

BEATA NAUMCZUK

**SYNTEZA I BADANIE WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNYCH I
BIOLOGICZNYCH POTENCJALNYCH INHIBITORÓW
TOPOIZOMERAZY I ODDZIAŁYWUJĄCYCH Z OLIGOMERAMI
DNA**

A-21-6
K-c-125
K-c-127
K-d-134
K-c-123

Praca przedstawiona Radzie Naukowej
Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk
w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych
Promotor: Prof. dr hab. Lech Kozerski

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.376/16



90000000192746

Warszawa 2015



B. Org. 376/
16

Serdecznie dziękuję promotorowi,
Panu profesorowi Lechowi Kozerskiemu,
za poświęcony czas oraz cenne rady
związane z niniejszą pracą,
a także za wsparcie i wyrozumiałość.

Dziękuję również
Panu doktorowi hab. Robertowi Kawęckiemu,
Panu doktorowi Wojciechowi Bocianowi,
Panu mgr inż Jerzemu Sitkowskiemu,
Pani doktor Elżbiecie Bednarek
za pomoc i cenne wskazówki.

Spis treści

Wykaz skrótów i akronimów używanych w tekście.....	8
1 WSTĘP	10
2 CEL PRACY.....	12
CZEŚĆ LITERATUROWA.....	14
3 MECHANIZMY ODDZIAŁYWANIA LEKÓW Z DNA.....	14
3.1 NIESPECYFICZNE WIĄZANIE NA ZEWNĄTRZ NICI DNA.....	15
3.2 INTERKALACJA	15
3.3 ODDZIAŁYWANIE W MAŁEJ I DUŻEJ BRUŹDZIE	16
3.4 ALKILOWANIE DNA	18
3.4.1 Alkilowanie DNA przez kompleksy metali.....	19
3.5 MECHANIZM POWODUJĄCY PRZERWANIE NICI DNA.....	20
4 MECHANIZM DZIAŁANIA WYBRANYCH LEKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH.....	21
4.1 INHIBITORY TOPOIZOMERAZY I.....	21
4.1.1 Topoizomeraza I	21
4.1.2 Topotekan	22
4.1.3 Irinotekan	26
4.2 MECHLORETAMINA.....	27
4.2.1 Mechanizm działania	27
4.3 MITOMYCYN A.....	30
4.3.1 Aktywacja MC	30
4.3.2 Mechanizm alkilowania	30
4.3.3 Specyficzność oddziaływania mitomycyny	32
4.4 CISPLATYNA	34
4.4.1 Mechanizm działania	34
4.5 BLEOMYCYN A.....	37
4.5.1 Budowa cząsteczki i aktywacja kompleksu bleomycyny	37
4.5.2 Mechanizm rozerwania nici DNA	38
4.5.3 Specyficzność oddziaływania	40

5	<i>O</i> -METYLENOCHINON.....	43
5.1	STRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI.....	43
5.2	REAKCJE QM Z ZASADAMI AZOTOWYMI DNA	44
5.3	ALKILOWANIE DNA	49
	WYNIKI I DYSKUSJA.....	54
6	POCHODNE TOPOTEKANU.....	54
6.1	OTRZYMYWANIE POCHODNEJ [TPT-ME ₃ N] ⁺ X ⁻	54
6.2	ODDZIAŁYWANIE POCHODNEJ TPT Z OLIGOMEREM DNA	54
6.3	BADANIA BIOLOGICZNE DLA POCHODNEJ TPT.....	58
7	POCHODNE SN38.....	59
7.1	OTRZYMYWANIE POCHODNYCH SN38.....	59
7.2	STABILNOŚĆ POCHODNYCH SN38 W H ₂ O, DMSO I MeOH.....	61
7.3	ODDZIAŁYWANIE POCHODNYCH SN38 Z OLIGOMEREM DNA.....	68
7.3.1	Kompleksy pochodnych SN38 z d(GCGATCGC) ₂	69
7.3.2	Alkilowanie oligomeru DNA.....	75
7.4	ALKILOWANIE 2'-DEOKSYGUANOZYNY	82
7.5	BADANIA BIOLOGICZNE DLA POCHODNYCH SN38	90
8	PODSUMOWANIE.....	94
9	CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	96
9.1	POCHODNE TPT.....	96
9.1.1	Oddziaływanie pochodnej TPT z oligomerem DNA.....	97
9.2	POCHODNE SN38.....	98
9.2.1	Otrzymywanie pochodnych SN38	98
9.2.2	Oddziaływanie pochodnych SN38 z oktamerem DNA	105
9.2.3	Alkilowanie 2'-deoksyguanozyny	107
9.3	OLIGOMERY DNA	108
9.4	APARATURA	109
9.5	EKSPERYMENTY NMR.....	110
9.6	EKSPERYMENTY MS	111
9.7	BADANIA BIOLOGICZNE	112
	ZAŁĄCZNIKI.....	114

Wykaz publikacji i wystąpień konferencyjnych.....	135
LITERATURA.....	137

Wykaz skrótów i akronimów używanych w tekście

A	Adenine
ax	axial
BLM	Bleomycin
C	Cytosine
COSY	Correlation Spectroscopy
CPT	Camptothecin
CPT-11	Irinotecan
dA	2'-deoxyadenosine
dC	2'-deoxycytidine
dG	2'-deoxyguanosine
dT	Thymidine
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DOSY	diffusion-ordered NMR spectroscopy
DPFGSE NOESY	Double Pulsed Field Gradient Spin Echo Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
DS	Double strand
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EPR	Electron paramagnetic resonance
ESI MS	Electrospray Mass Spectrometry
Et743	Ekteinascydyna 743
eq	equatorial
EWG	electron withdrawing group
FDA	Food and Drug Administration
G	Guanine
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation

HSQC (AD)	Heteronuclear Single Quantum Coherence (Adiabatic)
HPLC RP	High-performance liquid chromatography Reversed phase
IR	Infrared spectroscopy
LC/MS	liquid chromatography/ mass spectroscopy
LR/HR-MS	High Resolution/Low Resolution Mass Spectroscopy
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight
MC	Mitomycin
MD	Molecular Dynamics
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
QM	Quinone Methide
QMP	Quinone Methide Precursor
PBS	Phosphate-buffered saline
PFGSE	Pulsed Field Gradient Spin Echo
ppm	Parts per million
RP	Reverse phase
SS	Single strand
T	Thymine
TEAA	Triethylammonium acetate
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Top I	Topoisomerase I
TPT	Topotecan
TSPA- <i>d</i> ₄	3-(Trimethylsilyl)propionic acid- <i>d</i> ₄ sodium salt
UV	Ultraviolet

1 Wstęp

Mimo dużego postępu w walce z chorobami nowotworowymi, są one nadal najczęstszą przyczyną nienaturalnej umieralności ludzi na świecie. Nowotwór charakteryzuje się niekontrolowanym wzrostem komórek nieprawidłowych.^{1, 2} Te komórki mogą także zaatakować pobliskie tkanki i rozprzestrzeniać się na inne części ciała przez układ krwionośny i limfatyczny będąc przyczyną przerzutów. Chemioterapia w połączeniu z chirurgią i radioterapią są klasycznymi formami leczenia chorób nowotworowych.

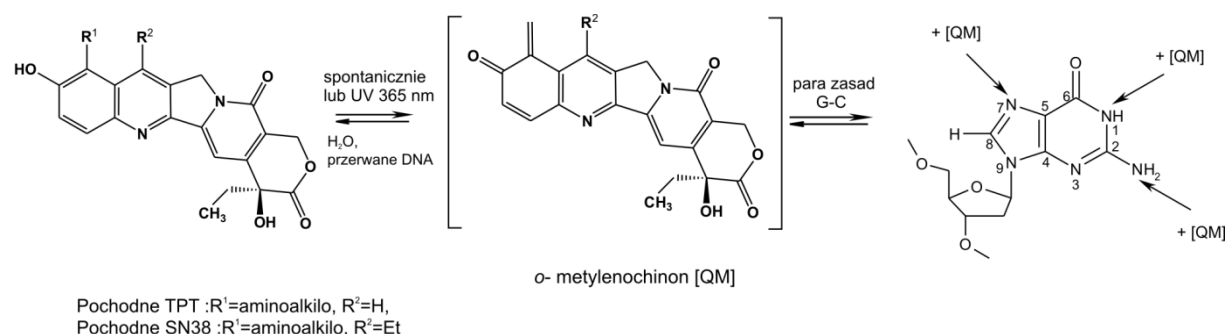
Rynek farmaceutyczny oferuje szeroką gamę leków wykorzystywanych w terapii przeciwnowotworowej pochodzących z różnych klas związków. Ze względu na mechanizm działania tych związków możemy podzielić je na związki alkilujące DNA, powodujące pęknięcie DNA jak też związki oddziałujące z DNA niekwalencyjnie. Leki przeciwnowotworowe są często lekami antyproliferacyjnymi, które powodują apoptozę szybko mnożących się komórek. Niestety, większość z nich nie działa selektywnie i powoduje apoptozę zdrowych komórek. Ponadto, skuteczność działania niektórych obecnie stosowanych leków zmniejszona jest przez lekooporność. Dlatego też, istnieje społeczne i cywilizacyjne zapotrzebowanie na innowacyjne podejście do projektowania leków przeciwnowotworowych charakteryzujących się obniżoną toksycznością oraz wysokim wskaźnikiem terapeutycznym.³

Brak selektywności działania dostępnych leków spowodował rozwój nowej strategii leczenia chorób nowotworowych. Obecnie duże nadzieje wiąże się z bezpieczną terapią celowaną, która polega na zastosowaniu związków działających selektywnie i jednocześnie wiążących się w celu biologicznym bardzo silnie. Związki o takich właściwościach rozpoznają i głównie atakują te biologicznie wyróżnione miejsca bądź też właściwości komórki nowotworowej, nie wpływając tym samym na zdrowe komórki. Można sądzić, że związki z rodziny kamptotecyny, należące do grupy inhibitorów Topoizomerazy I (Top I), mogą spełniać warunki terapii celowanej gdyż wiadomo, że celem biologicznym dla tych związków jest przerwa w superhelikalnym DNA wygenerowana przez topoizomerazę I.⁴ Istotną rolę w planowaniu terapii celowanej w przypadku inhibitorów Top I odgrywa dokładne poznanie mechanizmu, a więc miejsca ataku biocząsteczki a także jego selektywności i siły wiązania. Na tych dwóch kierunkach badań koncentrują się aktualnie badania kamptotecyn przez prof. L. Kozerskiego. Wybór obiektów badań nie jest sprawą trywialną jeżeli wziąć pod uwagę fakt, że podstawienie tylko trzema różnymi podstawnikami 9-ciu możliwych miejsc w rdzeniu kamptotecyny (w tym dwóch stereogenicznych) stwarza

kilkadziesiąt tysięcy możliwości. Tym tłumaczy się fakt, że literatura dotycząca kamptotecyny zawiera kilkaset patentów, a ich liczba ciągle rośnie. Ich wspólnym mianownikiem jest publikowanie aktywności biologicznej. Przebadanie takiej bazy związków metodą SAR (ang. *Structure Activity Relationship*) przekracza nawet możliwości gigantów wśród firm farmaceutycznych (big Pharma). Dlatego dla celów bieżących badań rozważano dwa kryteria wyboru ograniczonej bazy chemicznej, w której należałoby prowadzić modyfikacje strukturalne; 1- selektywność oddziaływania z DNA, 2- wysoka aktywność biologiczna substratu użytego do modyfikacji. Związki o takich właściwościach powinny bardzo silnie wiązać się z DNA w celu biologicznym jakim jest przerwa w jednej z nici dupleksu. Wcześniejsze badania w grupie prof. L. Kozerskiego potwierdzają, że rdzeń kamptotecyny w TPT (9-dimetyloaminometylo-10-hydroksykamptotecyna) wiąże się selektywnie w przerwie w nici DNA,⁵ tym samym modyfikacje tego związku powinny spełniać kryterium 1. Warto zwrócić uwagę, że TPT jest stosowany w leczeniu klinicznym jako Hycamtin™ do leczenia raka jajnika i okrężnicy. Kryterium 2 spełniać powinny pochodne SN38 (7-etylo-10-hydroksykamptotecyna) ponieważ związek ten wykazuje najwyższą aktywność biologiczną *in vitro* w rodzinie kamptotecyn na raka piersi, płuc i białaczki. SN38, ze względu na wyjątkowo wysoką toksyczność i brak rozpuszczalności w wodzie, nie może być jednak stosowany jako lek. Przewidywano, że pochodne z obydwu serii związków, TPT i SN38, powinny mieć możliwość wiązania kowalencyjnego w przerwie DNA, spełniając tym samym warunki potencjalnych leków do celowanej chemioterapii. Potwierdzenie takiego alkilującego działania uzyskano we wstępnych badaniach reakcji oligomeru DNA z czwartorzędową solą TPT (9-trimetyloaminometyl), aktywowanej naświetlaniem w bliskim UV (365 nm). Badania tego typu oddziaływań w rodzinie kamptotecyny nie były nigdzie publikowane.⁶

2 Cel pracy

Celem pracy było otrzymanie nowych dobrze rozpuszczalnych w wodzie związków z rodziny kamptotecyny i zbadanie ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Głównymi obiektami transformacji chemicznych w pracy były związki TPT oraz SN38 (patrz Schemat 2.1). Pochodne tych związków w pierwszym etapie interkalują DNA a następnie spontanicznie bądź też w wyniku fotochemicznej aktywacji tworzą produkt przejściowy typu *o*-metylenochinonu (QM). Produkt przejściowy tego typu może alkilować nukleofilowe atomy azotu w cząsteczce przerwanego DNA tworząc kowalencyjny addukt DNA-Top I-QM (Schemat 2.1). Nie wyklucza się jednak, że otrzymane związki będą ulegać reakcji z DNA według mechanizmu substytucji nukleofilowej.



Schemat 2.1 Proponowany mechanizm alkilowania zasady azotowej w duplesie DNA przez produkt pośredni QM. Strzałki oznaczają możliwe miejsca alkilowania guaniny.

Praca ma dwa kierunki syntetyczne. Pierwszy dotyczący pochodnych TPT, drugi pochodnych SN38.

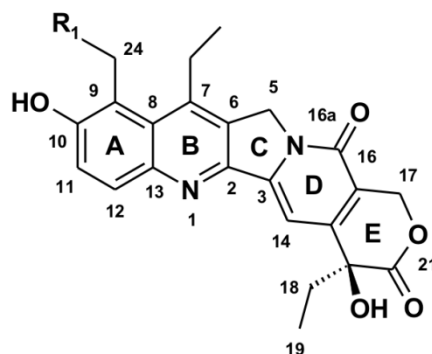
Pochodne TPT

- Pierwszym celem dotyczącym pochodnych TPT była synteza i wyizolowanie czystej czwartorzędowej soli TPT otrzymanej wstępnie przez K.Hyz w postaci mieszaniny kilku związków, która nie spełniała warunków do wykonania wiarygodnych badań biologicznych. Następnie planowano zbadanie jej oddziaływania z oligomerem DNA w pH zbliżonym do fizjologicznego z zastosowaniem naświetlania światłem UV (fotochemiczna aktywacja QM).

Pochodne SN38

- Pierwszoplanowym zadaniem w tej grupie kamptotecyn było opracowanie metody syntezy nowych pochodnych zawierających podstawniki aminowe (R₁) połączone z rdzeniem SN38 przez grupę metylenową (Rysunek 2.1) oraz scharakteryzowanie ich

metodami spektroskopowymi. Nowe pochodne planowano otrzymać stosując reakcję Mannicha.



Rysunek 2.1 Ogólny wzór planowanych nowych pochodnych SN38.

- Kolejny etap obejmował badanie właściwości fizykochemicznych otrzymanych pochodnych. Dotyczyło to określenia ich stabilności w roztworach różnych rozpuszczalników, w tym wyznaczenie okresu półtrwania w wodzie. Badania tego typu wchodzą w zakres badań farmakokinetycznych związków biologicznie czynnych.
- Planowano także zbadać oddziaływania pochodnych SN38 z oligomerem DNA. Zakładano, że początkowo związki te będą oddziaływać według mechanizmu interkalacji a następnie w wyniku utworzenia się QM powstaną produkty alkilowania DNA. W przypadku powstania wiązania kowalencyjnego pomiędzy cząsteczką DNA i rdzeniem SN38 planowano potwierdzenie obecności adduktu metodami spektroskopowymi oraz zidentyfikowanie produktów reakcji.
- W celu lepszego zrozumienia mechanizmu oraz regioselektywności oddziaływania nowych pochodnych SN38 zaplanowano przeprowadzenie reakcji związków z modelowymi nukleozydami. W pierwszej kolejności wybrano 2'-deoksyguanozynę gdyż wiadomo, że rdzeń topotekanu oddziałuje z parą GC w przerwie DNA generowanej przez Top I.⁵ Następnie planowano przeprowadzić reakcję z pozostałymi nukleozydami.
- Jako końcowy etap badań planowano wykonanie badań biologicznych *in vitro* na komórkach nowotworowych oraz na komórkach prawidłowych w celu zbadania aktywności biologicznej otrzymanych związków.



CZEŚĆ LITERATUROWA

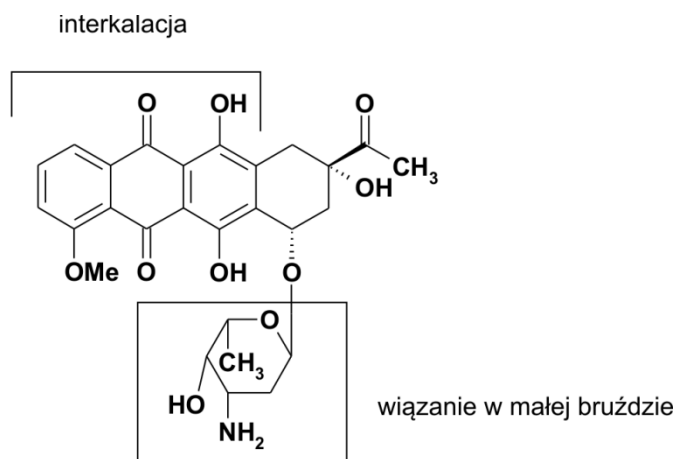
3 Mechanizmy oddziaływania leków z DNA

Poznanie mechanizmu oddziaływania leków z DNA jest kluczowe w strategii projektowania nowych leków przeciwnowotworowych, umożliwia racjonalną modyfikację struktury związków w celu polepszenia aktywności biologicznej oraz zmniejszenia toksyczności.

Klasyczne mechanizmy oddziaływania leków z DNA to:

- 1) Niespecyficzne wiązanie na zewnątrz nici DNA
- 2) Interkalacja
- 3) Oddziaływanie w małej i dużej bruzdzie
- 4) Alkilowanie DNA
- 5) Mechanizm powodujący przerwanie nici DNA

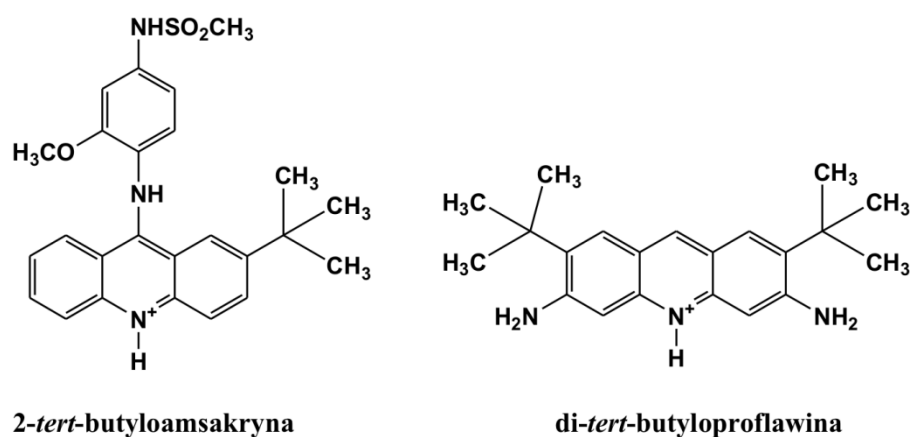
Wymienione sposoby oddziaływania ligandów nie wykluczają możliwości wiązania się związków z DNA w sposób hybrydowy. Przykładem może być daunorubicyna (daunomycyna), antybiotyk z rodziny antracyklin, który ze względu na dużą kardiotoxyczność jest obecnie wykorzystywany jedynie w leczeniu ostrych białaczek. Pierścienie heterocykliczne daunomycyny interkalują pomiędzy pary zasad, natomiast część cukrowa wiąże się w małej bruzdzie podwójnej helisy DNA (Rysunek 3.1).^{7, 8}



Rysunek 3.1 Struktura i funkcje ugrupowań w cząsteczce daunorubicyny (daunomycyna).

3.1 Niespecyficzne wiązanie na zewnątrz nici DNA

Cechą charakterystyczną tej grupy związków jest posiadanie ładunku dodatniego umożliwiającego występowanie oddziaływań elektrostatycznych z ujemnie naładowanym DNA (tak zwane oddziaływanie elektrostatyczne na zewnątrz nici DNA) oraz obecność grup stanowiących zawadę steryczną, uniemożliwiającą interkalację. Częsteczką oddziaływującą z DNA jest utrzymywana na zewnątrz helisy. Związki tego typu wpływają na konformację i stabilność DNA. Przykładami związków niespecyficjnie kompleksujących DNA są: *di-tert*-butyloprofławina oraz *2-tert*-butyloamsakryna (Rysunek 3.2).⁹



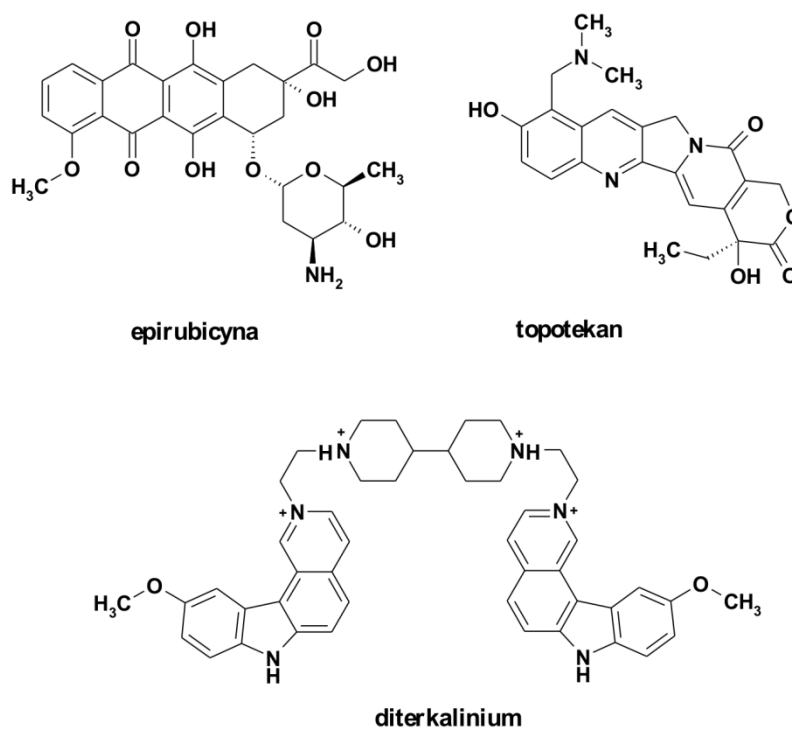
Rysunek 3.2 Przykłady związków wiążących się niespecyficjnie na zewnątrz nici DNA.

