide with enhancements in the biological activity of the nucleoside analogue.

This doctoral thesis presents the results of work on the synthesis of gemcitabine 5'-*O*-phosphates and molecular hybrids in the form of nucleoside duplexes. The utilisation of a pronucleotide approach leads to the elimination of important gemcitabine resistance mechanisms, such as intracellular transport, as well as biochemical processes occurring in the intracellular space, which are controlled by kinases. Both adapted concepts create a balanced bioavailability and lack of substrate specificity towards the destructive activity of cytidine deaminase. For the synthesis of 5'-*O*-phosphoramidates and 5'-*O*-phosphotriesters, activated 4-chlorophenyl phosphoroditriazolidine was used as the phosphorylation agent. These improved conditions allowed for the acquisition of planned compounds with good yields and substrate diversity (including saturated and unsaturated alkylamine carriers, L-alanine methyl ester, metformin, metronidazole, quinine, cholesterol), and experimental ease. Additionally, conditions for effective chemo- and regioselective 5'-*O*-phosphoroamidation were developed using a dipped temperature. Nevertheless, it was proven that substitution at the 3' position is favoured. This is likely the result of the change in ring conformation towards the C3'-endo form due to the presence of fluorine substituents at the 2' position. Furthermore, oxidative amination was performed (the so-called Atherton-Todd reaction) using diphenyl H-phosphonate. In the case of dinucleoside bioconjugates synthesis, Huisgen's 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition catalysed by copper(I) ions (CuACC) was employed. This reaction generates 1,4-disubstituted-1,2,3-triazole.

The structure of the newly synthesized gemcitabine derivatives was confirmed through the analysis of ¹H, ¹³C, ¹⁹F, ³¹P NMR, and ESI-MS/MALDI-QTOF-MS.

Moreover, preliminary biological evaluation of the obtained compounds was conducted by PhD Piotr Ruszkowski from Poznań University of Medical Sciences. The cytotoxic activity was determined using the sulforhodamine B assay in five human cancer cell lines: cervical (HeLa), nasopharyngeal (KB), lung (A549), brain (U87), liver (HepG2), and a normal dermal fibroblast cell line (HDF).

It was shown that the 3'-*O*-tert-butoxycarbonyl-4-*N*-benzyloxycarbonyl structure generates the best inhibitory activities, which can be explained by balanced availability and distribution. The presence

of 4-chlorophenyl, 2,2,2-trifluoroethyl, and L-alanine methyl ester as masking groups on the phosphate center, along with a set featuring an unsubstituted amide function, also yielded the lowest inhibitory concentration values (IC₅₀). In the case of dinucleoside derivatives, dimers containing an ester-methyltriazole linker were more active than analogues bearing a methyltriazole linker. Using statistical analysis methods, it was determined that each of the designed analogues exhibited an increase in the value of the partition coefficient (logP). Nevertheless, under chemical hydrolysis conditions across a wide pH range, the evaluation of the chemical stability of random compounds revealed partition coefficient values below 3, indicating a balanced lipophilic-hydrophilic character. Importantly, it was demonstrated that protection from the phosphate residue can be released through chemical hydrolysis in either an acidic or basic medium. Additionally, selected hybrid analogues were incubated with HeLa cells to initially estimate the metabolic pathway. Analysis of lysates confirmed the enzymatic degradation of both types of linker, resulting in the release of gemcitabine.

In conclusion, the experimental work of this doctoral thesis validated the correctness of the goal set at the beginning of the research. In the case of 98 out of the 158 synthesized compounds, improvements in the cytotoxicity parameter were observed. Seven derivatives demonstrated a very high therapeutic potential, with the highest value of the SI index being 13.76 for the gemcitabine bioconjugate with metronidazole.