3.2 Interkalacja

Interkalacja polega na specyficznym wsuwaniu się płaskich heterocyklicznych lub aromatycznych układów pomiędzy pary zasad w DNA. Utworzony w ten sposób niekowalencyjny kompleks stabilizowany jest przez oddziaływanie typu van der Waalsa pomiędzy elektronami π liganda (interkalatora) i zasad azotowych DNA. Istotną rolę odgrywają również wiązania wodorowe i oddziaływania elektrostatyczne. Koncepcja oddziaływania ligandu z DNA poprzez interkalację po raz pierwszy została zaproponowana przez Lermana w 1961 roku,¹⁰ a następnie przez Pritcharda w roku 1966.¹¹ Stwierdzono wtedy, że niektóre związki, takie jak np. barwniki akrydynowe mogą interkalować pomiędzy pary zasad DNA, prostopadle do osi helisy. Powoduje to odsunięcie się od siebie par zasad i zaburzenie struktury rdzenia cukrowo-fosforanowego.

Przykładami związków oddziałujących poprzez mechanizm interkalacji są doksorubicyna (adriamycyna), epirubicyna, topotekan, rebekamycyna (Rysunek 3.3). Związki te określane są również mianem inhibitorów topozomerazy I i II ze względu na oddziaływanie

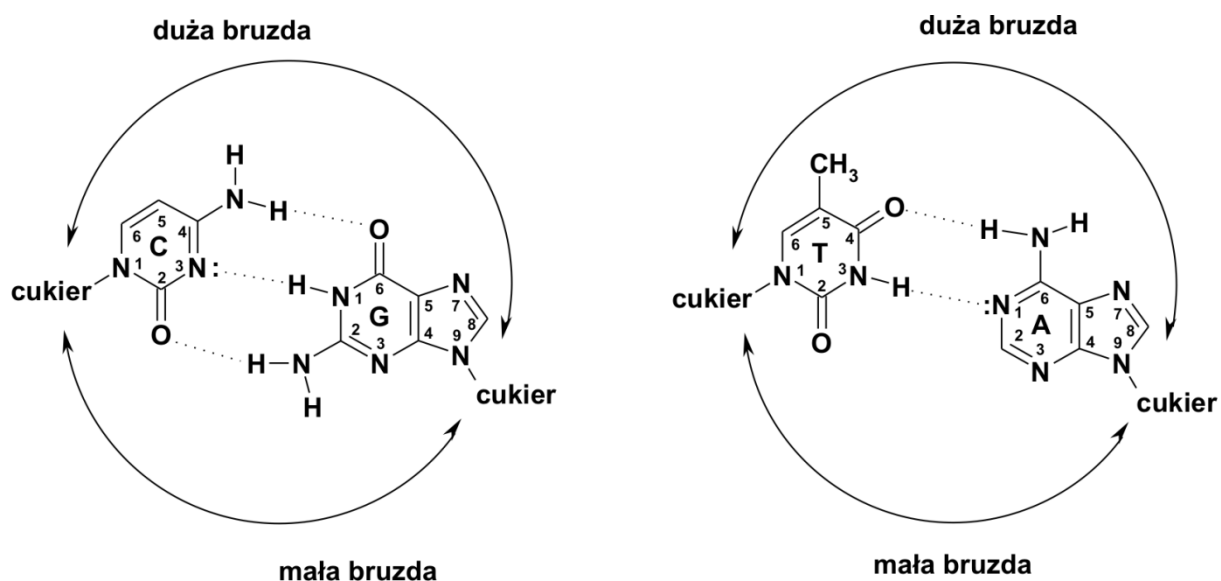
z topoizomerazami DNA.¹² Do grupy interkalatorów zaliczane są także cząsteczki zawierające co najmniej dwa interkalujące układy planarne połączone łańcuchami (linkerami) o różnej długości. Cząsteczki te z założenia powinny silniej oddziaływać z DNA i wykazywać lepszą selektywność miejsca wiązania, co powinno wpływać na polepszenie właściwości terapeutycznych. Do związków tego typu należy diterkalinium, związek który jest bisinterkalatorem wykazującym silne powinowactwo do DNA oraz silne właściwości przeciwnowotworowe.¹³⁻¹⁵



Rysunek 3.3 Przykłady interkalatorów DNA.

3.3 Oddziaływanie w małej i dużej bruzdzie

W strukturze podwójnej helisy DNA widoczne są dwa wgłębienia zwane małą i dużą bruzdą (Rysunek 3.4). Różnią się one wielkością, głębokością a także potencjałem elektrostatycznym oraz zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych. Wgłębienia w helisie DNA są obszarami najbardziej dostępnymi do oddziaływań z ligandami. Wiele cząsteczek zawierających płaskie ugrupowania aromatyczne ma zdolność interkalacji poprzez bruzdy podwójnej helisy. Taki mechanizm jest powszechnie uważany za przyczynę kancerogenności niektórych cząsteczek.

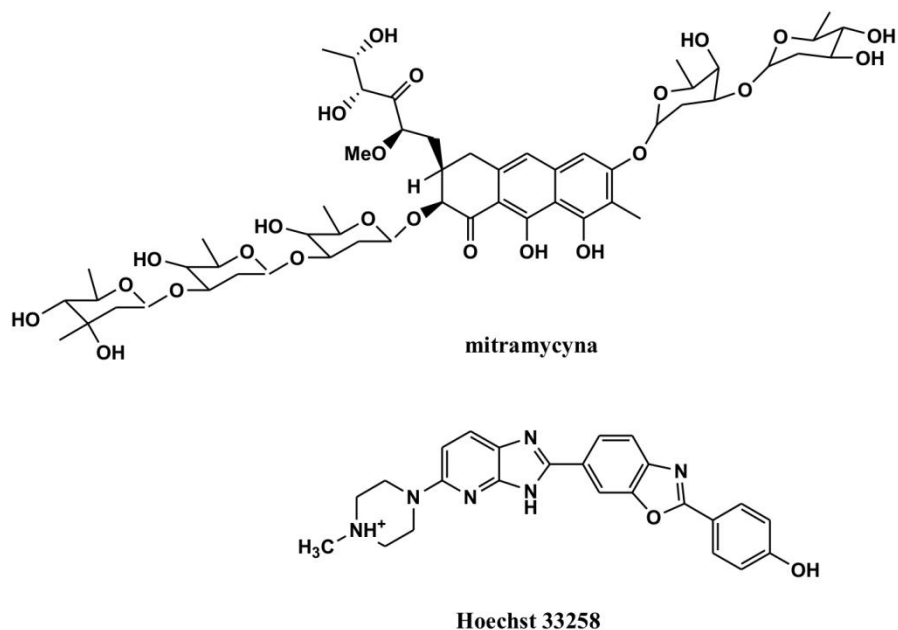


Rysunek 3.4 Mała i duża bruzda w DNA, przebiegające w kierunku prostopadłym do płaszczyzny par zasad.

Większa bruzda w podwójnej helisie DNA jest miejscem wiązania preferowanym przez większe cząsteczki takie jak białka, natomiast w mniejszej bruzdzie oddziałują mniejsze cząsteczki.¹⁶

Związki oddziałujące z DNA w mniejszej bruzdzie zbudowane są najczęściej z kilku płaskich pierścieni aromatycznych połączonych pojedynczymi wiązaniami, co powoduje lepsze dopasowanie się cząsteczki do kształtu bruzdy. Istotną rolę w mechanizmie oddziaływania ligandów pełnią oddziaływania z parami zasad na dnie bruzdy. Cząsteczki kompleksujące w bruzdzie bogatej w sekwencje par AT mogą tworzyć wiązania wodorowe z atomem tlenu grupy karbonylowej C-2 tyminy lub atomem azotu N-3 adeniny. W przypadku bruzd bogatych w sekwencje par GC możliwość utworzenia wiązania wodorowego pomiędzy ligandem a atomem azotu N-3 guaniny lub atomem tlenu grupy karbonylowej C-2 cytozyny jest ograniczona. Spowodowane jest to zawadą steryczną, którą powoduje grupa aminowa guaniny. Kationowe cząsteczki wykazują zatem większą selektywność oddziaływania w małej bruzdzie DNA bogatej w pary zasad AT niż pary zasad GC. Dużą zaletą związków kompleksujących w małej bruzdzie jest ich specyficzne oddziaływanie z określonymi sekwencjami DNA.

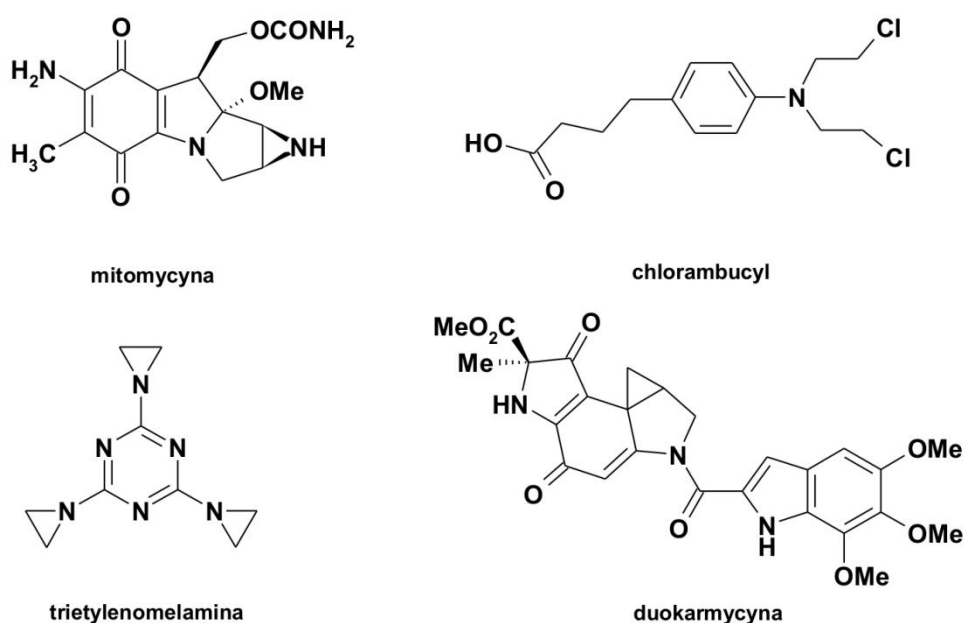
Przykładami związków są netropsyna i Hoechst 33258, które oddziałują z regionami bogatymi w pary AT. Mitramycyna oraz chromomycyna preferują natomiast, sekwencje bogate w pary GC (Rysunek 3.5).¹⁷⁻¹⁹



Rysunek 3.5 Przykłady związków oddziałujących w małej bruzdzie DNA.

3.4 Alkilowanie DNA

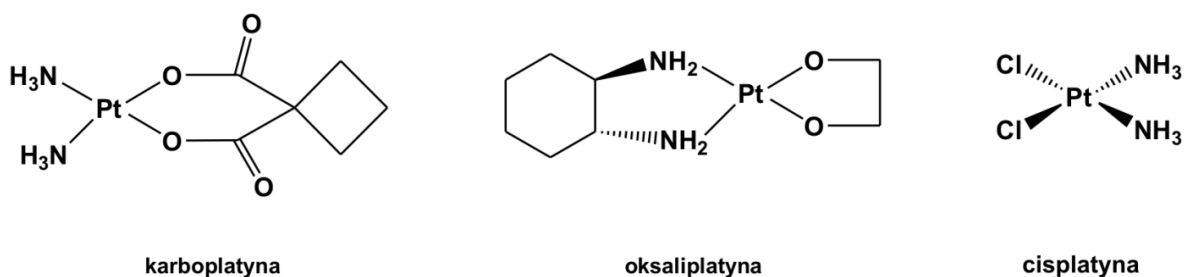
Alkilowanie DNA może przebiegać według dwóch mechanizmów. Pierwszy z nich to reakcja substytucji nukleofilowej S_N1 lub S_N2 pomiędzy nukleofilowymi centrami w cząsteczce DNA (atomy N, O) a elektrofilową cząsteczką alkilującą. Mechanizm reakcji substytucji nukleofilowej zależy od struktury cząsteczki alkilującej DNA. Proste związki alkilujące takie jak azyrydyny reagują według reakcji S_N2 natomiast iperyty azotowe reagują według reakcji S_N1 i S_N2 , w zależności od efektu oddziaływania grup sąsiadujących w cząsteczce. Kiedy kation azyrydynowy tworzy się szybko główną reakcją jest S_N2 , natomiast gdy kation tworzy się wolniej niż następuje atak nukleofila reakcja zachodzi głównie według mechanizmu S_N1 . Drugim możliwym mechanizmem jest addycja Michaela, w której związek alkilujący DNA pełni funkcję akceptora. W wyniku obu reakcji tworzy się wiązanie kowalencyjne a nie jak w przypadku mechanizmu interkalacji wiązanie niekowalencyjne. Reaktywność centrów nukleofilowych w cząsteczce DNA zależy od wielu czynników takich jak: warunki steryczne, elektronowe i wpływ wiązań wodorowych. Nukleofilowość atomów azotu w DNA jest następująca: atomy N-7 guaniny > N-3 adeniny > N-7 adeniny > N-3 guaniny > N-1 adeniny > N-1 cytozyny. Możliwe jest także alkilowanie grup fosforanowych oraz atomów O-6 guaniny i N-3 cytozyny. Przykładami związków alkilujących DNA są: chlorambucyl, mitomycyna, duokarmycyna, trietylenomelamina (Rysunek 3.6).^{7, 20}



Rysunek 3.6 Przykłady cząsteczek alkilujących DNA.

3.4.1 Alkilowanie DNA przez kompleksy metali

Odrębną grupę związków alkilujących stanowią kompleksy metali, które w wyniku reakcji substytucji tworzą trwałe wiązanie pomiędzy DNA a kompleksem z atomem metalu. Najbardziej znanym związkiem z tej kategorii stosowanym w terapii antynowotworowej jest cisplatyna (Rysunek 3.7). Podstawą mechanizmu działania kompleksów platyny jest inhibicja replikacji DNA poprzez tworzenie wiązań wewnątrzniczowych. Kompleksy platyny (II) tworzą krzyżowe wiązanie pomiędzy dwoma atomami N7 w sąsiednich guaninach. Tego typu wiązanie jest głównie odpowiedzialne za aktywność związków platyny.²¹ Inne związki należące do grupy kompleksów platyny to oksaliplatyna i karboplatyna (Rysunek 3.7).



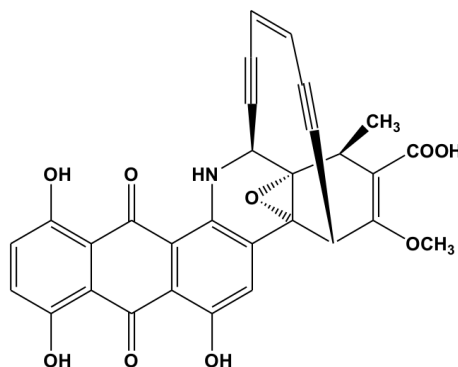
Rysunek 3.7 Kompleksy platyny stosowane w chemioterapii.

Inną grupą kompleksów metali są kompleksy rutenu. Pierwsze doniesienia sięgają roku 1970 przez grupę Clarke'a publikującą wyniki potwierdzające hipotezę, że kompleksy rutenu powodują inhibicję syntezy DNA. Spowodowało to wzrost zainteresowania związkami rutenu jako potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi.²² Obecnie kilka kompleksów rutenu jest w trakcie badań klinicznych.

Tworzenie stałego wiązania kowalencyjnego pomiędzy lekiem a DNA powoduje znaczne polepszenie właściwości terapeutycznych w stosunku do leków wiążących się nie kowalencyjnie. Wiele związków alkilujących DNA niestety nie jest stosowana w terapii przeciwnowotworowej ze względu na wysoką reaktywność, co może powodować wysoką toksyczność w stosunku do zdrowych komórek. Ponadto, ważną rolę odgrywają inne czynniki na przykład: współczynnik farmakokinetyczny, rozpuszczalność, zdolność do przedostawania się do centralnego układu nerwowego, transport przez membrany.

3.5 Mechanizm powodujący przerwanie nici DNA

Mechanizm powodujący przerwanie nici DNA zachodzi poprzez reakcje rodnikowe. Związki oddziałujące w ten sposób z DNA w odpowiednich warunkach generują rodniki, które następnie mogą oderwać protony z łańcuchów cukrowo-fosforanowych lub zasad DNA. Uważa się, że leki tego typu w pierwszym etapie mogą interkalować w DNA, a następnie, w wyniku aktywacji chemicznej bądź enzymatycznej, generują rodniki powodujące uszkodzenie DNA. Przykładami związków powodujących przerwanie nici DNA są: antracyklina, bleomycyna, dynemicyna (Rysunek 3.8).^{7, 23}



Rysunek 3.8 Dynemicyna.

4 Mechanizm działania wybranych leków przeciwnowotworowych

Badania prowadzone nad poznaniem mechanizmu poszczególnych leków, wpływu struktury cząsteczki na aktywność i miejsce działania, przyczyniły się do rozwoju nauki o leku. Obecnie badania dotyczące leków przeciwnowotworowych prowadzone są w dwóch kierunkach:

- poszukiwanie nowych leków działających selektywnie, wykazujących wyższą aktywność i mniejszą toksyczność w stosunku do komórek zdrowych np. poprzez zmiany struktury obecnie stosowanych leków;
- próby udoskonalenia terapii już stosowanych leków, z uwzględnieniem kuracji wielolekowej.

Poszukiwanie nowych związków, wykazujących aktywność przeciwnowotworową, spowodowane jest głównie przez wrodzoną lub nabytą oporność komórek nowotworowych na stosowane w terapii leki. Drugim powodem jest zmniejszenie działań niepożądanych jakie niosą obecnie stosowane środki.

W rozdziale opisane są mechanizmy działania wybranych związków stosowanych od lat w terapii antynowotworowej. Poznanie mechanizmów działania leków przyczyniło się do syntezy nowych analogów tych związków, w celu polepszenia aktywności, selektywności działania a także zmniejszenia toksyczności.

4.1 Inhibitory topoizomerazy I

4.1.1 Topoizomeraza I

Topoizomerazy są grupą enzymów, które rozplatają podwójną helisę DNA udostępniając w ten sposób matrycę dla enzymów replikacyjnych lub transkrypcyjnych. Topoizomeraza I (Top I) odpowiada za relaksację struktury superhelikalnej, przecinając w cząsteczce tylko jedną nić, która obraca się wokół nierozciętego łańcucha. W ludzkiej Top I reakcja zachodzi przy udziale Tyr 723, której grupa hydroksylowa atakuje wiązanie fosfodiesterowe jednej z nici DNA. Tworzy się wiązanie 3'-fosfotyrozynowe między enzymem i DNA, rozcinając tym samym jedną nić i uwalniając wolną grupę 5'-OH. Utworzony związek przejściowy nosi nazwę kowalencyjnego kompleksu dwuskładnikowego (ang. *covalent binary complex*, DNA-Top I) (Rysunek 4.1).



Rysunek 4.1 Kowalencyjne kompleks dwuskładnikowy DNA-Top I.²⁴

Ponowne złączenie następuje w wyniku reakcji odwrotnej. Wolna grupa 5'-OH rozciętej nici atakuje wiązanie fosfotyrozynowe odtwarzając wiązanie fosfodiesterowe w DNA, a Top I zostaje odłączona od DNA (etap religacji). Odwracalne rozcięcie jednej nici DNA pozwala na rotację, dzięki której w kontrolowany sposób usuwane są superhelikalne skręty.²⁵⁻²⁷

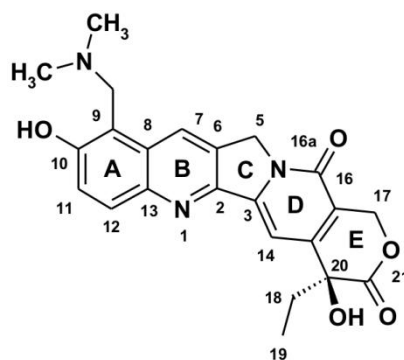
Poznanie mechanizmu działania oraz struktury kowalencyjnego kompleksu DNA i topoiomerazy I spowodowało, że inhibicja Top I jest jedną z najważniejszych strategii w projektowaniu leków przeciwnowotworowych.

4.1.2 Topotekan

Topotekan (TPT), znany w leczeniu klinicznym jako Hycamtin™ jest inhibitorem topoiomerazy I z rodziny kamptotecyn. Interkaluje pomiędzy zasady azotowe DNA w kompleksie dwuskładnikowym DNA-Top I, hamując proces replikacji, co prowadzi do apoptozy komórki. Stosowany jest w terapii przeciwnowotworowej raka jajnika a także drobnokomórkowego raka płuc (zatwierdzony przez FDA w 1996 roku).²⁸

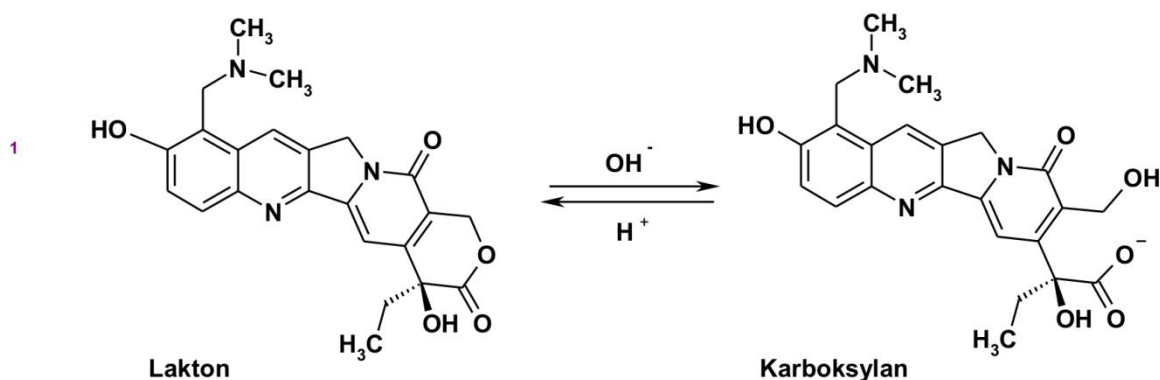
4.1.2.1 Budowa i podstawowe właściwości cząsteczki

Cząsteczka TPT (Rysunek 4.2) składa się z pięciocyklicznego rdzenia. Możemy wyróżnić fragment chinolinowy (pierścienie A i B), fragment indolizynowy (pierścienie C i D) zawierający grupę karbonylową niezbędną do aktywności wobec Top I oraz pierścieni α -hydroksylaktonowy (E) zawierający centrum stereogeniczne o konfiguracji S.²⁹



Rysunek 4.2 Topotekan.

Rozpuszczalność cząsteczki w wodzie wynika z obecności grupy *N,N*-dimetyloaminometylowej w pozycji 9-C pierścienia A, jako lek TPT podawany jest w postaci chlorowodoru. TPT, podobnie jak inne kamptotecyny, w roztworach wodnych występuje w równowadze pomiędzy zamkniętą formą laktonową i otwartą karboksylanową (Schemat 4.1). Równowaga ta zależy od pH roztworu (przy pH 7.4 ok. 80 % TPT występuje w formie karboksylanu).^{30, 31}

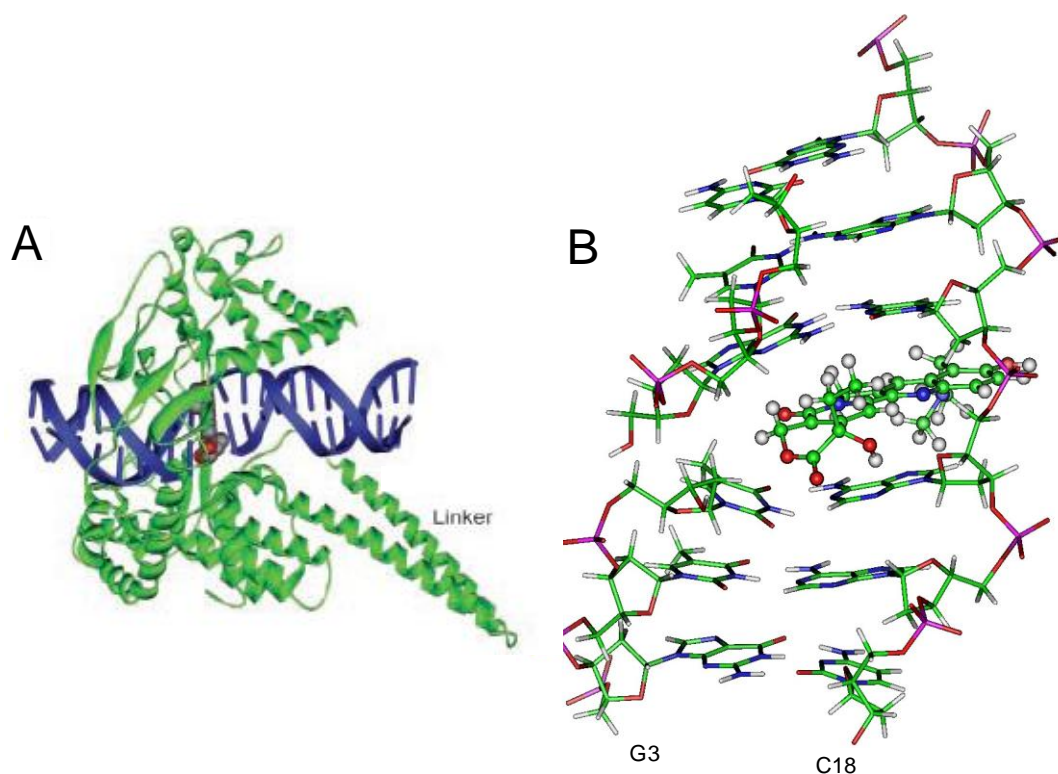


Schemat 4.1 Równowaga lakton-karboksylan w cząsteczce TPT.

4.1.2.2 Mechanizm oddziaływania

Topotekan interkaluje w przerwę wygenerowaną przez Top I, stabilizując w ten sposób kowalencyjny kompleks dwuskładnikowy DNA-Top I.

Badania struktury rentgenograficznej trójskładnikowego kompleksu DNA-Top I-TPT (Rysunek 4.3),²⁴ a także badania oddziaływania TPT z sekwencją DNA z przerwą nicią, świadczą o interkalacji pochodnej kamptotecyny w przerwie DNA.⁵



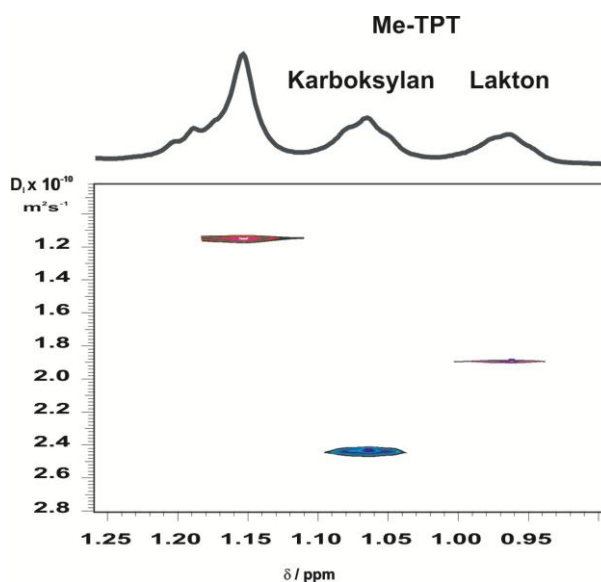
Rysunek 4.3 Struktury kompleksów: A) DNA-Top I- TPT. Top I oznaczono kolorem zielonym, DNA kolorem niebieskim, TPT szarym, czerwonym i niebieskim;²⁴ B) struktura kompleksu przerwany dekamer-TPT, otrzymany metodą MD. Pokazano tylko 6 par zasad otaczających przerwę.⁵

Trójskładnikowy kompleks DNA-Top I-TPT składa się z oligonukleotydu zawierającego łącznik 5 - fosfotioestrowy, dzięki czemu udało się otrzymać strukturę krystaliczną. Struktura rentgenograficzna kompleksu przyczyniła się do lepszego zrozumienia mechanizmu oddziaływania TPT.^{24, 32} Analiza struktury wykazała że:

- ✓ topotekan interkaluje od strony pękniętej nici;
- ✓ płaskie pierścienie TPT odpowiadają parom zasad DNA i zajmują to samo miejsce co zajmowałyby para zasad +1 w strukturze bez leku;
- ✓ kompleks stabilizowany jest przez oddziaływania warstwowe (ang. *base-stacking*) zarówno z parą zasad -1 jak i +1;
- ✓ interkalacja następuje dzięki rotacji wiązania fosfodiesterowego nierozciętej nici w pobliżu przerwy generowanej przez Top I;
- ✓ interkalacja TPT powoduje odsunięcie się od siebie par zasad -1 i +1, nie powodując zerwania wiązań wodorowych pomiędzy zasadami;
- ✓ zaobserwowano wiązanie wodorowe pomiędzy Asp533 a grupą 20 (*S*)-hydroksylową topotekanu;

Analiza krystalograficzna trójskładnikowego kompleksu zakłada możliwość oddziaływania obu form TPT (laktonu i karboksylanu). Wiązanie wodorowe pomiędzy Asp533 a grupą 20(S)-hydroksylową TPT prawdopodobnie wpływa na aktywność cząsteczki. Wiadomo, że enancjomery *R* pochodnych kamptotecyny nie wykazują aktywności biologicznych, bądź wykazują w niewielkim stopniu.³³⁻³⁵

Zespół prof. Kozerskiego badając oddziaływania TPT z sekwencją DNA (dekamer) z przerwą nicią wykazał, że miejscem oddziaływania pochodnej kamptotecyny jest przerwa. Na podstawie obserwowanych oddziaływań NOE oraz wykorzystując modelowanie molekularne wygenerowano zestaw konformerów (struktura o najlepszym dopasowaniu pokazana na rysunku 4.3 B). Geometria struktury w roztworze jest bardzo podobna do struktury rentgenograficznej, co świadczy o dużej zgodności obliczeń struktury rentgenograficznej z wynikami eksperymentalnymi NOESY.^{24, 36} Autorzy postanowili także zbadać powinowactwo obu form TPT do dekameru DNA. Różnice pomiędzy przesunięciami chemicznymi laktonu i karboksylanu pozwoliły na wyznaczenie stałej wiązania, wykorzystując eksperyment PFGSE NMR (Rysunek 4.4). Okazało się, że powinowactwo karboksylanu do DNA jest bardzo słabe ($K_a=0.1 \text{ mM}^{-1}$) w porównaniu do laktonu ($K_a=3.78 \text{ mM}^{-1}$).⁵



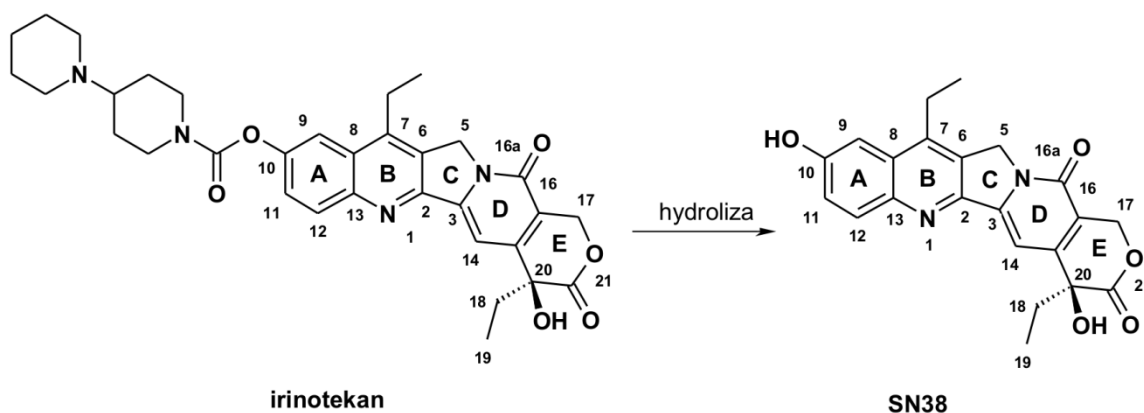
Rysunek 4.4 Widmo DOSY pokazujące współczynniki dyfuzji względem przesunięć chemicznych grup CH_3 -19 TPT.⁵

Badania oddziaływań TPT z naturalnymi oligomerami DNA pokazały, że związek wiąże się z terminalną parą GC. W przypadku oligomerów bogatych w sekwencję AT nie zaobserwowano oddziaływań NOE pomiędzy DNA a TPT.^{30, 37} Wyznaczono również stałą

wiązania TPT do oktameru o sekwencji d(GCGATCGC)₂, która wynosi 1.5 mM⁻¹.³⁰ Porównując stałe wiązania można stwierdzić, że TPT mocniej wiąże się z przerwana nicią, a aktywną formą TPT jest lakton. Wiadomo także, że pochodna lepiej stabilizuje kowalencyjny kompleks, gdy w pozycji +1 znajdują się para GC.

4.1.3 Irinotekan

Irinotekan (CPT-11, CamptosarTM) w 2000 roku został zatwierdzony przez FDA w USA i obecnie jest stosowany w przypadkach raka płuc oraz jelita grubego.²⁸ Rozpuszczalna w wodzie pochodna kamptotecyny zawiera fragment bispiperidynowy, przyłączony przez grupę karbonylową w pozycji C-10. Cząsteczka CPT-11 pod wpływem enzymu karboksyesterazy ulega hydrolizie do 7-etylo-10-hydroksykamptotecyny (SN38, nierozpuszczalny w wodzie) (Schemat 4.2), który jest 1000 razy bardziej aktywny niż Irinotekan.^{38, 39} Podobnie jak wszystkie kamptotecyny związki te występują w równowadze pomiędzy aktywną formą laktonową a nieaktywną karboksylową (Rysunek4.1). Biologiczne okresy półtrwania irinotekanu (6.3 godz.) oraz SN38 (11.5 godz.) są dłuższe niż okres półtrwania topotekanu, który wynosi 3 godz.⁴⁰



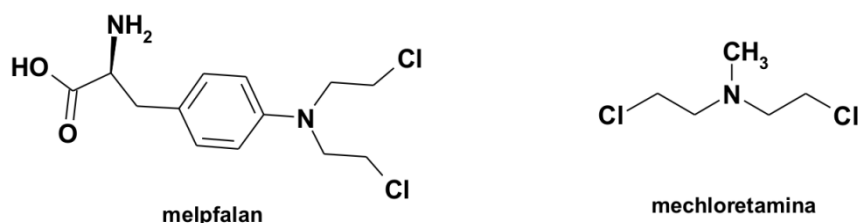
Schemat 4.2 Hydroliza irinotekanu.

Irinotekan jest prekursorem leku (ang.*prodrug*), który pod wpływem enzymu przekształca się do aktywnego metabolitu (SN38). SN38 jest inhibitorem topoizomerazy I, który, podobnie jak topotekan, stabilizuje dwuskładnikowy kompleks DNA-Top I, prowadząc do apoptozy komórki.^{41, 42}

4.2 Mechloreتامina

Mechloreتامina (mustyna) znana jako Mustargen stosowana obecnie w przypadku zaawansowanej choroby Hodgkina, jest pochodną iperytu azotowego. Pierwsze doniesienia o właściwościach przeciwnowotworowych tej grupy związków pochodzą z lat 40-tych XX wieku.⁴³ To wydarzenie uznaje się za początek nowoczesnej chemioterapii.

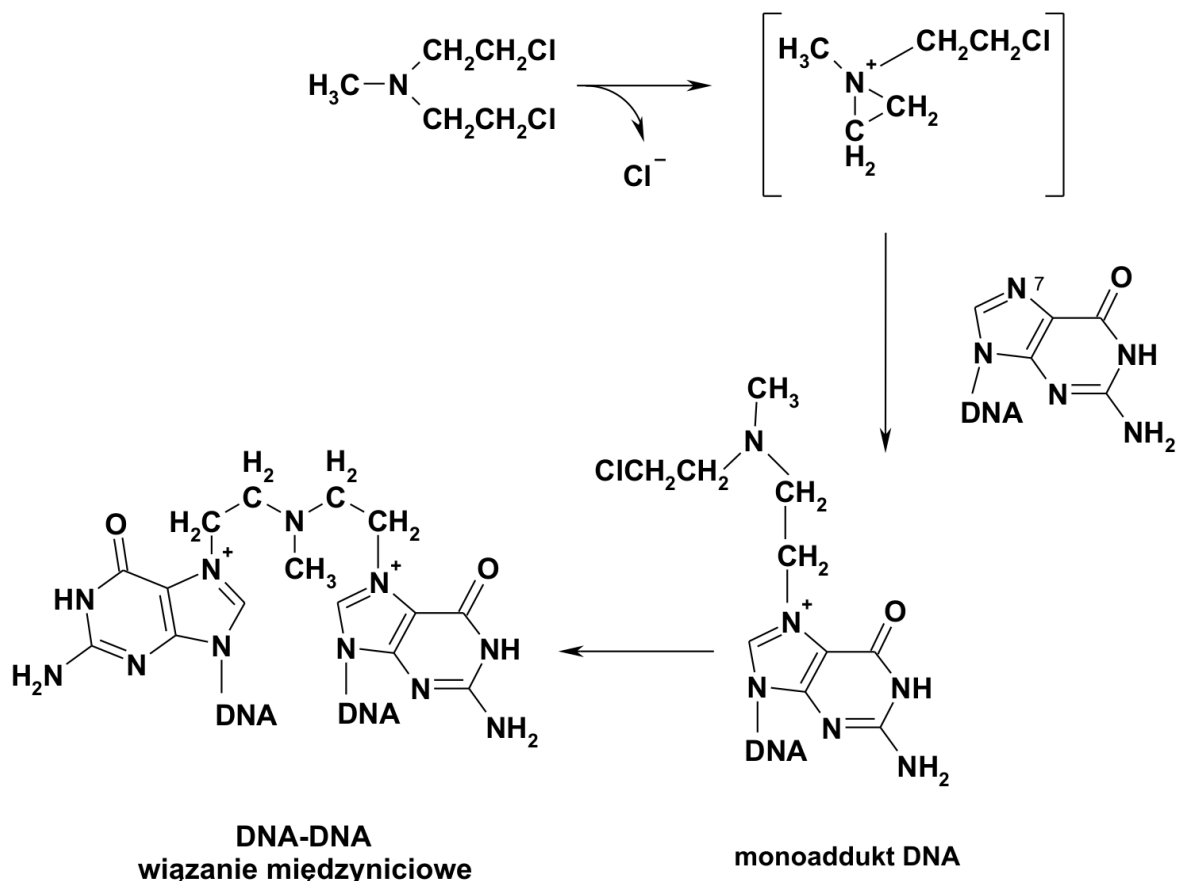
Mustyna jest bifunkcyjnym alkilatorem (bisalkilator), stabilizowanym przez efekt grup sąsiadujących. Wiąże się w dużej bruździe DNA tworząc wiązanie kowalencyjne, hamując w ten sposób przyrost komórek nowotworowych. Mechloreتامina jest związkiem bardzo reaktywnym, łatwo ulega hydrolizie w roztworze wodnym. Z tego względu otrzymano pochodne, które są bardziej stabilne a zarazem posiadają właściwości mustyny. Bardziej trwałymi związkami są melfalan (Rysunek 4.5) oraz chlorambucyl (Rysunek 3.6), również stosowane w leczeniu chorób nowotworowych.



Rysunek 4.5 Pochodne iperytu azotowego.

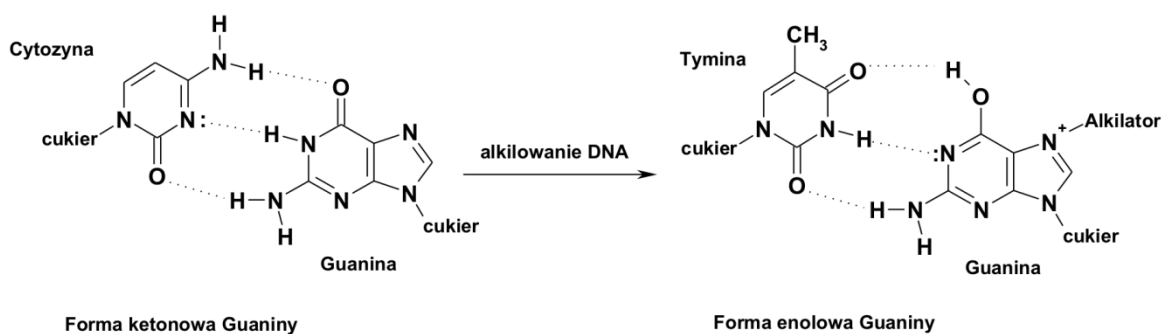
4.2.1 Mechanizm działania

Alkilowanie DNA przez mechloreتامinę zachodzi według mechanizmu substytucji nukleofilowej. W pierwszym etapie tworzy się bardzo reaktywny kation azyrydynowy, który reaguje z nukleofilowym atomem N-7 guaniny jednej nici DNA tworząc monoaddukt. Następnie powstały produkt alkilacji może reagować z kolejnym atomem N-7 guaniny drugiej nici DNA, tworząc wiązanie międzyniciowe (ang. *interstrand crosslinks*) (Schemat 4.3).^{7, 44, 45} Związki mające zdolność do tworzenia takich wiązań nazywane są czynnikami krzyżującymi/sieciującymi (ang. *cross-linking agents*).



Schemat 4.3 Mechanizm reakcji DNA z mechloreتامiną z utworzeniem wiązania pomiędzy niemi DNA.

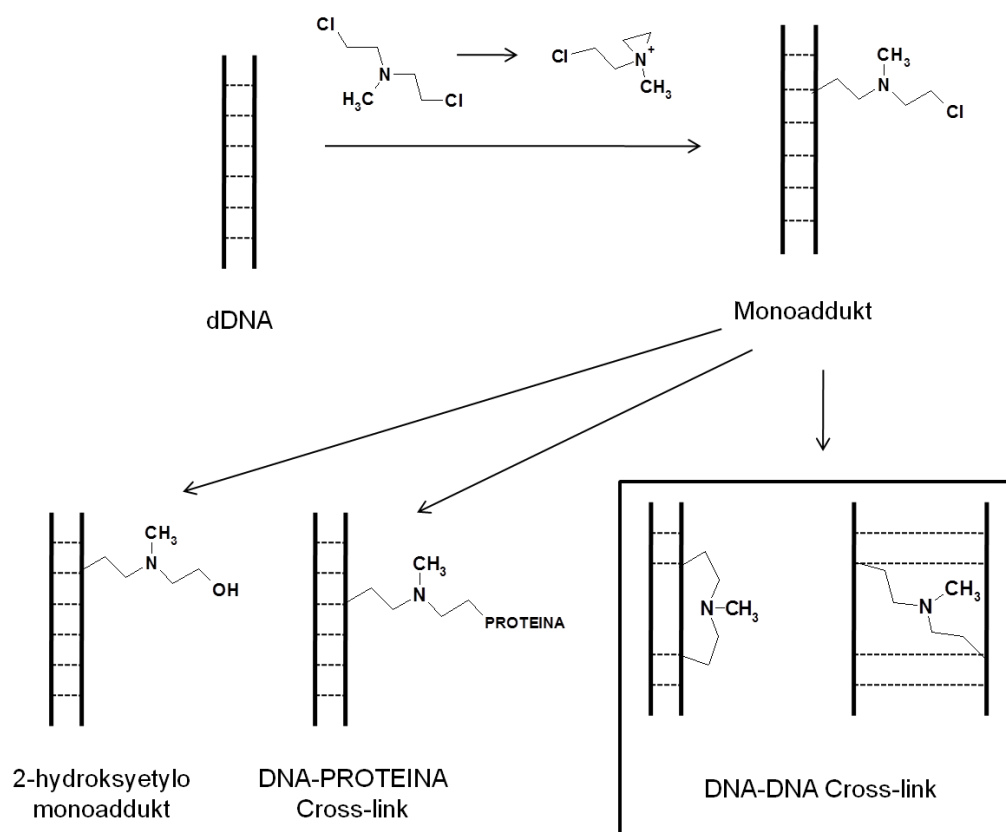
Zasady azotowe w DNA w warunkach fizjologicznych występują w określonych formach tautomerycznych. Jest to istotne ze względu na występowanie wiązań wodorowych pomiędzy parami zasad (GC i AT). W wyniku reakcji alkilowania DNA na atomie azotu N-7 guaniny zostaje wytworzony ładunek dodatni powodujący przesunięcie równowagi tautomerycznej zasady z formy ketonowej do formy enolowej. Guanina może więc tworzyć wiązania wodorowe z tyminą, co prowadzi do zniekształcenia struktury DNA i nieprawidłowego kodowania w procesie replikacji (Schemat 4.4).^{46, 47}



Schemat 4.4 Zmiana formy tautomerycznej guaniny podczas alkilowania azotu N-7.

Ponadto wytworzenie ładunku dodatniego na atomie azotu N-7 guaniny może prowadzić do szeregu przemian prowadzących do zerwania wiązania estrowego, powodując rozcięcie nici DNA. Najczęściej jednak prowadzi do depurynacji poprzez proces hydrolizy alkilowanego DNA. W wyniku tego procesu ulega rozerwaniu wiązanie N-glikozydowe.⁴⁵

Chloretamina po utworzeniu monoadduktu z DNA tworzy również wiązanie wewnątrznicowe (ang. *intra crosslinks*), w obrębie tej samej nici DNA. Powstają także produkty hydrolizy monoadduktu (2-hydroksyetylo monoaddukt DNA) oraz alkilowania z białkami (Schemat 4.5).^{48, 49}



Schemat 4.5 Możliwe produkty alkilowania DNA przez mechloretninę.

Mustyna tworzy produkty alkilowania międzyniciowego specyficznie dla sekwencji 5'-d(GNC)-3', natomiast wiązania wewnątrznicowe tworzy pomiędzy sąsiadującymi atomami N-7 guaniny w sekwencji d(GGC).^{44, 50}

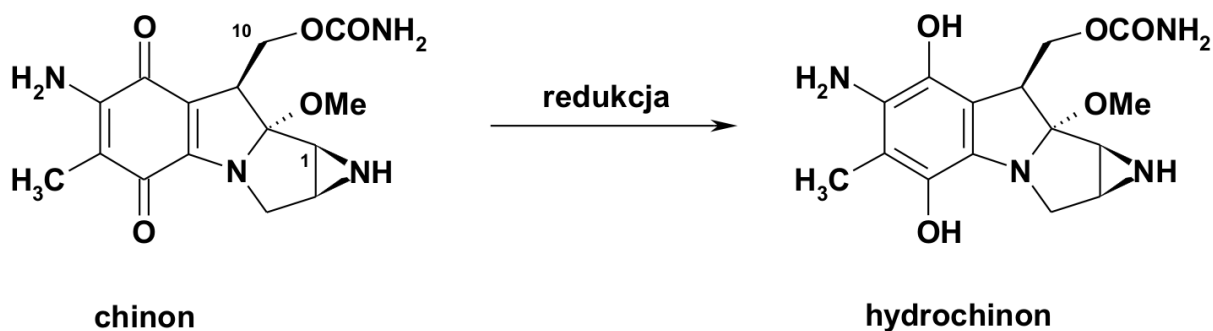
Aktywność biologiczna mechloretniny wynika głównie z możliwości tworzenia wiązań międzyniciowych w cząsteczce DNA, co znacznie wpływa na wzrost cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych.

4.3 Mitomycyna C

Mitomycyna C (MC) jest naturalnym antybiotykiem przeciwnowotworowym stosowanym między innymi w chemioterapii raka żołądka, piersi, płuc oraz pęcherza moczowego (Schemat 4.6). Powoduje inhibicję procesu replikacji poprzez wiązanie kowalencyjne w małej bruzdzie cząsteczki DNA. Właściwości przeciwnowotworowe MC, podobnie jak mechloreتامiny, są spowodowane przede wszystkim możliwością tworzenia wiązań międzyniciowych (wiązanie krzyżowe) w cząsteczce DNA. Wiązania krzyżowe powstają pomiędzy atomami N-2 grupy aminowej dwóch guanin w komplementarnych niciach DNA a atomami C-1 i C-10 mitomycyny.⁵¹⁻⁵⁴

4.3.1 Aktywacja MC

W porównaniu do innych leków mitomycyna w formie chinonu nie reaguje z DNA. Aktywowana jest poprzez enzymatyczną bądź chemiczną redukcję do hydrochinonu (Schemat 4.6).^{51, 54, 55}

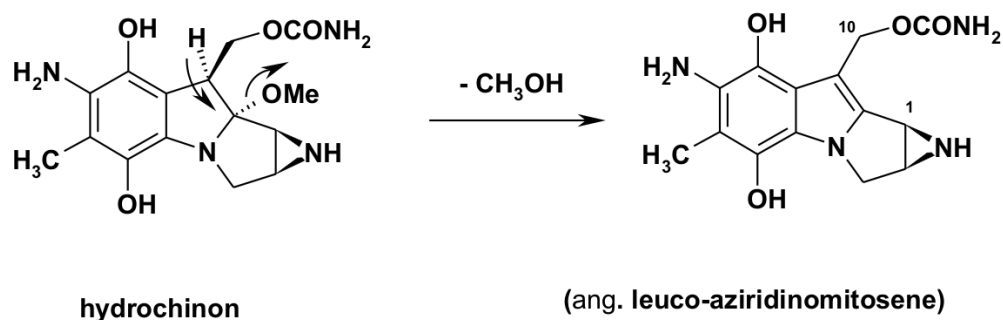


Bioreduktory:
NADPH: cytochrom P450 oksydoreduktaza
NADH: cytochrom b5 oksydoreduktaza
DT-diaforaza

Schemat 4.6 Aktywacja mitomycyny C.

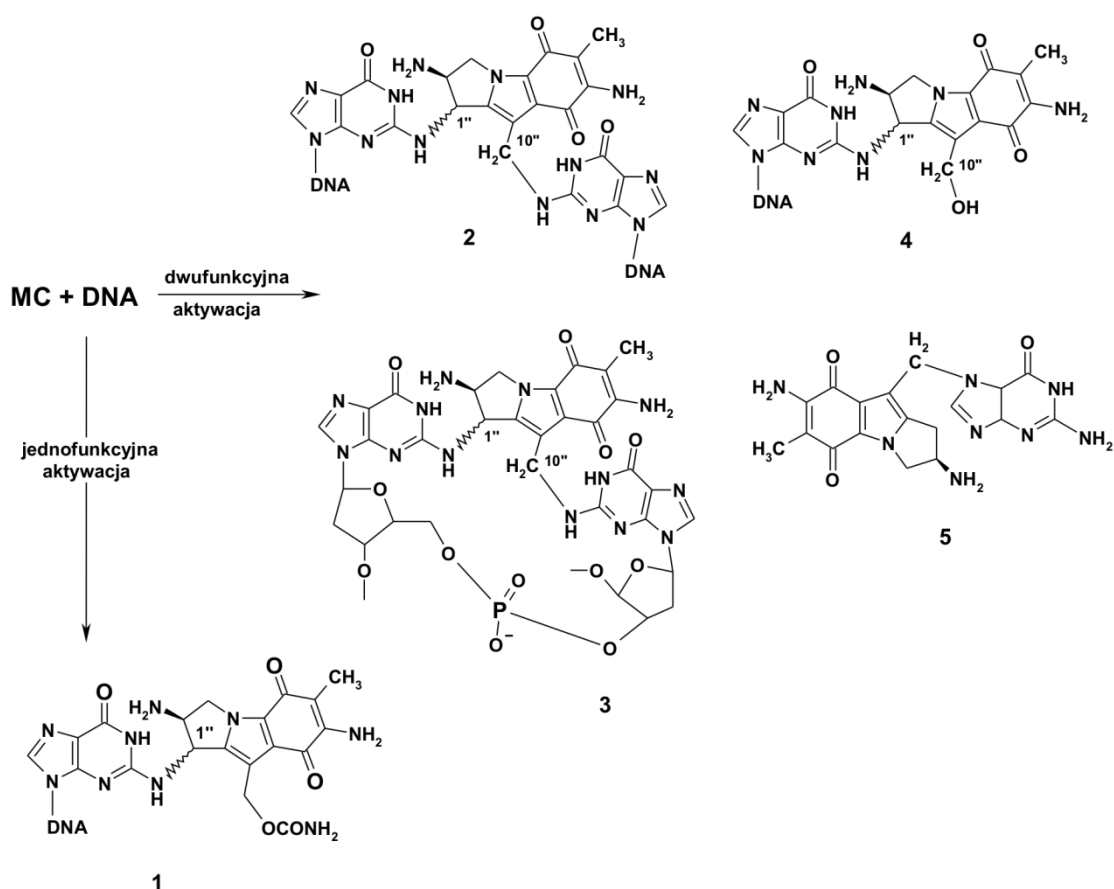
4.3.2 Mechanizm alkilowania

W wyniku aktywacji MC do hydrochinonu a następnie spontanicznej eliminacji grupy metoksylowej, powstaje reaktywna forma MC (ang. *leuco-aziridinomitosen*) zawierająca dwa centra aktywne w pozycjach C-10 grupy karbaminianowej oraz C-1 pierścienia azyrydiny (Schemat 4.7). Możliwe są różne drogi reagowania MC z DNA w wyniku których powstają zróżnicowane produkty, zależnie od warunków reduktywnej aktywacji.



Schemat 4.7 Mechanizm powstawania reaktywnej formy MC z zaznaczeniem centrów aktywnych C-1 i C-10.

W wyniku jednofunkcyjnej aktywacji powstaje G-N² monoaddukt (**1**) (Schemat 4.8). Wiązanie kowalencyjne tworzy się pomiędzy atomem C-1 mitomycyny a atomem N-2 grupy aminowej guaniny jednej z nici DNA. Udział w reakcji bierze tylko jedno centrum aktywne cząsteczki MC. Produktami dwufunkcyjnej aktywacji są: G-N² bisaddukty (**2**) (wiązanie krzyżowe międzyniciowe), G-N² bisaddukt **3** (wiązanie krzyżowe wewnątrznicowe). Powstaje również G-N² monoaddukt (**4**), a centrum aktywne na atomie C-10 ulega hydrolizie.^{51, 52, 54}

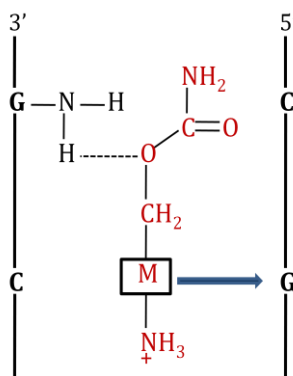


Schemat 4.8 Możliwe produkty alkilacji DNA przez aktywowaną mitomycynę.

Produktem reakcji MC z DNA jest również G-N7 addukt (**5**), powstały w wyniku reakcji depurynacji. Mechanizm powstawania tego adduktu zachodzi poprzez produkt pośredni metylenochinon (ang. *quinone methide*, QM).^{7, 56} Początkowo postulowano, iż powstawanie tego typu produktu pośredniego jest odpowiedzialne za tworzenie się wiązania kowalencyjnego pomiędzy atomami C-10 MC a N-2 grupy aminowej guaniny w cząsteczce DNA. Niestety hipoteza ta okazała się niesłuszna. Późniejsze badania dowiodły, że QM prowadzi jedynie do otrzymania metabolitu mitomycyny, który pod wpływem następczych reakcji może alkilować DNA tworząc addukt 5.^{54, 57}

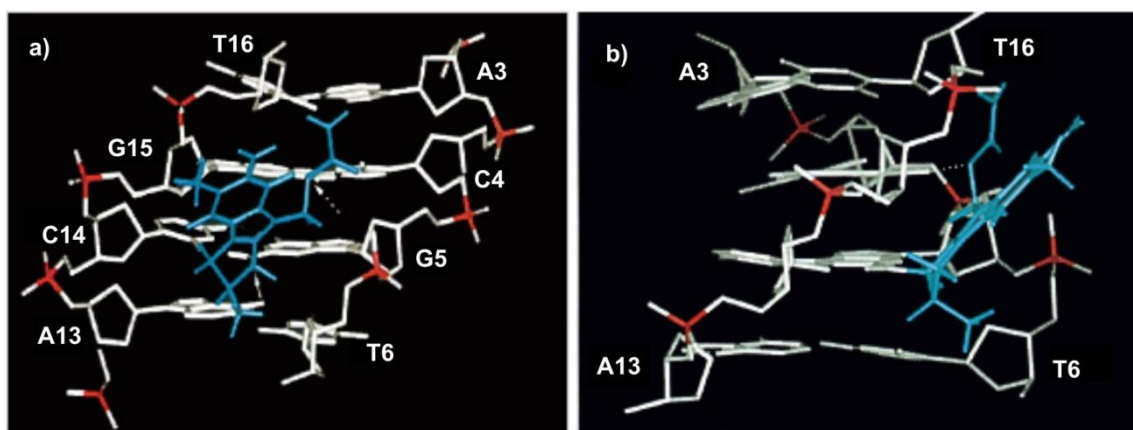
4.3.3 Specyficzność oddziaływania mitomycyny

Mitomycyna wykazuje pewną selektywność do sekwencji DNA, która jest alkilowana. Pierwsze monoalkilowanie, tworzenie wiązania kowalencyjnego pomiędzy atomami C-1 MC i N-2 guaniny, zachodzi specyficznie dla sekwencji 5'-CpG-3'. Mitomycyna preferuje tę sekwencję. 10 razy bardziej niż inne sekwencje (NpG). W wyniku alkilowania sekwencji DNA NpG powstają jedynie monoaddukty. Ponadto okazało się, że selektywność monoalkilowania wymaga obecności nie tylko sekwencji CpG. Aktywowana MC rozpoznaje preferowaną sekwencję poprzez tworzenie się wiązania wodorowego pomiędzy atomem tlenu przy atomie węgla C-10 MC a wodorem grupy aminowej N-2 guaniny komplementarnej nici (Rysunek 4.6).



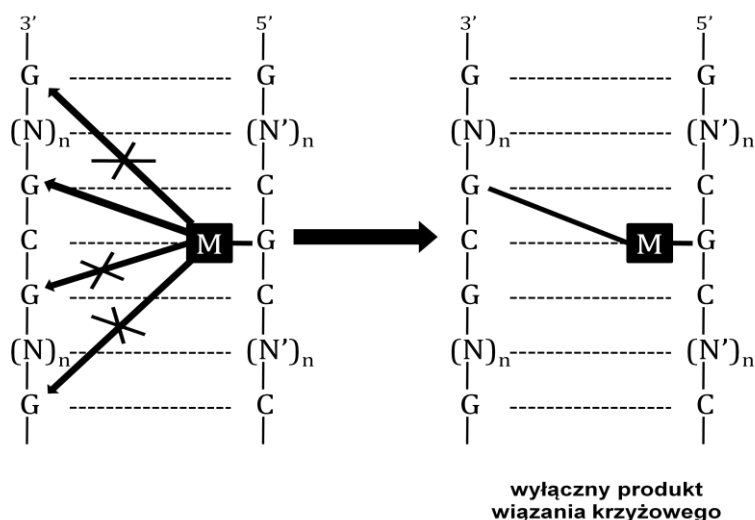
Rysunek 4.6 Selektywne monoalkilowanie DNA przez MC. Wiązanie wodorowe zaznaczone przerywaną linią, oraz miejsce wiązania kowalencyjnego (strzałka) podczas tworzenia się monoadduktu. Aktywowaną MC oznaczono kolorem czerwonym.

W oparciu o badania eksperymentalne z użyciem technik NMR (m.in. NOESY) oraz obliczenia dynamiki molekularnej potwierdzono strukturę oraz mechanizm selektywnego wiązania monoadduktu w małej bruzdzie DNA (Rysunek 4.7).



Rysunek 4.7 Struktura monoadduktu MC-DNA. a) widok od strony małej bruzdy. MC oznaczono kolorem niebieskim, Przerywana biała strzałka oznacza wiązanie wodorowe pomiędzy C-10 MC i atomem wodoru N² G15. Biała ciągła strzałka oznacza kowalencyjne wiązanie pomiędzy atomami C-1 MC i N² G5. b) model (a) obrócony w celu lepszej widoczności wiązania wodorowego (przerywana biała linia).⁵⁸

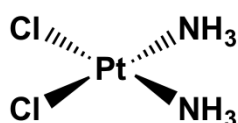
Natomiast tworzenie wiązania krzyżowego jest całkowicie selektywne dla tej samej sekwencji co w przypadku powstawania monoadduktu (CpG) (Rysunek 4.8). Po utworzeniu się pierwszego wiązania kowalencyjnego, powstały monoaddukt jest w odpowiednim ustawieniu do możliwości utworzenia drugiego wiązania pomiędzy atomem C-10 mitomycyny a azotem N-2 guaniny komplementarnej nici DNA (Rysunek 4.6). Wiązanie wodorowe, o którym mowa, jest warunkiem koniecznym w przypadku powstawania monoadduktu. Nie odgrywa ono jednak istotnej roli podczas tworzenia wiązania międzyniciowego (drugiego wiązania kowalencyjnego).^{51, 52}



Rysunek 4.8 Selektywność wiązania międzyniciowego dla sekwencji CpG. Strzałki oznaczają możliwe miejsca tworzenia się wiązania krzyżowego.

4.4 Cisplatyna

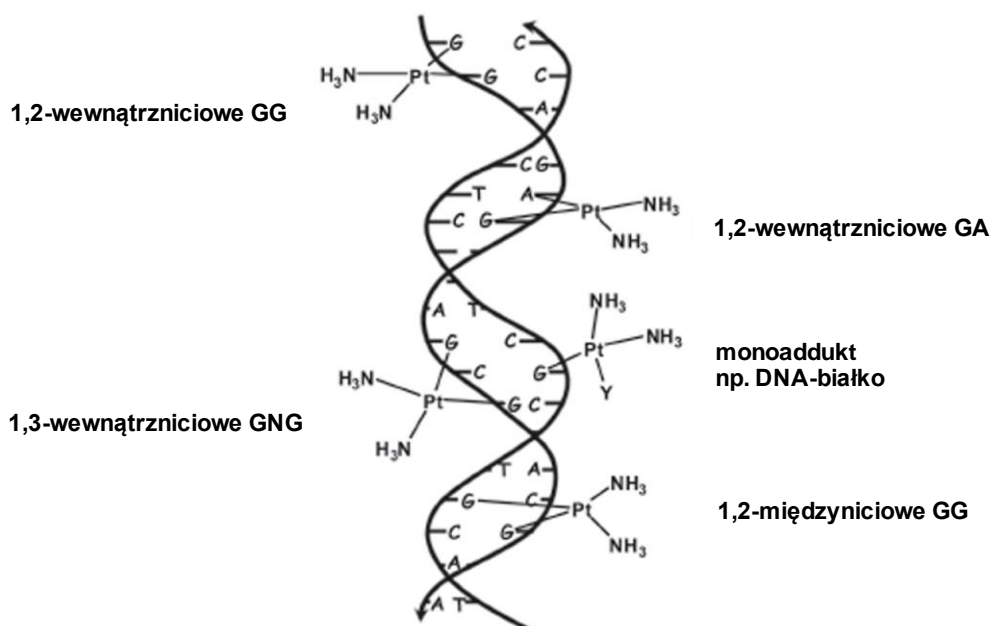
Cisplatyna (Rysunek 4.9), jak wspomniano wcześniej, należy do grupy związków alkilujących DNA. W 1978 roku została zatwierdzona przez FDA w USA, obecnie stosowana jest przede wszystkim w przypadkach raka jąder i jajników. Podstawą działania kompleksu platyny jest inhibicja procesu replikacji DNA poprzez tworzenie wiązań międzyciowych. Cisplatyna jest nieorganicznym związkiem chemicznym, zawierającym atom platyny (na II stopniu utlenienia), w którym ligandami są dwa atomy chloru i dwie cząsteczki amoniaku rozmieszczone w płaszczyźnie, o konfiguracji *cis* ($cis\text{-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$).



Rysunek 4.9 Cisplatyna.

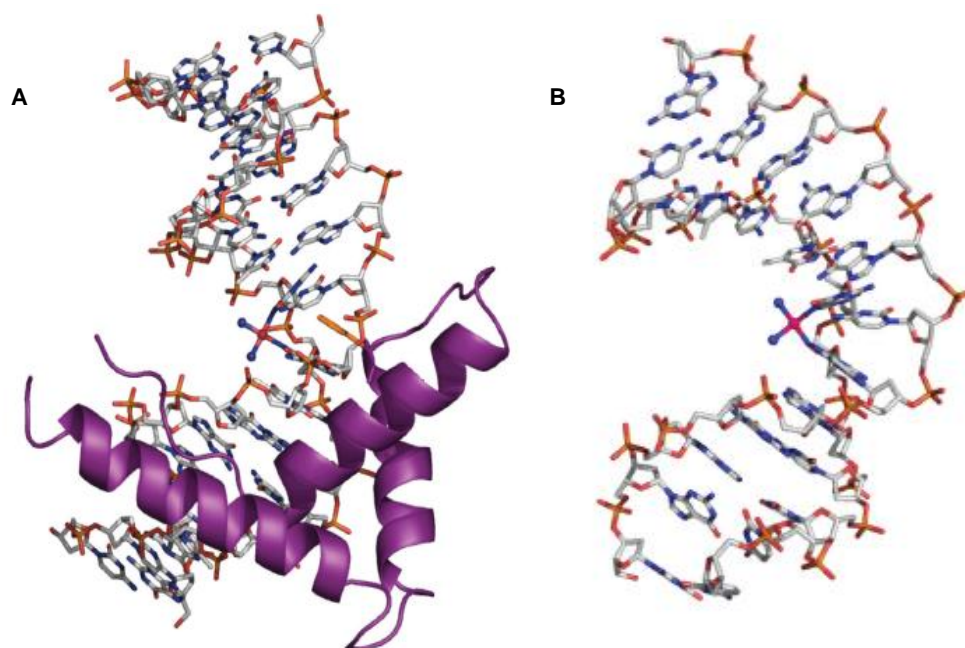
4.4.1 Mechanizm działania

Oddziaływanie cisplatyny z DNA poprzedzone jest hydrolizą kompleksu do aktywnego metabolitu. Początkowo hydrolizie ulega jeden ligand chloru tworząc $cis\text{-[PtCl(H}_2\text{O)(NH}_3)_2]^+$, cząsteczkę zdolną do alkilowania DNA. Uważa się, że powstanie drugiego wiązania z DNA poprzedza proces hydrolizy drugiego liganda chloru.^{21, 59}



Rysunek 4.10 Schemat wiązania cisplatyny z DNA (Y = H₂O/OH, Cl lub białko).⁵⁹

Cisplatyna wiąże się w dużej bruździe helisy DNA. Związek reaguje z DNA tworząc różnego rodzaju połączenia (Rysunek 4.10). Spośród wszystkich połączeń 60 % stanowi dwufunkcyjne, krzyżowe połączenie 1,2-wewnętrznicowe. Jest to produkt alkilowania dwóch sąsiednich atomów N-7 guaniny, selektywny dla sekwencji 5'-(GpG)-3'. Połączenie 1,2-wewnętrznicowe, wiązanie krzyżowe pomiędzy atomem N-7 guaniny a atomem N-7 adeniny, stanowi ok 25 % i jest selektywne dla sekwencji 5'-ApG-3' ale nie dla 5'-GpA-3'.⁶⁰ Cisplatyna tworzy w mniejszym stopniu połączenia: 1,3-wewnętrznicowe GNG, 1,2-międzynicowe pomiędzy dwoma guaninami a także wiązanie krzyżowe pomiędzy DNA i białkiem. Spośród wszystkich połączeń tworzonych przez cisplatynę, najistotniejsze jest dwu funkcyjne 1,2-wewnętrznicowe pomiędzy atomami N-7 sąsiednich guanin. Ten rodzaj wiązania odpowiedzialny jest głównie za aktywność kompleksu platyny. Wiązanie to jest niezwykle stabilne i powoduje specyficzne zgięcie podwójnej nici DNA, co uważa się za główne uszkodzenie prowadzące do apoptozy. Ponadto, miejsce zgięcia jest rozpoznawane przez białko hMSH2 (grupa białek HMG), które w prawidłowych warunkach kontroluje DNA, wyszukując uszkodzenia (Rysunek 4.11 A). Białko to występuje w dużych ilościach w jądrze i jajniku co by wyjaśniało, że cisplatyna jest najbardziej skuteczna w leczeniu nowotworów tych narządów. Uważa się, że białka HMG odgrywają istotną rolę zarówno w cytotoksyczności jak również oporności na kompleksy platyny.^{61, 62}



Rysunek 4.11 Zgięcie łańcucha DNA po związaniu cisplatyny: A- struktura zawierająca domenę A białko HMG (oznaczone kolorem fioletowym) oddziałująca bezpośrednio z adduktem DNA; B- struktura adduktu cisplatyny z 12-merem d(CCTCTGGTCTCC)*d(GGAGACCAGAGG). Kolor różowy oznacza Pt, niebieski-N, czerwony-O, pomarańczowy-P, szary-C.⁵⁹

Struktura (Rysunek 4.11 B), otrzymana z wykorzystaniem eksperymentów 2D NMR oraz w oparciu o dynamikę molekularną, potwierdza, że wiązanie 1,2-wewnętrznicowe pomiędzy dwiema sąsiednimi guaninami powoduje znaczne zgięcie dupletu DNA w kierunku dużej bruzdy, nie powodując zerwania wiązań wodorowych pomiędzy parami zasad. Powoduje również poszerzenie i spłaszczenie małej bruzdy naprzeciwko miejsca wiązania się kompleksu platyny. Ponadto, podwójna helisa ulega rozwinięciu o 25° od strony wiązania z platyną.^{59, 63}

W zrozumieniu mechanizmu działania cisplatyny pomogły badania prowadzone z *trans*-platyną. Związek ten, ze względu na swoją budowę przestrzenną, nie tworzy wiązań 1,2- wewnętrznicowego z sąsiadującymi atomami guaniny. *Trans*platyna tworzy głównie połączenia 1,3-wewnętrznicowe. Prawdopodobnie dlatego *trans*-platyna nie wykazuje aktywności przeciwnowotworowej.⁶⁴

Od czasu odkrycia właściwości cisplatyny w 1965 roku, zsyntezowanych zostało ponad 3000 związków platyny, z których tylko sześć znalazło zastosowanie kliniczne.

4.5 Bleomycyna

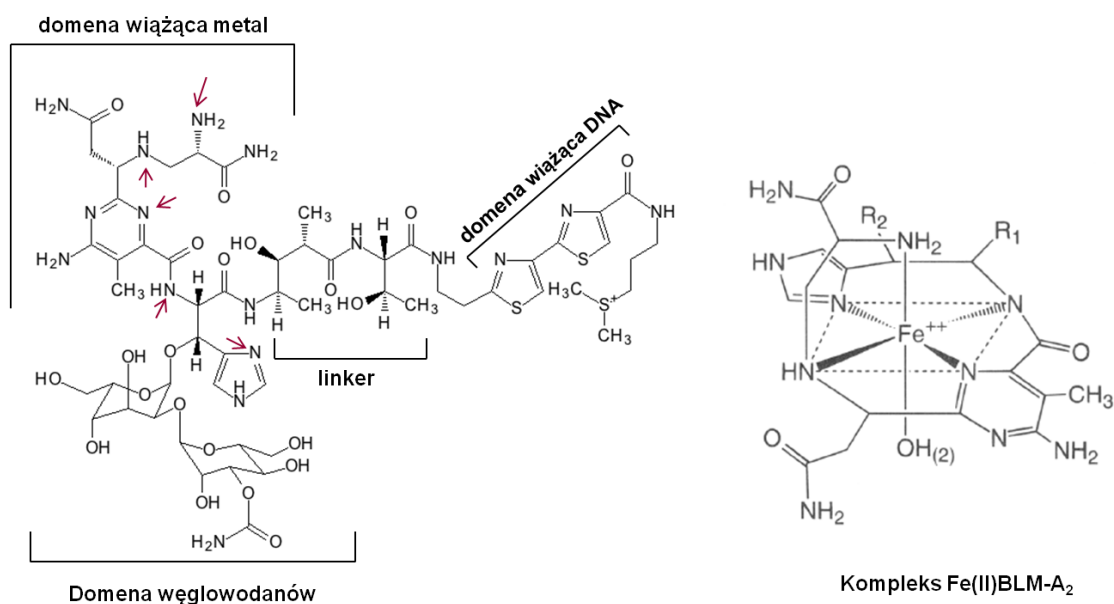
Bleomycyna (BLM) jest antybiotykiem glikopeptydowym otrzymywanym ze szczepu *Streptomyces verticillus*. Tworząc aktywny kompleks z żelazem powoduje rozcięcie nici DNA i zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2 i S, co w konsekwencji prowadzi do apoptozy komórek nowotworowych. W chemioterapii znana jako blenoxan (m.in. mieszanka bleomycyny A₂ i B₂), stosowana w leczeniu raka płaskonabłonkowego szyi i głowy, ziarnicy złośliwej.⁶⁵

4.5.1 Budowa cząsteczki i aktywacja kompleksu bleomycyny

Głównym składnikiem blenoxanu jest bleomycyna A₂ (BLM-A₂), wykazuje ona większą toksyczność w porównaniu do bleomycyny B₂. Cząsteczka BLM-A₂ składa się z wielu ugrupowań pełniących określone funkcje.

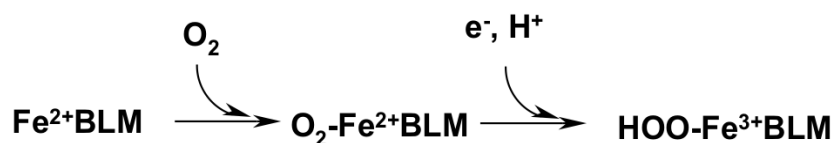
Można wyróżnić cztery ugrupowania:

1. Domenę wiążącą metal: atomy azotu β-hydroksyhistydyny, β-aminoalaniny, pirymidyno propionamidu (zaznaczone strzałkami na rysunku 4.12), które wiążą się z atomem metalu, tworząc stabilny kompleks z żelazem (II);
2. Domenę wiążącą DNA: dwa pierścienie tiazoli odpowiedzialne są za interkalację do podwójnej helisy DNA. Terminalny podstawnik zawierający ładunek dodatni na atomie siarki oddziałuje elektrostatycznie z ujemną grupą fosforanową DNA;
3. Domenę węglowodanów: guloza oraz karbamylowana mannoza, uważa się za odpowiedzialne za selektywną akumulację kompleksu BLM-A₂ w poszczególnych komórkach nowotworowych;
4. Linker: łączy domeny wiążące metal i DNA, ma istotny wpływ na proces podwójnego przecięcia nici DNA przez kompleks bleomycyny. Niewielka zmiana w tej części struktury powoduje dramatyczną zmianę zdolności BLM do przecinania DNA.



Rysunek 4.12 Budowa cząsteczki BLM-A₂ uwzględniająca poszczególne domeny, linker oraz atomy azotu biorące udział w tworzeniu kompleksu z żelazem(II). Proponowana struktura trójskładnikowego kompleksu Fe(II)BLM-A₂. Podstawnik R₁ oznacza linker oraz domenę wiążącą DNA, R₂ oznacza domenę węglowodanów.

Bleomycyna tworzy trójskładnikowy kompleks z atomem żelaza (II) i tlenem (Rysunki 4.12; Schemat 4.9)⁶⁶, który pod wpływem drugiej cząsteczki tego kompleksu lub mikrosomalnego NAD(P)H-cytochromu 450 tworzy aktywny kompleks nadtlenowodoru żelaza (III) bleomycyny (HOO-Fe³⁺BLM). Obecność aktywowanego kompleksu BLM została potwierdzona przy pomocy technik: ESI MS, UV, EPR. Jest to ostatni wykrywalny produkt pośredni poprzedzający rozcięcie nici DNA.^{7, 67-69}

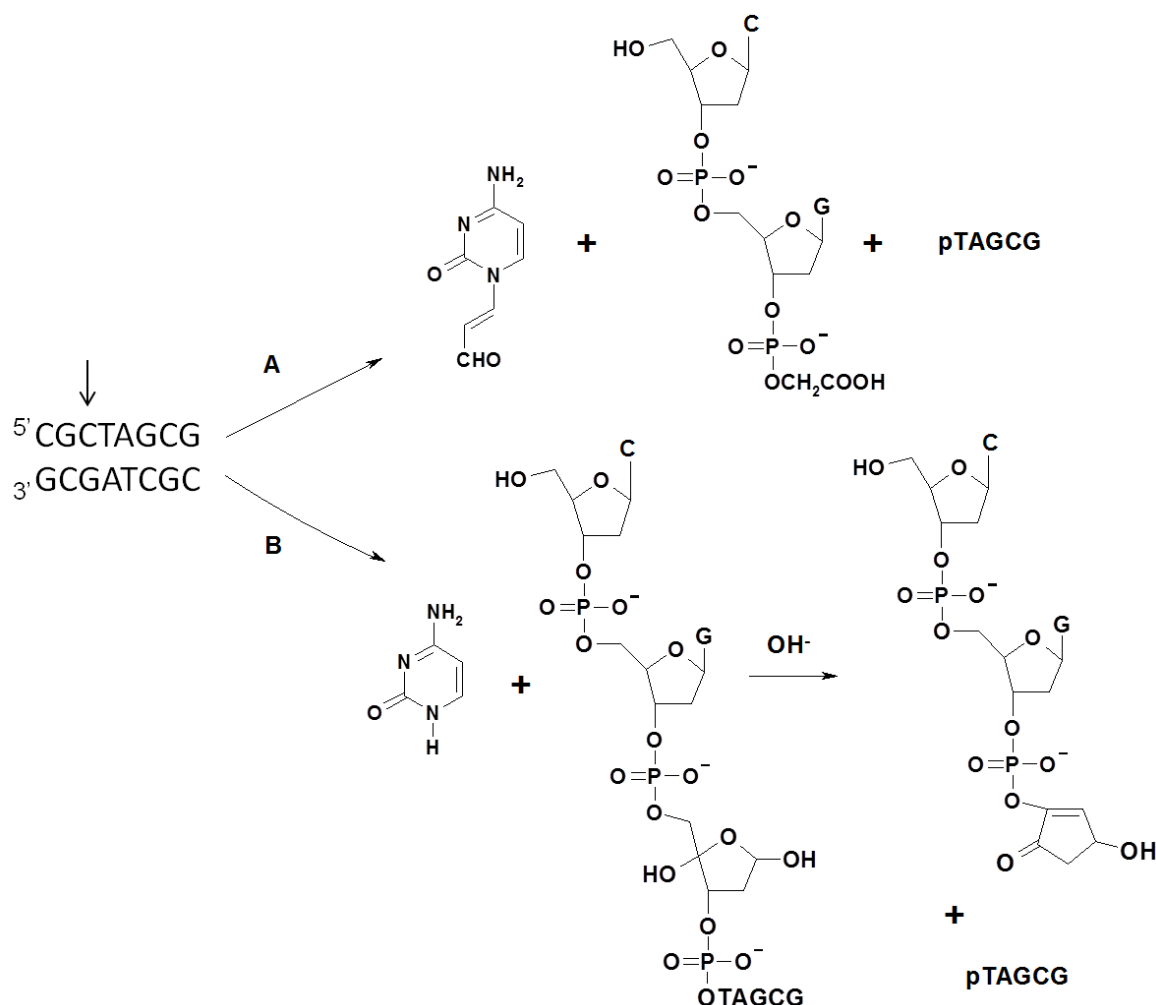


Schemat 4.9 Proponowany mechanizm aktywacji BLM.

4.5.2 Mechanizm rozerwania nici DNA

Aktywny kompleks BLM powoduje pojedyncze bądź podwójne rozcięcie nici DNA poprzez oderwanie atomu wodoru i generowanie rodnika na atomie węgla C-4' deoksyrybozy w cząsteczce DNA. W zależności od warunków reakcja może zachodzić według dwóch mechanizmów. W warunkach tlenowych w wyniku dostarczenia cząsteczki tlenu następuje rozcięcie nici w dwóch miejscach. Produktami reakcji są: pochodna propenu zasady

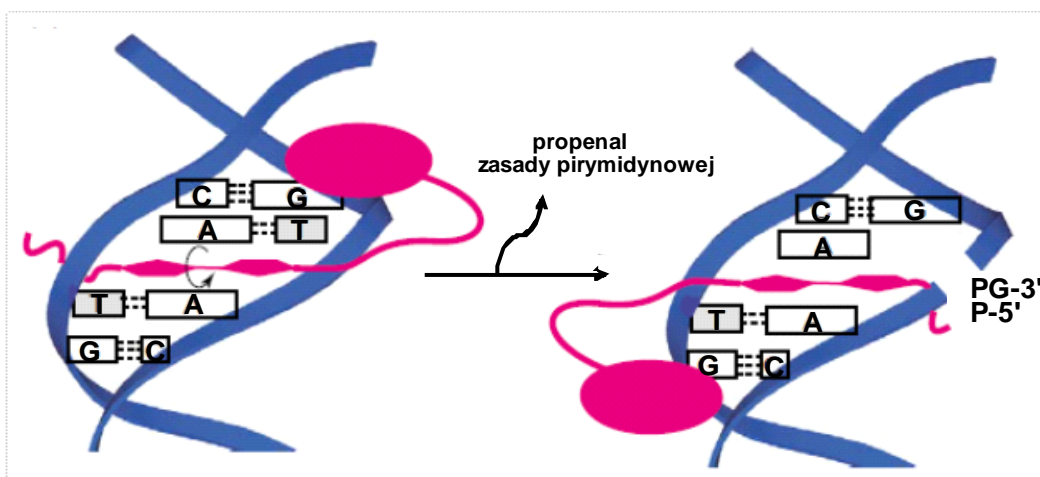
pirymidynowej, 3'-fosfoglikolan DNA oraz 5'-fosforan DNA. W warunkach beztlenowych zostaje oderwana cząsteczka zasady pirymidynowej. W wyniku dalszych przemian powstaje cyklopentenonowa pochodna DNA oraz 5'-fosforan DNA.^{7, 65, 67} Przykładowe produkty reakcji kompleksu BLM z sekwencją d(CGCTAGCG)₂ w warunkach tlenowych i beztlenowych przedstawia schemat 4.10.⁷⁰ Podwójne rozcięcie nici DNA zachodzi wyłącznie przy udziale cząsteczki tlenu.



Schemat 4.10 Reakcja kompleksu BLM z d(CGCTAGCG). A- przebiegu reakcji w warunkach tlenowych; B- przebiegu reakcji w warunkach beztlenowych. Strzałka oznacza miejsce rozcięcia nici.

Mechanizm powodujący podwójne rozcięcie DNA został zaproponowany przez grupę Stubbe'a (Rysunek 4.13). W oparciu o badania NMR kompleksu HOO-Co³⁺BLM z DNA zaproponowano, że domena wiążąca metal przenosi się z jednej nici do przeciwległej nici poprzez obrót o 180° wokół osi bitiazoli a następnie obrót o 117° wokół osi prostopadłej do pierścieni tiazoli.^{67, 68} Na podstawie tych badań uważa się, że kompleks żelaza i BLM

początkowo utlenia jedną z nici DNA, a potem przenosi się na następną. Konkurencyjny model został także przedstawiony przez grupę Hechta, na podstawie badań na kompleksach Zn-BLM.⁷¹

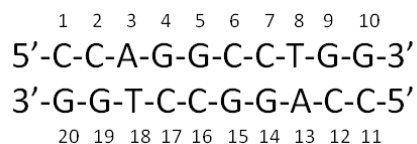


Rysunek 4.13 Model mechanizmu pozwalającego aktywowanej BLM uczestniczyć w podwójnym rozcięciu nici DNA bez konieczności dysocjacji z DNA. Kompleks BLM oznaczony kolorem różowym (owalna część oznacza domenę wiążącą metal, pięciokąty oznaczają pierścienie tiazoli, linia pomiędzy tymi częściami oznacza linker).⁶⁸

4.5.3 Specyficzność oddziaływania

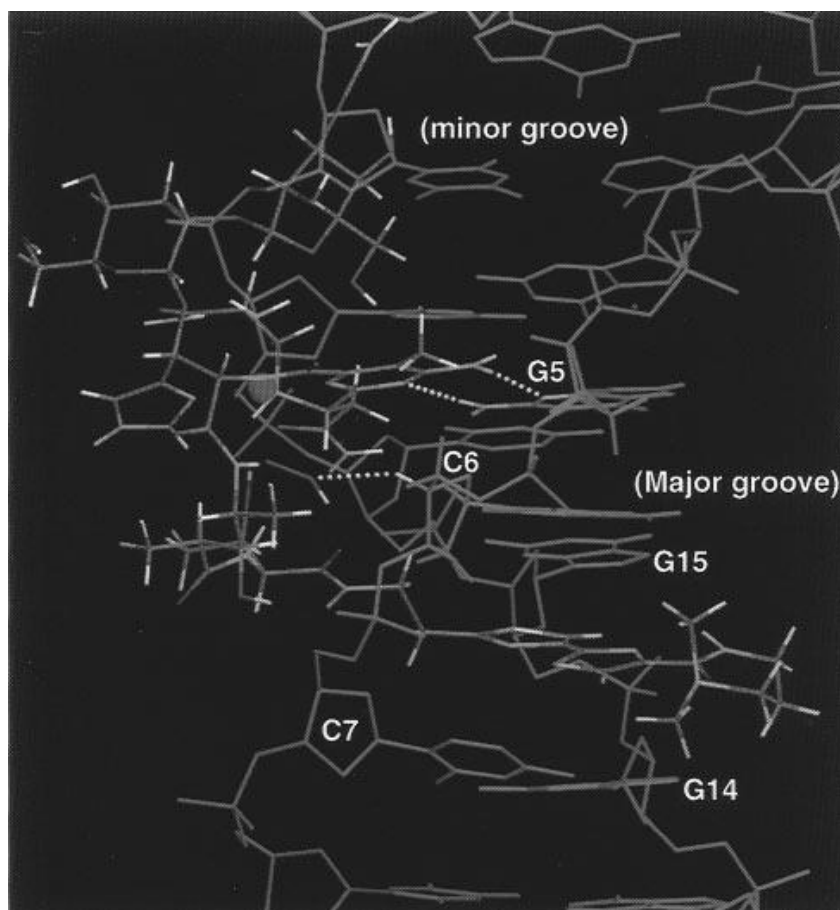
Aktywny kompleks BLM powoduje rozcięcie DNA selektywnie dla sekwencji 5'-GPy-3' (Py- oznacza zasady pirymidynowe DNA; T i C). W celu wyjaśnienia mechanizmu selektywnego oddziaływania, podjęto próby wyznaczenia struktury aktywnego kompleksu BLM z DNA, przy użyciu m.in. technik NMR. Niestety napotkano trudności wynikające z nietrwałości i właściwości paramagnetycznych cząsteczki HOO-Fe³⁺BLM. Wiarygodnym analogiem aktywnego kompleksu BLM okazał się kompleks HOO-Co³⁺BLM. Kompleks ten pod wpływem fotochemicznej aktywacji powoduje rozcięcie DNA poprzez wytworzenie rodnika na atomie C-4 oraz wykazuje tę samą selektywność co aktywny kompleks BLM. Ponadto, jest diamagnetykiem wystarczająco trwałym by przeprowadzić eksperymenty NMR.

W oparciu o badania eksperymentalne z zastosowaniem technik 2D NMR (m.in. obserwacji wewnątrz i międzycząsteczkowych oddziaływań NOE) oraz obliczenia dynamiki molekularnej, wyznaczono strukturę kompleksu HOO-Co³⁺BLM z komplementarnym dekamerem (Rysunek 4.14).



Rysunek 4.14 Oznaczenia nukleotydów w sekwencji komplementarnego dekameru.

Domena wiążąca metal oraz linker oddziałuje w małej bruzdzie, wpływając na selektywność rozerwania nici DNA. Dane eksperymentalne pokazują oddziaływanie międzycząsteczkowe NOE pomiędzy protonem ligandu wodoronadtlenku a protonami C-6 i C-7 w małej bruzdzie. Na podstawie struktury kompleksu (Rysunek 4.15) oszacowano, że odległość pomiędzy terminalnym atomem tlenu ligandu wodoronadtlenkowego (HOO-) w kompleksie $\text{HOO-Co}^{3+}\text{BLM}$ znajduje się w odległości 2.5 Å od protonu H4' deoksyrybozy C-6, którego oderwanie prowadzi do rozcięcia nici DNA.⁷²



Rysunek 4.15 Struktura $\text{HOO-Co}^{3+}\text{BLM}$ z dupleksem dekameru d(CCAGGCCTGG). Linie przerywane oznaczają wiązania wodorowe pomiędzy kompleksem a G-5 oraz dystans pomiędzy tlenem ligandu nadwodortlenkowego a protonem H4' należącym do C-6.⁷²

Ponadto struktura stabilizowana jest przez tworzenie się wiązań wodorowych pomiędzy N/NH₂ pirymidyny w kompleksie BLM a N-3/NH₂ guaniny G-5. Wyjaśnia to preferencje oddziaływania aktywnego kompleksu BLM w stosunku do sekwencji 5'-GPy-3' niż 5'-APy-3' (w tym przypadku do sekwencji 5'-GC-3' niż 5'-AC-3').

Wyznaczenie struktury pozwoliło na określenie oddziaływania domeny wiążącej DNA. Terminalny pierścień tiazolu interkaluje pomiędzy zasady G-14 i G-15, zaś przedostatni pierścień tiazolu częściowo interkaluje pomiędzy zasady C-6 i C-7.^{67, 72}

Badania oddziaływania kompleksu HOO-Co³⁺BLM z dupleksem dekameru o sekwencji 5'-d(CCAGTACTGG)₂ wykazały duże podobieństwo do struktury przedstawionej na Rysunku 4.15. W przypadku tej sekwencji rozcięcie nici następuje na T-5 (przykład oddziaływania kompleksu BLM z sekwencją 5'-GT-3').⁷³

Bleomycyna została odkryta w 1966 roku.⁷⁴ Mimo przeprowadzenia wielu badań, mechanizm działania aktywnego kompleksu BLM z DNA nie jest do końca poznany. Sposób oddziaływania aktywnej BLM z DNA opiera się jedynie na badaniu analogicznych kompleksów BLM z metalami takimi jak : Co, Zn, Cu.

Bleomycyna A2 jest związkiem pochodzenia naturalnego, wykazującym silne właściwości przeciwnowotworowe, wynikające przede wszystkim z możliwości podwójnego utleniania DNA. Związki należące do tej rodziny nadal są obiektem wielu badań mających na celu zbadanie ich właściwości i mechanizmu działania.

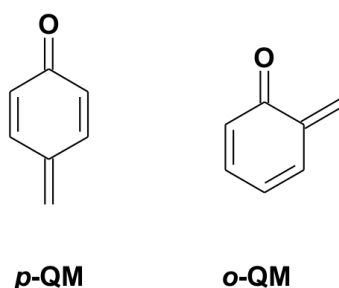
5 *o*-Metylenochinon

Metylenochinon (QM) i jego pochodne znalazły powszechne zastosowanie w syntezie chemicznej oraz chemii medycznej. Wiele pochodnych QM jest związkami pochodzenia naturalnego. Są także ważnymi produktami pośrednimi w syntezie związków biologicznie czynnych i polimerów.⁷⁵ Stanowią również ważną grupę związków alkilujących oraz sieciujących DNA.

Pierwsze doniesienia o istnieniu produktu pośredniego, *o*-metylenochinonu pojawiły się już w 1907 roku, jednak pierwsze bezpośrednie dowody na istnienie QM zostały przedstawione dopiero w 1998 roku przez grupę Amouri'ego.⁷⁶

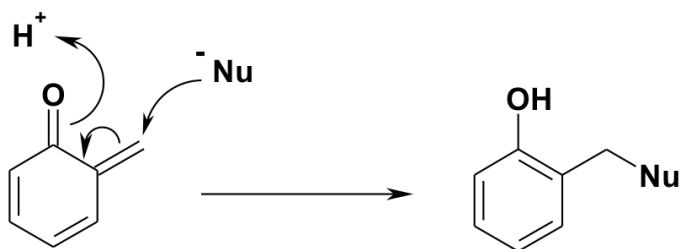
5.1 Struktura i właściwości

W odróżnieniu od chinonu, związki tej klasy zamiast jednego atomu tlenu posiadają grupę metylenową. QM może istnieć w trzech izomerycznych formach: *orto*-, *meta*- i *para*-QM.

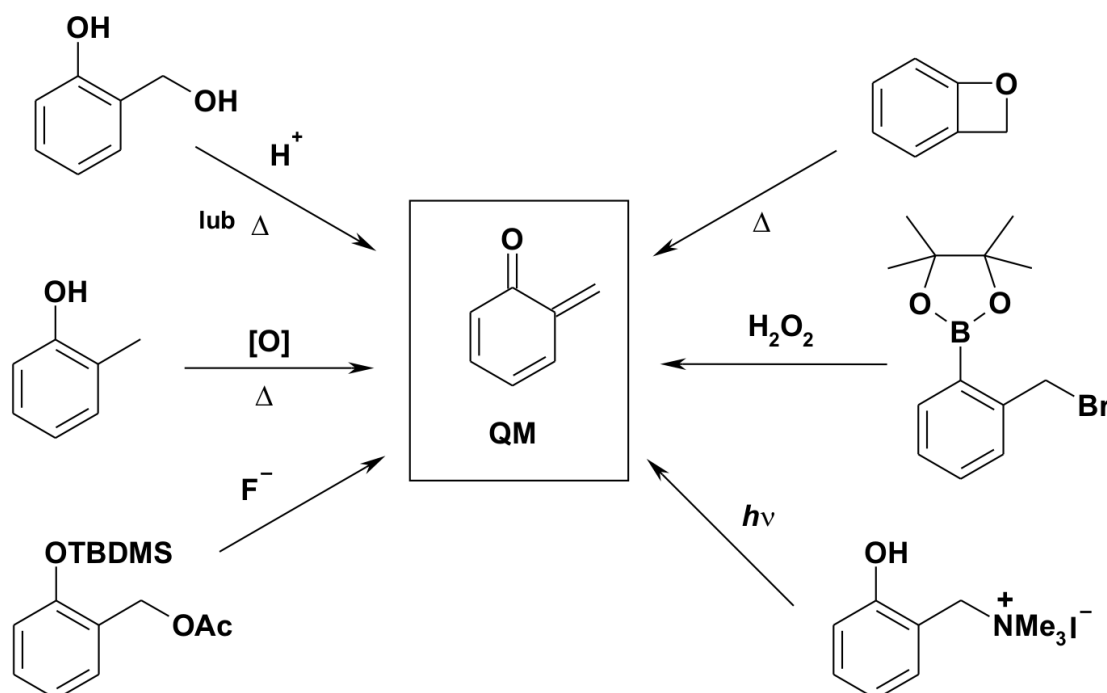


Rysunek 5.1 Izomery *orto*- i *para*-QM.

Z pośród trzech izomerów najczęściej występują izomery *orto*- i *para*-QM (Rysunek 5.1). Interesujący jest głównie izomer *o*-QM (określany dalej jako QM) ze względu na szerokie spektrum zastosowania w porównaniu do pozostałych izomerów.



QM jest silnym elektrofilem i może reagować z wieloma nukleofilami poprzez grupę metylenową (Schemat 5.1). Jest także dobrym akceptorem Michaela. Dlatego jest produktem pośrednim w wielu reakcjach chemicznych.⁷⁷ Szczególnie ważne są związki, w których potencjalnie można generować to aktywne ugrupowanie i wykazujące dobrą rozpuszczalność w wodzie, mogące reagować z centrami nukleofilowymi kwasów nukleinowych. Ze względu na wysoką aktywność związku tej klasy bardzo często istnieją jedynie *in situ*. QM może być generowany termicznie,⁷⁸ przez naświetlanie światłem UV,^{79, 80} utlenianie oraz redukcję (Schemat 5.2).^{81, 82} Stosuje się także związki chemiczne, powodujące odejście grup zabezpieczających oraz metody biologiczne, np. z zastosowaniem enzymów.⁸³

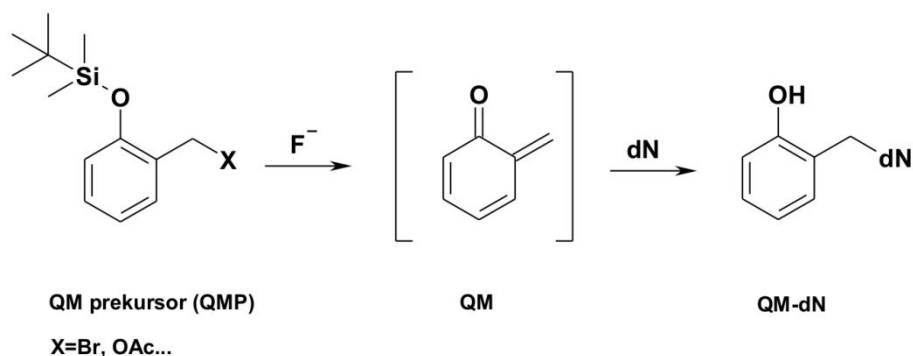


Schemat 5.2 Przykładowe metody generowania QM.

5.2 Reakcje QM z zasadami azotowymi DNA

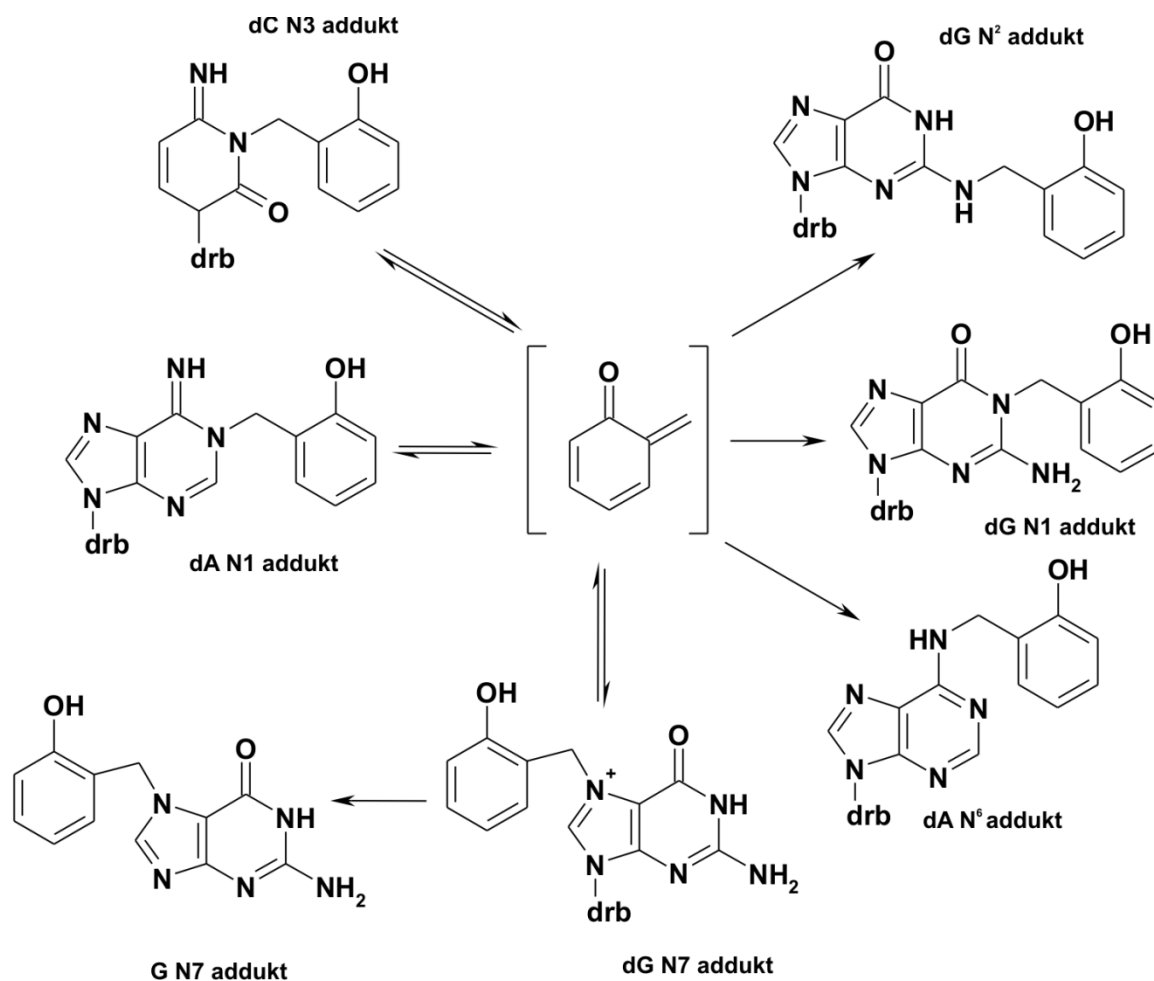
Związki typu QM stanowią grupę związków alkilujących, które w reakcji z nukleofilowymi centrami DNA tworzą zarówno odwracalne jak i nieodwracalne addukty. W celu lepszego zrozumienia sposobu oddziaływania tych związków z kwasami nukleinowymi, grupa Rokity postanowiła zbadać w jaki sposób przebiegają reakcje z pojedynczymi nukleozydami.^{84, 85} Wydaje się jednak oczywiste, że reakcje QM z pojedynczymi nukleozydami nie odzwierciedlają w pełni reaktywności centrów

nukleofilowych w helisie DNA. Spowodowane jest to ograniczeniami strukturalnymi oraz występowaniem wiązań wodorowych pomiędzy parami zasad.



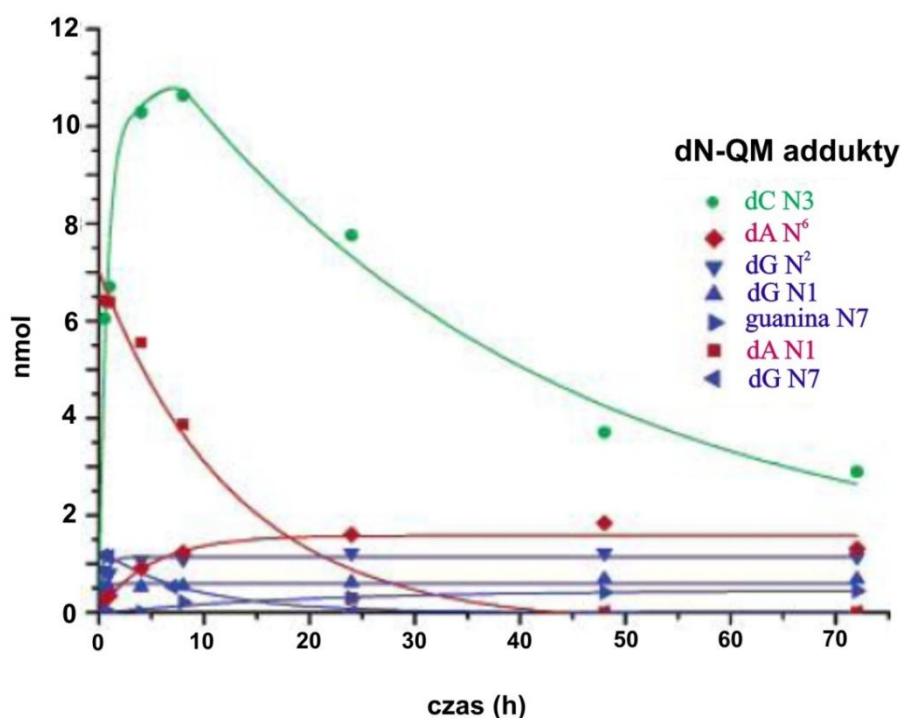
Schemat 5.3 Generowanie i reakcja QM *in situ* z 2'-deoksynukleozydami.

Do badań w grupie Rokity wykorzystano niepodstawione prekursory QM (QMP), które są aktywowane przez dodatek fluorku (fluorku potasu) co skutkuje odejściem silylowej grupy zabezpieczającej (Schemat 5.3). Przeprowadzone badania dowodzą, że reakcje QM z silnymi nukleofilami deoksynukleozydów (dG N7, dC N3, dA N1) przebiegają szybko, tworząc odwracalne produkty kinetyczne. Addukty te ulegają reakcji odwracalnej stanowiąc źródło QM, przedłużając tym samym czas życia produktu przejściowego.⁸⁶ Ostatecznie, w wyniku procesu kontrolowanego termodynamicznie, tworzą się nieodwracalne produkty alkilowania ze słabymi nukleofilami deoksynukleozydów (dG N², dG N1, dA N⁶) (Schemat 5.4).⁸⁴ Addukt dG N7 ponadto ulega deglikozylacji.



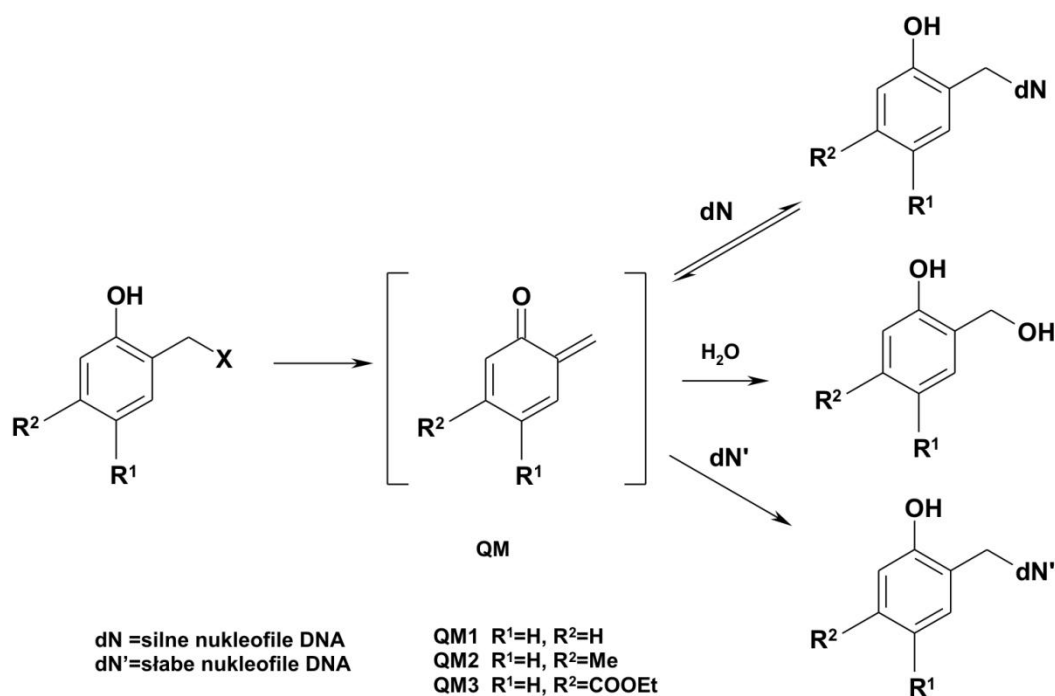
Schemat 5.4 Produkty alkilowania deoksynukleozydów przez QM (drb:oznacza 2'-deoksyrybozę).

Badania odwracalności reakcji alkilowania QM z deoksynukleozydami (dA, dG, dC, dT) w funkcji czasu dowodzą, że wydajność reakcji zależy od siły reagującego nukleofila. Addukty silnych nukleofili (dA N1 i dC N3) powstają z wydajnością około 7 razy wyższą niż addukty ze słabymi nukleofilami (Rysunek 5.2). Produkty te, w miarę upływu czasu ulegają szybkiemu rozpadowi, co wydaje się być zależne od ich kwasowości. Produkty dG N7 i dA N1 charakteryzują się pKa poniżej 4 zaś addukty słabych nukleofili są stabilne a ich pKa jest wyższe niż 9.⁸⁴ W przypadku adduktów metylenochinonu z silnymi nukleofilami DNA są one dobrymi grupami opuszczającymi, sprzyjającymi rozpadowi adduktu i regeneracji produktu przejściowego.



Rysunek 5.2 Wykres zależności ilości otrzymanych produktów (wyrażona w nanomolach) od czasu w reakcji alkilowania 2'-deoksynukleozydów (dA, dG, dC, dT) przez QM.⁸⁴

Obliczenia teoretyczne mające na celu przewidywanie preferowanych produktów kinetycznych a także ich stabilność, potwierdzają wyniki badań otrzymanych przez grupę Rokity (Rysunek 5.2).^{84, 87} Według obliczeń, energie aktywacji alkilowania dC N3 i dA N1 przez QM w warunkach wodnych wynoszą odpowiednio 14.2 kcal mol⁻¹ i 14.5 kcal mol⁻¹.⁸⁷ Wartości te są znacznie niższe niż wartości energii aktywacji pozostałych nukleofili, które przeważnie wynoszą ponad 20 kcal mol⁻¹. Dlatego też, dominującymi produktami reakcji są addukty dC N3 i dA N1. Niską wydajność reakcji dla adduktu dG N7, może tłumaczyć energia aktywacji wynosząca 20.1 kcal mol⁻¹, która jest zbliżona do energii aktywacji słabych nukleofili. Addukt ten ulega również deglikozylacji do adduktu G-N7 (Schemat 5.4). Obliczenia teoretyczne dowodzą także, że energie aktywacji reakcji odwracalnej dla adduktów silnych nukleofili dA N1, dC N3 oraz dG N7 wynoszą odpowiednio 19.7 kcal mol⁻¹, 21.4 kcal mol⁻¹, 22.9 kcal mol⁻¹, co tłumaczy ich niestabilność. Z kolei energie aktywacji procesu odwracalnego dla adduktów słabych nukleofili dA N⁶, dG N1 i dG N² wynoszą znacznie powyżej 30 kcal mol⁻¹.⁸⁷ Przez to produkty te ulegają reakcji nieodwracalnej i wykazują trwałość w badanych warunkach.

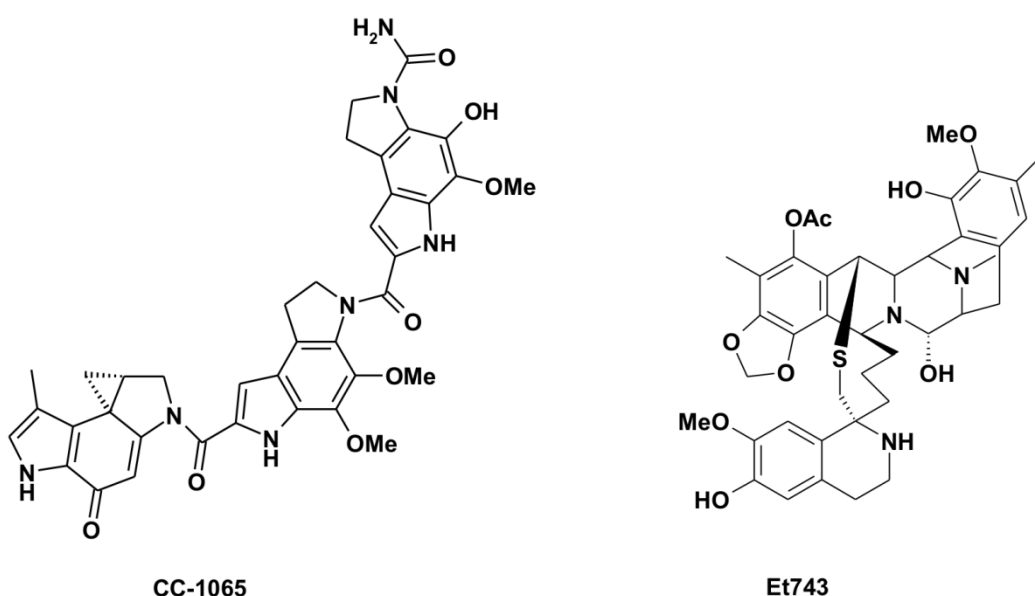


Schemat 5.5 Modyfikacja struktury prekursora QM (QM1) poprzez wprowadzenie podstawników w pierścieniu aromatycznym.

Tworzenie się produktu przejściowego QM oraz jego zdolność do regenerowania się poprzez rozpad adduktu, zależy od stabilizacji QM oraz właściwości sprzężonego z nim nukleofila jako grupy opuszczającej. Wprowadzenie grup elektroakceptorowych bądź też elektronodonorowych do pierścienia aromatycznego prekursora QM (QM1) znacznie wpływa na stabilność produktu przejściowego oraz jego produktów kinetycznych. Badania dowodzą, że wprowadzenie podstawnika elektronodonorowego (R^2 –grupa metylowa, QM2, Schemat 5.5) wpływa na stabilizację produktu pośredniego, wzrost szybkości powstawania adduktów kinetycznych oraz ich rozpad do QM. Przykładem może być addukt QM2-dC N3, którego okres półtrwania jest około 5 razy krótszy w porównaniu do okresu półtrwania adduktu z niepodstawionym QM (QM1-dC N3). Sytuacja jest natomiast odwrotna, gdy prekursor QM1 zawiera grupę elektroakceptorową (R^2 - grupa estrowa COOEt, QM3, Schemat 5.5), która destabilizuje produkt przejściowy. Addukty tworzą się znacznie wolniej oraz wykazują wyższą trwałość. Addukt QM3-dC N3 wykazuje stabilność przez około 7 dni. Zaobserwowano, że addukt QM3-dG N7 ulega od razu deglikozylacji do produktu QM-G N7. Elektroakceptorowa grupa estrowa (*ang.* EWG) powoduje zahamowanie regeneracji QM.⁸⁸ Podobne zależności zaobserwowano w przypadku modyfikacji prekursorów QM1, wprowadzając różne grupy funkcyjne w pozycji R^1 , jednak ich wpływ był znacznie mniejszy niż w przypadku podstawników w pozycji R^2 .

5.3 Alkilowanie DNA

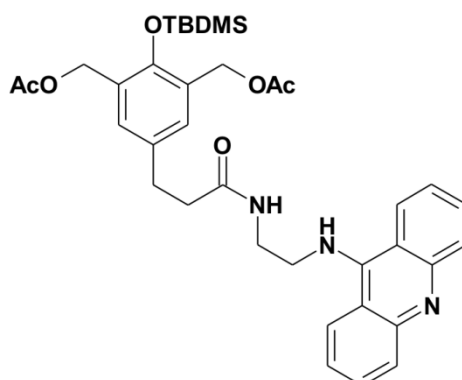
Jak wcześniej zostało opisane związki takie jak mechloretamina (Rysunek 4.5) czy mitomycyna (Rysunek 3.6), są związkami alkilującymi DNA. Ich właściwości przeciwnowotworowe wynikają głównie z możliwości tworzenia wiązania międzyniciowego w cząsteczce DNA. Są to wiązania nieodwracalne. Nieuniknione jest także powstawanie innych produktów alkilacji np. monoadduktów DNA, gdzie drugie centrum aktywne cząsteczki ulega dezaktywacji w procesie hydrolizy. Tworzenie się wielu produktów alkilowania wpływa znacznie na zmniejszenie wydajności powstawania wiązania międzyniciowego, skutkiem czego jest obniżenie efektywności działania tych związków.



Rysunek 5.3 Przykłady związków tworzących nietrwałe wiązanie z DNA.

Oprócz związków alkilujących DNA w sposób nieodwracalny znane są związki, które wiążą się z DNA tworząc odwracalne produkty. Przykładami takich cząsteczek są: CC-1065,⁸⁹ ekteinascydyna (Rysunek 5.3)⁹⁰ oraz duokarmycyna (Rysunek 3.6).⁹¹ Ekteinascydyna (Et743) jest naturalnym związkiem, wykazującym właściwości przeciwnowotworowe, który obecnie jest w trakcie badań klinicznych. Związek ten tworzy wiązanie kowalencyjne z grupą aminową (N^2) guaniny w małej bruzdzie DNA. Et743 wiąże się w sposób odwracalny (cząsteczka migruje wzdłuż nici tworząc odwracalne wiązanie kowalencyjne) do momentu utworzenia najbardziej stabilnego adduktu.⁹⁰ W przypadku bizelesyny, początkowo powstaje odwracalne wiązanie tworzące kinetycznie uprzywilejowany monoaddukt, który następnie migruje wzdłuż nici DNA w celu utworzenia uprzywilejowanego termodynamicznie wiązania międzyniciowego. Termodynamiczny bisaddukt powstaje pomiędzy adenozydami

oddzielonymi od siebie o cztery pary zasad.^{92, 93} Zaletą związków, które tworzą początkowo wiązania odwracalne a następnie tworzą termodynamiczne produkty nieodwracalne, jest zwiększenie efektywności działania oraz przedłużenie czasu życia aktywnej cząsteczki.

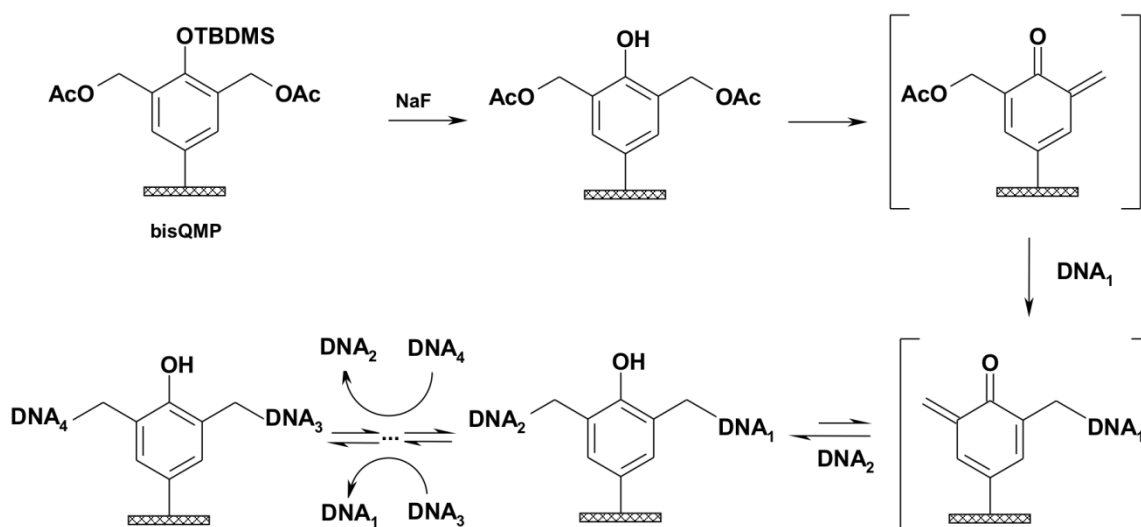


Rysunek 5.4 Struktura prekursora bisQMP.

W literaturze opisanych jest wiele związków z motywem QM, które zarówno alkilują jak i tworzą wiązanie krzyżowe z DNA. Przykładami takich związków są pochodne: boronianów aryli,^{94, 95} binolu,⁹⁶ N-metylochinoliny.⁹⁷ Znane są połączenia prekursorów QM z DNA bądź cząsteczkami interkalatorów, pełniącymi funkcję nośników. Przykładem takiego koniugatu jest połączenie bifunkcyjnego prekursora QM z cząsteczką akrydyny (bisQMP), która wiąże się w dużej bruździe DNA (Rysunek 5.4). Aktywacja QM następuje przy udziale jonu fluorkowego.⁹⁸ Aktywowana cząsteczka w reakcji z dupleksem DNA tworzy wiązanie międzyniciowe z wydajnością do 70%.⁹⁹ Wiadomo, że w początkowym etapie reakcji tworzą się zarówno produkty kinetyczne jak i termodynamiczne. Wysoka efektywność do tworzenia wiązania międzyniciowego może być spowodowana przez odwracalność reakcji. Regeneracja bisQM jest spodziewana ze względu na możliwość alkilowania atomu N7 guaniny, który jest dostępnym centrum nukleofilowym w dużej bruździe DNA. Wcześniejsze badania dowodzą, że addukt QM-dG N7 jest nietrwały i prowadzi do regeneracji związku przejściowego.⁸⁴

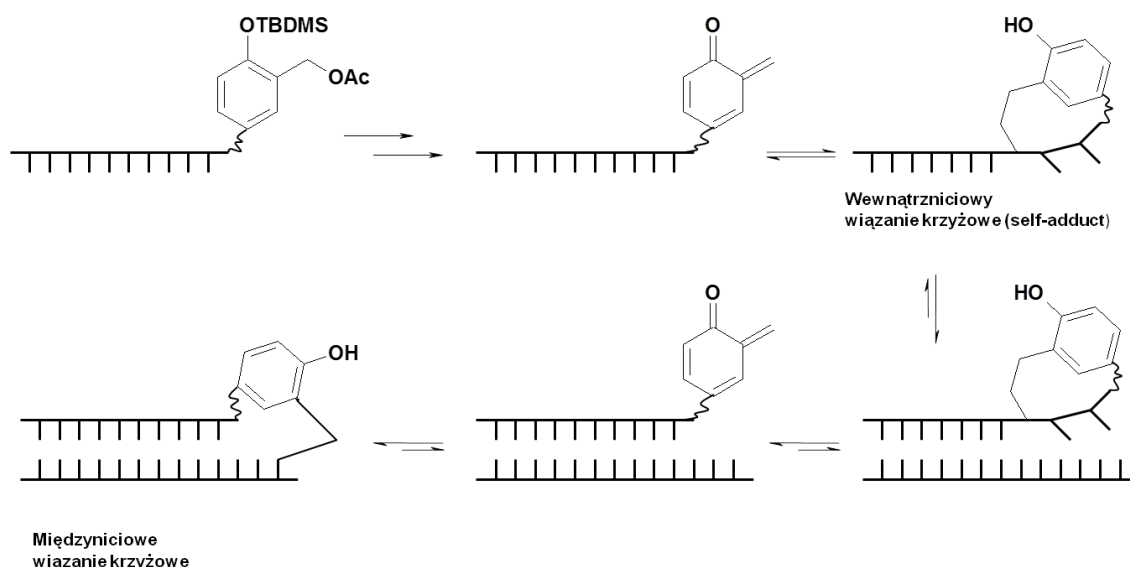
W trakcie reakcji QM lub bisQM zachodzi również konkurencyjna reakcja z cząsteczką wody (Schemat 5.5). Produkty hydrolizy uniemożliwiają alkilację DNA (w przypadku QM) lub też tworzenie wiązania krzyżowego (reakcja z bisQM). Badania czasu życia bisQM dowiodły, że tworzenie labilnych adduktów z silnymi nukleofilami znacznie wydłuża okres półtrwania produktu przejściowego. Ponadto bisQM ulegający reakcji z pojedynczą nitką DNA (ssDNA), tworzy wiązanie krzyżowe wewnątrznicowe, które umożliwia utworzenie dupletu z komplementarną nicią. Zaobserwowano, że utworzenie takiego dupletu DNA powoduje utworzenie się trwalszego wiązania międzyniciowego pomiędzy

komplementarnymi nićmi.¹⁰⁰ Utworzenie wiązania krzyżowego wcale nie oznacza końca reakcji, bisQM może ulegać regeneracji i tworzyć tego typu wiązania z innymi sekwencjami DNA (Schemat 5.6).¹⁰¹



Schemat 5.6 Aktywowanie bisQM oraz kolejne reakcje wymiany pomiędzy DNA.

Związki mające zdolność do alkilowania i tworzenia wiązań krzyżowych ze ściśle określonym fragmentem DNA są wysoce pożądane w zastosowaniu klinicznym.¹⁰² Grupa Rokity, badając cząsteczki składające się z prekursora QM połączonego z oligonukleotydem DNA zaobserwowała, że aktywowany QM tworzy stabilny wewnętrzny addukt (*ang.* self-adduct). Ponadto produkt wewnętrznej reakcji jest produktem dominującym i nie zaobserwowano produktu hydrolizy.¹⁰³ Podobnie jak w przypadku adduktu bisQM z ssDNA, wiązanie wewnętrzne QM-ssDNA umożliwia tworzenie się dupleksu z komplementarną nicią.¹⁰⁰ Tworzenie się wiązania międzycieniowego jest wysoce selektywne do sekwencji i tworzy się wyłącznie w obecności komplementarnej nici DNA (Schemat 5.7). Wykorzystanie koniugatów QM-ssDNA jest rozwiązaniem o dużym potencjale. Umożliwia utworzenie wiązań krzyżowych pomiędzy komplementarnymi nićmi o dowolnej sekwencji ze względu na brak ograniczeń w tworzeniu się adduktu wewnętrznego w cząsteczce koniugatu QM-ssDNA. Jednak najbardziej efektywne są addukty wewnętrzne w których QM związane jest z guaniną.¹⁰⁴



Schemat 5.7 Mechanizm powstawania wiązania krzyżowego z nitką DNA komplementarną do sekwencji koniugatu QM-ss DNA.

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o zastosowaniu pPNA-QMP, zawierających w swojej budowie prekursor QM a także określoną sekwencję DNA oraz kwas peptydonukleinowy (PNA). Jest to pierwszy przykład biokompatybilnego koniugatu QM, który ma potencjał do wiązania się z docelowym fragmentem DNA *in vivo*.¹⁰⁵

W części literaturowej przedstawiono różnego typu mechanizmy oddziaływania cząsteczek z DNA. Opisano także właściwości i mechanizmy oddziaływania konkretnych związków stosowanych w chemioterapii antynowotworowej. Przedstawione przykłady stosowanych leków oddziałują z DNA poprzez mechanizm interkalacji (topotekan), tworzą wiązania kowalencyjne (mechloretamina, mitomycyna, cisplatyna) oraz powodują rozerwanie nici DNA w wyniku reakcji rodnikowych (bleomycyna). Pomimo tego że, związki te stosowane są jako leki przeciwnowotworowe, posiadają wiele wad. Wykazują toksyczność w stosunku do zdrowych komórek. Cisplatyna jest jednym z najbardziej toksycznych leków co ogranicza jej stosowanie *in vivo* w większym stężeniu. W wyniku reakcji z DNA powstaje wiele produktów. Tylko niektóre wiązania są specyficzne dla określonych sekwencji. Można więc przyjąć, że wiążą się niespecyficznie. Mogą także tworzyć wiązania z białkami (mechloretamina oraz cisplatyna) co zmniejsza ich efektywność. Natomiast topotekan, interkaluje w przerwie DNA wygenerowanej przez Top I. Oddziaływanie tego typu jest słabe (w porównaniu do siły wiązania kowalencyjnego z DNA) a mimo to wpływa na zmniejszenie cytotoxyczności w stosunku do związków alkilujących DNA. Ostatni rozdział części

literaturowej opisuje związki typu *o*-metylenochinonu, które stanowią grupę związków alkilujących jak i sieciujących DNA. Częsteczki zawierające motyw QM są bardzo reaktywne i mogą tworzyć wiązania kowalencyjne z DNA wykazując również selektywność działania. Możliwość regenerowania się produktu pośredniego QM pozwala na wydłużenie czasu życia aktywnej cząsteczki a produktem końcowym reakcji jest termodynamiczny addukt. Związki tego typu wydają się być obiecujące jako związki alkilujące DNA i potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie w terapii antynowotworowej.

WYNIKI I DYSKUSJA

6 Pochodne topotekanu

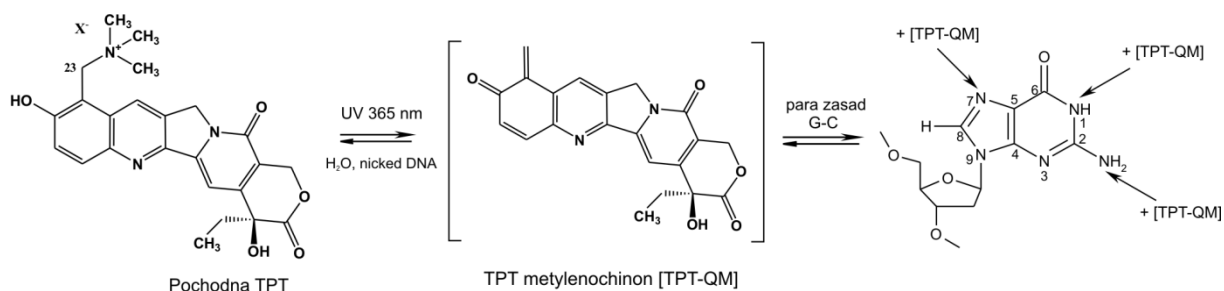
6.1 Otrzymywanie pochodnej [TPT-Me₃N]⁺X⁻

W części literaturowej opisano właściwości produktów przejściowych typu QM. Udowodniono, że związki tego typu mogą tworzyć wiązanie kowalencyjne z nukleofilowymi centrami DNA. W grupie prof. L. Kozerskiego, badając inhibitory topoizomerazy I z rodziny kamptotecyn przypuszczano, że pochodna topotekanu zawierająca dobrą grupę opuszczającą w pozycji 23-C (Schemat 6.1) mogłaby ulegać fotochemicznej aktywacji tworząc związek przejściowy typu QM. W tym celu podjęto próby otrzymania soli topotekanu zawierającej grupę N-trimetyloamoniową (Me₃N⁺). Związek ten, określany później akronimem [TPT-Me₃N]⁺ CF₃SO₃⁻ został otrzymany przez K. Hyz w reakcji wolnej zasady topotekanu z estrem metylowym kwasu trifluorometanosulfonowego. Pożądaną sól TPT otrzymano z wydajnością rzędu 50 %. Jednak mieszanina poreakcyjna zawierała także produkty dimetylowania atomów N-23 i O-10 ([O-10Me, TPT-Me₃N⁺ CF₃SO₃⁻]), nieprzereagowany substrat w postaci soli triflanu TPT oraz alkohol ([23-CH₂OH TPT]) W celu otrzymania czystego związku [TPT-Me₃N]⁺X⁻ spełniającego wymagania badań biologicznych, podjęłam próbę oczyszczenia mieszaniny reakcyjnej. Wszystkie reakcje syntezy pochodnej TPT, oczyszczania, przygotowania do badań biologicznych związku wykonano w ramach niniejszej pracy. W celu uzyskania lepszych warunków rozdzielania mieszaniny reakcyjnej zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz (RP) jako fazy ruchomej użyto układów: 10 % CH₃CN/ 90 % wodnego 0,1 % HCOOH przez 15 min a następnie układ: 20 % CH₃CN/ 80 % wodnego 0,1 % HCOOH. Próby otrzymania czystej pochodnej N-trimetyloamoniowej nie powiodły się. Otrzymano jedynie mieszaninę soli kwasu mrówkowego pożądanego produktu oraz topotekanu w stosunku odpowiednio, 1:3.

6.2 Oddziaływanie pochodnej TPT z oligomerem DNA

Wcześniejsze badania wykazały, że macierzysty chlorowodorek topotekanu pod wpływem naświetlania światłem UV o długości fali λ=365 nm w roztworze buforu o pH=6 ulega fotochemicznej transformacji do alkoholu ([23-CH₂OH TPT]) z niską wydajnością (10%). Natomiast reakcja TPT x HCl prowadzona w tych samych warunkach w obecności oligomeru d(GCGATCGC)₂ nie prowadzi do powstania produktów alkilowania DNA.

Pochodna TPT zawierająca w pozycji 23-C grupę trimetyloamoniową pod wpływem fotochemicznej reakcji do produktu pośredniego QM, mogłaby stanowić źródło silnego centrum elektrofilowego zdolnego do alkilowania nukleofilowych zasad azotowych w kwasach nukleinowych (Schemat 6.1). Wiedząc, że topotekan interkaluje w przerwę DNA generowaną przez Top I, aktywowana fotochemicznie pochodna TPT, tworząc wiązanie kowalencyjne z DNA, prowadziłaby do utworzenia trwałego adduktu DNA-Top I-[TPT-QM].



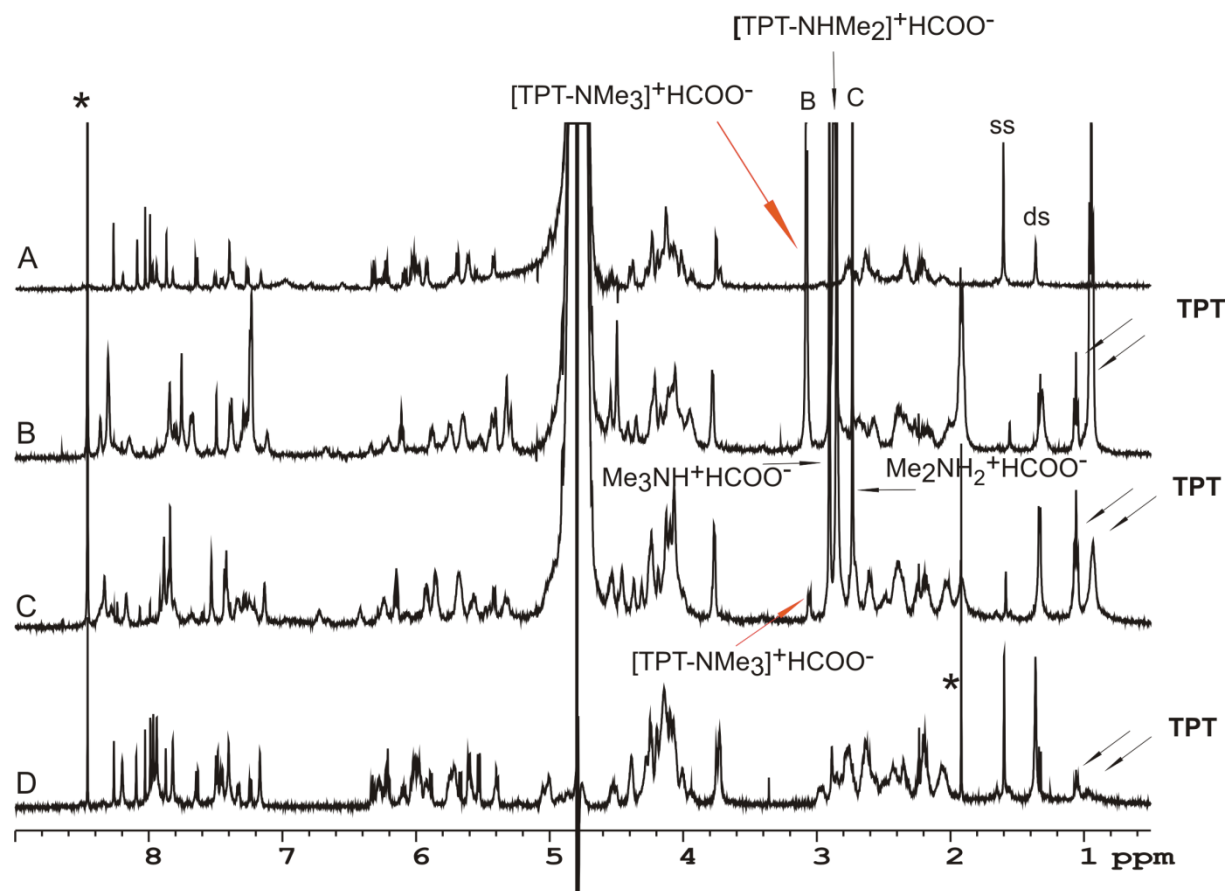
Schemat 6.1 Proponowany mechanizm alkilowania przerwanego DNA uwzględniający powstawanie QM. X⁻ oznacza HCOO⁻, CF₃SO₃⁻. Strzałki oznaczają możliwe miejsca alkilowania w guaninie.

Badanie oddziaływania [TPT-Me₃N]⁺ X⁻ prowadzono z oligomerem o sekwencji d(GCGATCGC)₂, którego terminalna para GC odpowiada połowie przerwy w przerwanym dekamerze (nicked DNA)^{5, 30}. Wiadomo, że TPT oddziałując z oktamerem interkaluje tylko do terminalnej pary GC, dlatego też przypuszczano, iż pochodna TPT w wyniku fotochemicznej aktywacji zwiąże się kowalencyjnie tylko z centrami nukleofilowymi pary GC na końcach badanej sekwencji DNA.

Wstępne badania oddziaływania pochodnej TPT z oktamerem DNA zostały wykonane przez K. Hyz. Eksperyment prowadzono stosując mieszaninę reakcyjną (przed oczyszczeniem na HPLC) zawierającą 4 związki, ponieważ jedynie struktura związku [TPT-Me₃N]⁺ CF₃SO₃⁻ umożliwia powstanie produktu przejściowego typu QM w wyniku fotochemicznej aktywacji. Próbkę w obecności dupleksu d(GCGATCGC)₂ w roztworze wodnym o pH=6 naświetlano przez 20 godz. lampą UV przy długości fali λ=365 nm. Mieszaninę reakcyjną oczyszczono od nadmiaru niezwiązanej pochodnej TPT. Obecność produktów alkilowania została potwierdzona przy pomocy eksperymentu PFGSE (Załącznik 1) oraz techniki MALDI-TOF.⁶

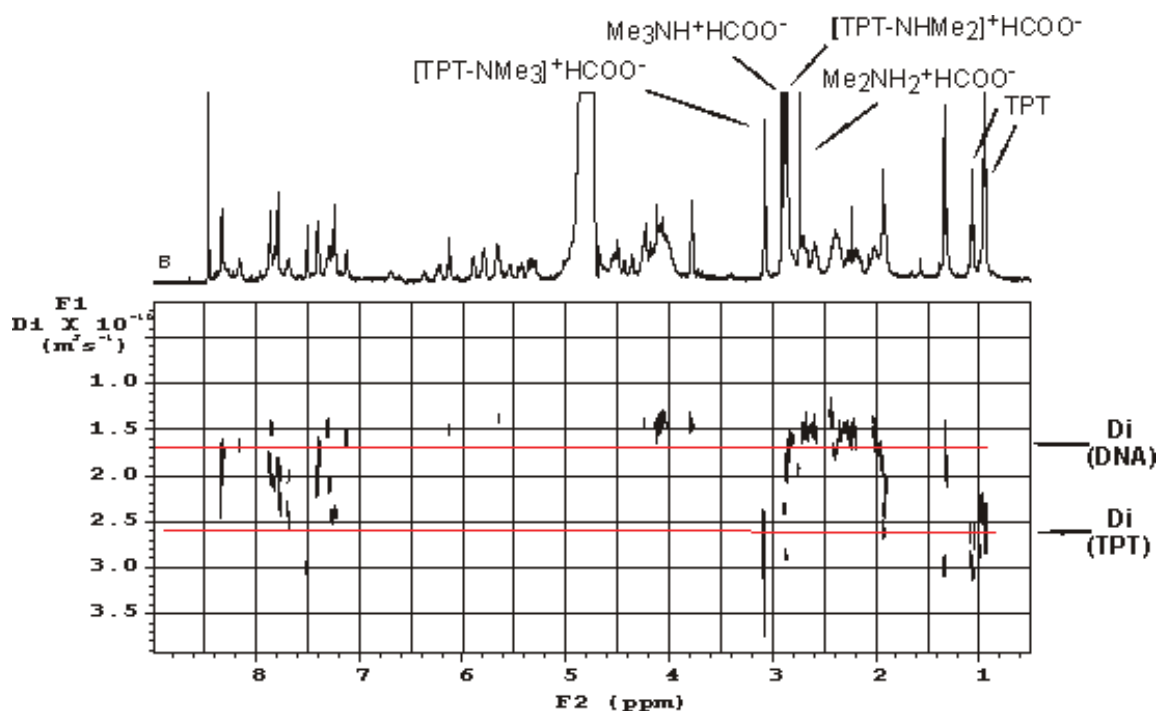
Ze względu na protonowanie atomów azotu zasad DNA w pH=6 postanowiłam wykonać podobny eksperyment w pH=7, stosując mieszaninę tylko 2 związków, TPT oraz TPT-Me₃N⁺ w postaci soli kwasu mrówkowego (mieszanina otrzymana przeze mnie po rozdziale HPLC). Przypuszczałam, że przy wyższym pH zasady azotowe w dupleksie DNA

będą bardziej podatne na atak QM. Przebieg reakcji monitorowano przy użyciu widm ^1H NMR (Rysunek 6.1).



Rysunek 6.1 Monitorowanie ^1H NMR reakcji $[\text{TPT-NMe}_3]^+\text{HCOO}^-$ (1.0 mM) z oligomerem $\text{d}(\text{GCGATCGC})_2$ (0.33 mM ds.) w roztworze buforu (25mM NaCl/ 25mM K_3PO_4 , $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 90/10 v%) o pH=7: A-widmo czystego DNA, sygnały oznaczone B i C należą odpowiednio do widm B i C, ss oznacza pojedynczą nić, ds. oznacza podwójną nić DNA, sygnał $[\text{TPT-NHMe}_2]^+\text{HCOO}^-$ należy do widma B i C; B- widmo DNA w obecności pochodnej $[\text{TPT-NMe}_3]^+\text{HCOO}^-$, widoczne są dwie formy tautomeryczne, lakton (0.96 ppm) oraz karboksylan (1.05 ppm); C-widmo B po 1 godz. naświetlania UV o długości $\lambda=365$ nm; D- widmo C po oczyszczeniu mieszaniny z nadmiaru niezwiązanej pochodnej TPT. Obecność adduktu potwierdzono ESI MS; *-oznaczono zanieczyszczenia.

Niskie stężenie dupleksu $\text{d}(\text{GCGATCGC})_2$ oraz pH=7 powodują, że na widmie A na Rysunku 6.1 widoczne są sygnały należące do pojedynczej (ss) i podwójnej (ds) nici DNA. Wyższe pH eksperymentu skutkuje pojawieniem się formy laktonowej i karboksylowej pochodnej TPT. We wcześniejszym eksperymencie prowadzonym w pH=6 obserwowano jedynie formę laktonową. Dodanie pochodnej $[\text{NMe}_3\text{TPT}]^+\text{HCOO}^-$ powoduje zmiany przesunięć chemicznych protonów DNA, które są szczególnie widoczne porównując zakres 5.0-8.5 ppm na widmach A i B. Zmiany te wynikają z oddziaływań niekwalencyjnych TPT oraz pochodnej TPT z DNA, będących w szybkiej wymianie pomiędzy formą związaną a wolną co potwierdzono eksperymentem DOSY (Rysunek 6.2).



Rysunek 6.2 Widmo DOSY wykonane na próbce z widma B z rysunku 6.1, roztwór buforu (25mM NaCl/25mM K₃PO₄, H₂O/D₂O 90/10 v%) o pH=7. Czerwone linie oznaczają współczynniki dyfuzji (Di) niezwiązanego kowalencyjnie DNA ($1.7 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) oraz wolnej pochodnej TPT i TPT w szybkiej wymianie z DNA, Di równe $2.6 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

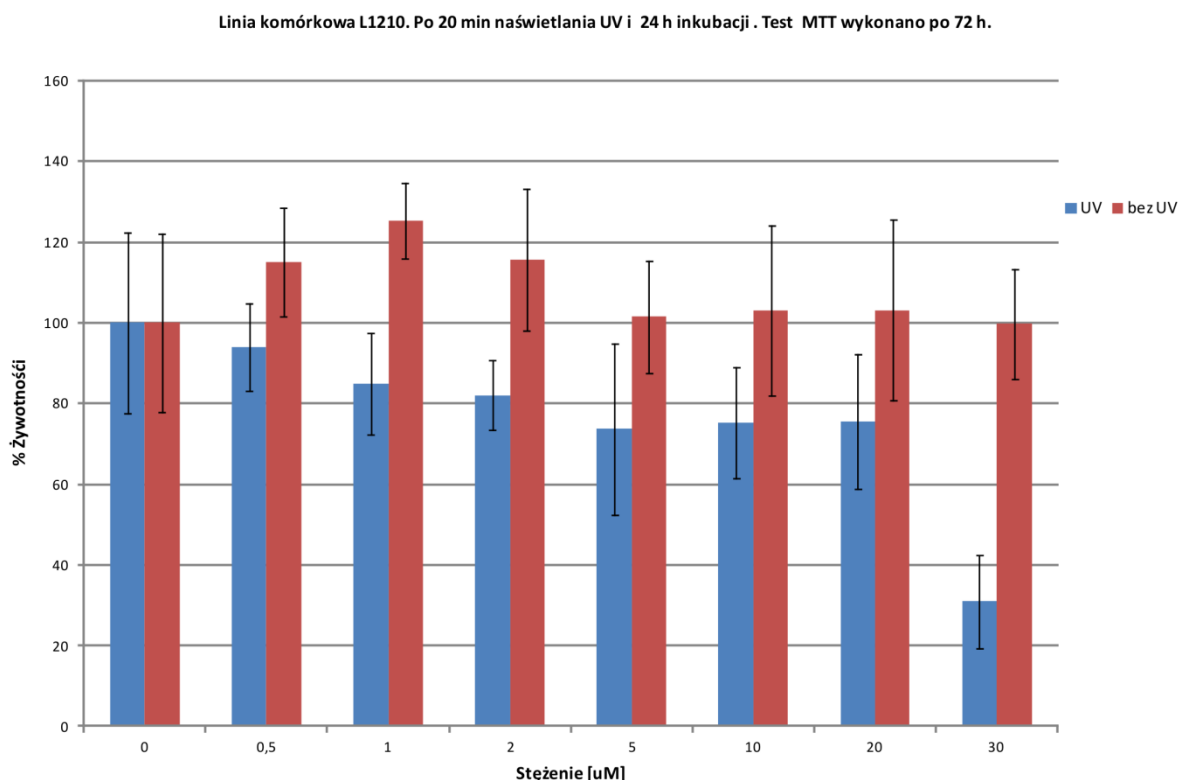
Po godzinie naświetlania UV o długości fali $\lambda=365 \text{ nm}$ na widmie C (Rysunek 6.1) zaobserwowano prawie całkowity zanik sygnału grupy trimetyloaminowej związanej z pochodną TPT oraz pojawienie się sygnału należącego do wolnego mrówczanu trimetyloaminy. Świadczy to o przereagowaniu pochodnej TPT. Na widmie D (Rysunku 6.1) widoczne są sygnały grup metylowych od związanego fragmentu TPT. Obecność adduktu została potwierdzona technikami ESI MS oraz MALDI-TOF. Zaobserwowano jedynie produkt alkilowania pojedynczej nici DNA.

Oba eksperymenty dowodzą, że pochodna TPT pod wpływem fotochemicznej aktywacji tworzy wiązanie kowalencyjne z dupleksem lub pojedynczą nicią badanego oktameru. Stwierdzono także, że sól kwasu mrówkowego pochodnej TPT jest bardziej reaktywna w porównaniu do soli kwasu trifluorometanosulfonowego, wymaga jedynie godziny naświetlania UV a nie 20 godz. jak w przypadku $[\text{TPT-Me}_3\text{N}]^+ \text{CF}_3\text{SO}_3^-$. Poszerzenie sygnałów grupy metylowej na projekcji ^1H NMR na widmie DOSY (Załącznik 1) a także w widmie D (Rysunek 6.1) wynika z braku regioselektywności alkilowania co skutkuje nakładaniem się wielu sygnałów rezonansowych, bądź też występowaniem reakcji odwracalnych pomiędzy poszczególnymi atomami azotu w azotowych zasadach

aromatycznych co dokumentuje Rokita.^{85, 100} W przypadku eksperymentu prowadzonego w pH=7 możemy się spodziewać zarówno produktów alkirowania terminalnych par zasad dupleksu DNA jak i dowolnego nukleofilowego atomu azotu dla występującej formy ss DNA.

6.3 Badania biologiczne dla pochodnej TPT

Badania biologiczne prowadzone na komórkach białaczki mysiej (L1210), pokazujące wpływ aktywności biologicznej pochodnej TPT w warunkach przed i po naświetlaniu światłem UV przy długości fali 356 nm są przedstawione na Rysunku 6.3. Otrzymane wyniki dowodzą, że pochodna wykazuje znacznie lepszą aktywność biologiczną po naświetlaniu UV. Prawdopodobnie spowodowane jest to możliwością alkirowania DNA przez produkt pośredni typu TPT-QM. Do badań użyto mieszaniny soli $[TPT-Me_3N]^+ HCOO^-$ oraz $[TPT-Me_2N]^+ HCOO^-$. Sól $[TPT-Me_2N]^+ HCOO^-$ nie wykazuje aktywności biologicznej pod wpływem naświetlania UV wobec czego nie wpływa na wartość aktywności biologicznej, natomiast ilość substancji czynnej została skorygowana na podstawie jej procentowej zawartości w mieszaninie.



Rysunek 6.3 Porównanie aktywności biologicznej pochodnej TPT w warunkach przed i po naświetlaniu światłem UV.

7 Pochodne SN38

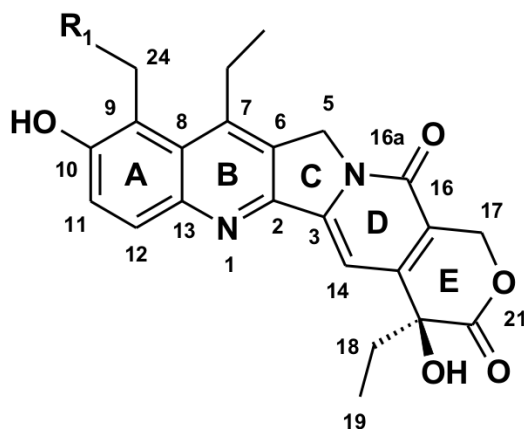
7.1 Otrzymywanie pochodnych SN38

Pochodna kamptotecyny, SN38 zawierająca w pozycji 7-C grupę etylową wykazuje znacznie większą aktywność biologiczną *in vitro* niż irinotekan a także topotekan.¹⁰⁶ Ze względu na niską rozpuszczalność w wodzie nie może być stosowana jako lek. W ramach tej pracy podjęto próbę syntezy szeregu pochodnych SN38, które charakteryzowałyby się dobrą rozpuszczalnością w wodzie. Wprowadzenie podstawnika aminometylowego w pozycji 9-C pierścienia A (Tabela 7.1) zwiększyłoby znacznie rozpuszczalność związków. Ponadto, związki tego typu mogłyby tworzyć produkty pośrednie typu o-metylenochinonu poprzez eliminację podstawnika w pozycji 24-C lub też reagować według mechanizmu substytucji nukleofilowej.

W celu otrzymania pochodnych SN38 wykonano szereg reakcji Mannicha z użyciem różnych rozpuszczalników, nadmiaru reagentów oraz dodatku kwasu octowego jako katalizatora. Reakcję prowadzono także w szerokim zakresie temperatur. W celu opracowania warunków reakcji w pierwszej kolejności postanowiłam otrzymać pochodną SN-NMe₂. Pożądanego produktu reakcji nie udało się jednak otrzymać stosując rozpuszczalniki takie jak: metanol, etanol, DMSO oraz dioksan. Związek otrzymano jedynie w reakcji Mannicha prowadzonej w temperaturze wrzenia acetonitrylu z dodatkiem katalizatora. Reakcja Mannicha prowadzona z użyciem nadmiaru stężonego kwasu octowego, formaldehydu oraz dimetyloaminy także zakończyła się niepowodzeniem. Pochodnej SN-NMe₂ nie otrzymano także w reakcji SN38 prowadzonej według przepisów patentowych z użyciem dichlorometanu (a także w dibromometanu), bezwodnego węgla potasu i roztworu dimetyloaminy.¹⁰⁷

Wykorzystując opracowane warunki reakcji Mannicha otrzymano szereg pochodnych SN38, przedstawione są w Tabeli 7.1. W reakcjach użyto 37 % roztworu formaldehydu, dodając odpowiednich amin oraz kwasu octowego jako katalizatora. Pochodne BN49A oraz BN67A uzyskano w reakcji bez dodatku katalizatora. Dodatek katalizatora prowadził do braku pożądanego produktu reakcji. Wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową otrzymano czyste pochodne SN38 w postaci soli kwasu mrówkowego. Ze względu na szybki rozkład tych soli, przekształcono je w chlorowodorki. Pochodne SN38 w formie soli chlorowodorków otrzymano z wydajnością rzędu 18-30 %. W trakcie reakcji otrzymano także alkohol SN38-CH₂OH (związek ten scharakteryzowano, struktury nie pokazano ze względu

na planowane umieszczenie pochodnej w zgłoszeniu patentowym). Otrzymane nowe pochodne SN38 (wykluczając związek SN-NMe₂) ujęto w zgłoszeniu patentowym.¹⁰⁸



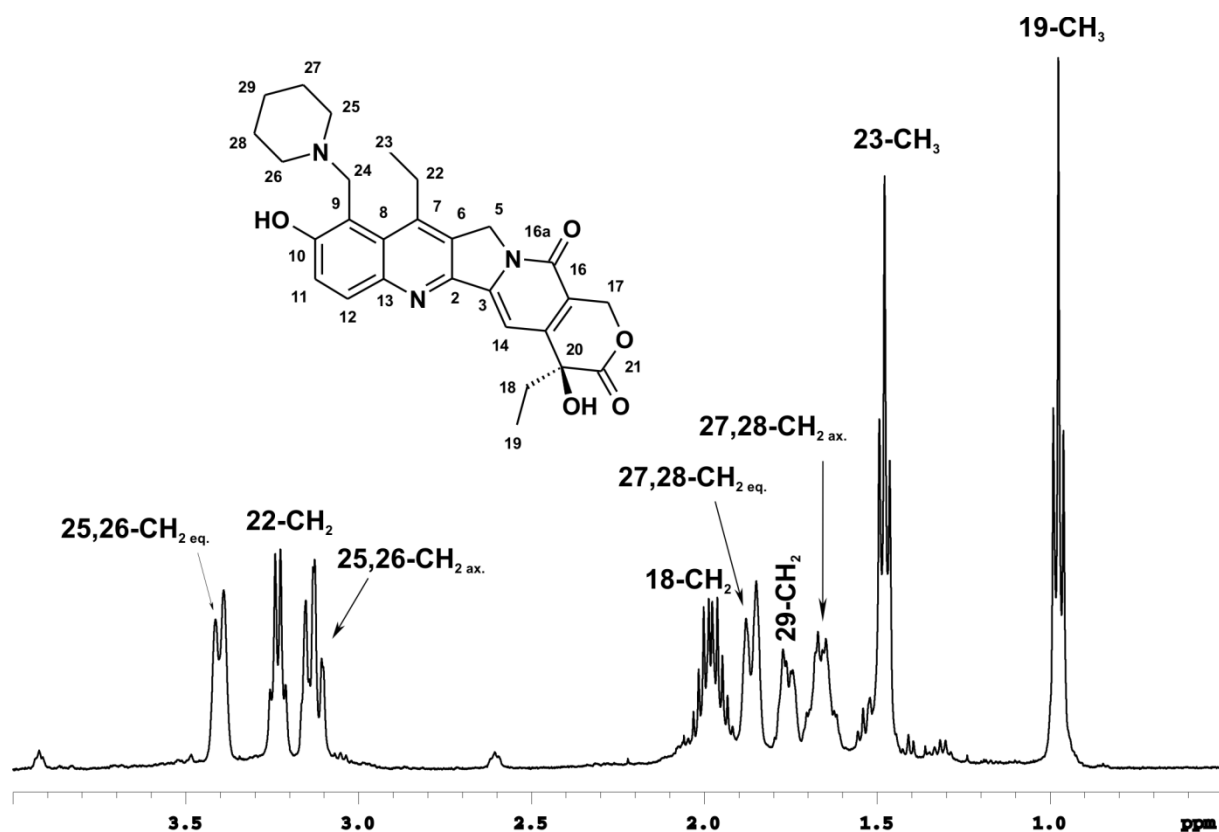
Akronim związku	R ₁	Wydajność
SN-NMe ₂		28 %
BN67A		18 %
BN49A		24 %
BN71A		30 %
BN37A		24 %
BN74A		24 %

Tabela 7.1 Pochodne SN38. Związki otrzymano w postaci soli chlorowodorków.

7.2 Stabilność pochodnych SN38 w H₂O, DMSO i MeOH

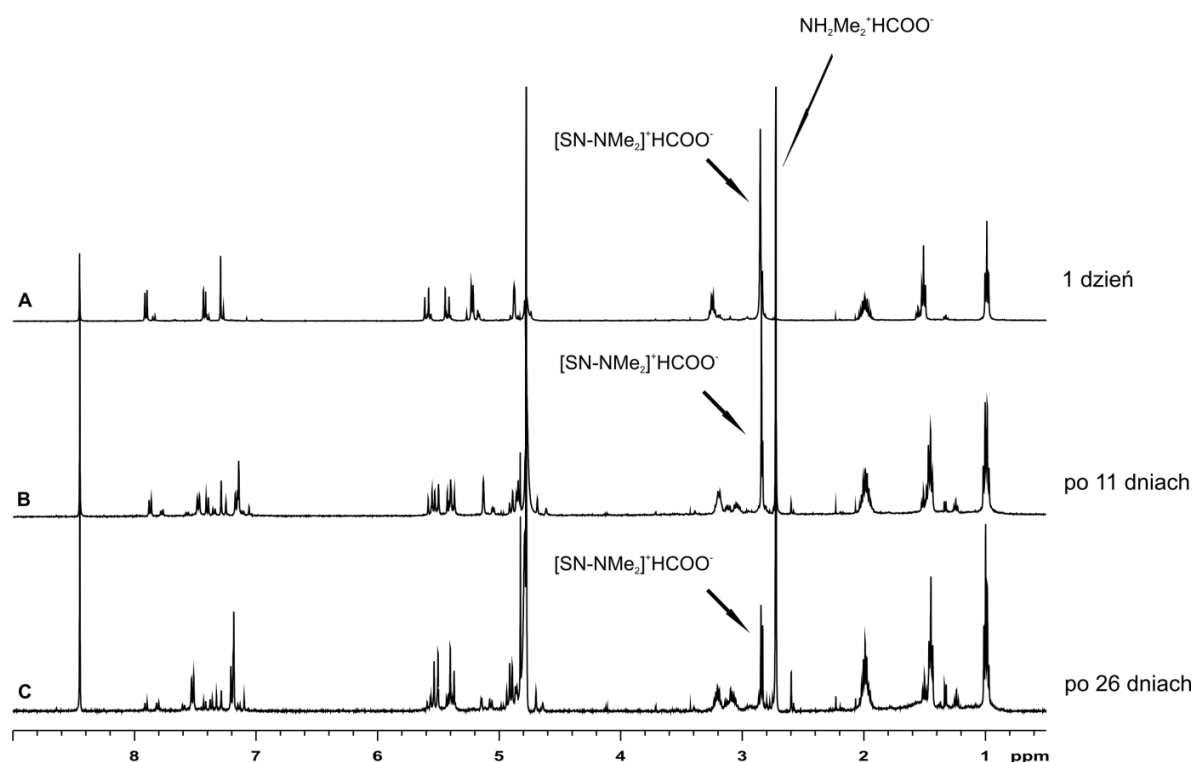
Farmakokinetyka jest dziedziną farmakologii opisującą stężenie leku oraz jego metabolitów w ustroju w funkcji czasu, po jego podaniu. Na pełny opis farmakokinetyczny składa się wiele parametrów uwzględniających procesy fizykochemiczne i fizjologiczne. Ważne jest więc wykonanie wstępnych badań fizykochemicznych otrzymanych potencjalnie biologicznie czynnych związków w celu określenia stabilności, czasu półtrwania a także zbadania procesów zachodzących w różnych rozpuszczalnikach i warunkach zbliżonych do fizjologicznych.

W celu zbadania stabilności i procesów zachodzących w różnych warunkach konieczna jest znajomość wartości δ pochodnych SN38 w stosowanych rozpuszczalnikach. Dlatego też dokonano przypisań ¹H i ¹³C badanych związków, które zamieszczono w Załącznikach 2-6. Ze względu na szybki proces eliminacji podstawnika aminowego w związku BN74A nie było możliwe scharakteryzowanie tej pochodnej w roztworze metanolu. Interpretując kształt widm NMR nowych pochodnych (załączniki 2-6) należy wziąć pod uwagę procesy fizyczne jakim mogą podlegać pierścienie cyklicznych amin, a więc inwersji pierścienia i/lub na atomie azotu, zależnej od pH roztworu i wielkości pierścienia, oraz zahamowanej rotacji wokół wiązania 24-C-N, w związku z silną zawadą przestrzenną w tej części cząsteczki. Obecność centrum stereogenicznego 20-C może być również przyczyną zmian w kształcie widma. W rezultacie, na widmie ¹H NMR można obserwować nierównocенność geminalnych protonów grupy CH₂ i/lub poszerzenie sygnałów związane z zahamowaną inwersją lub rotacją. Na Rysunku 7.1 podany jest przykład obserwowania w widmie związku BN71A nierównocенności protonów geminalnych aksjalnych i ekwatorialnych w grupach CH₂ przy atomie azotu oraz w położeniu β do atomu azotu. Nie zaobserwowano podobnego zjawiska dla pochodnej BN74A.



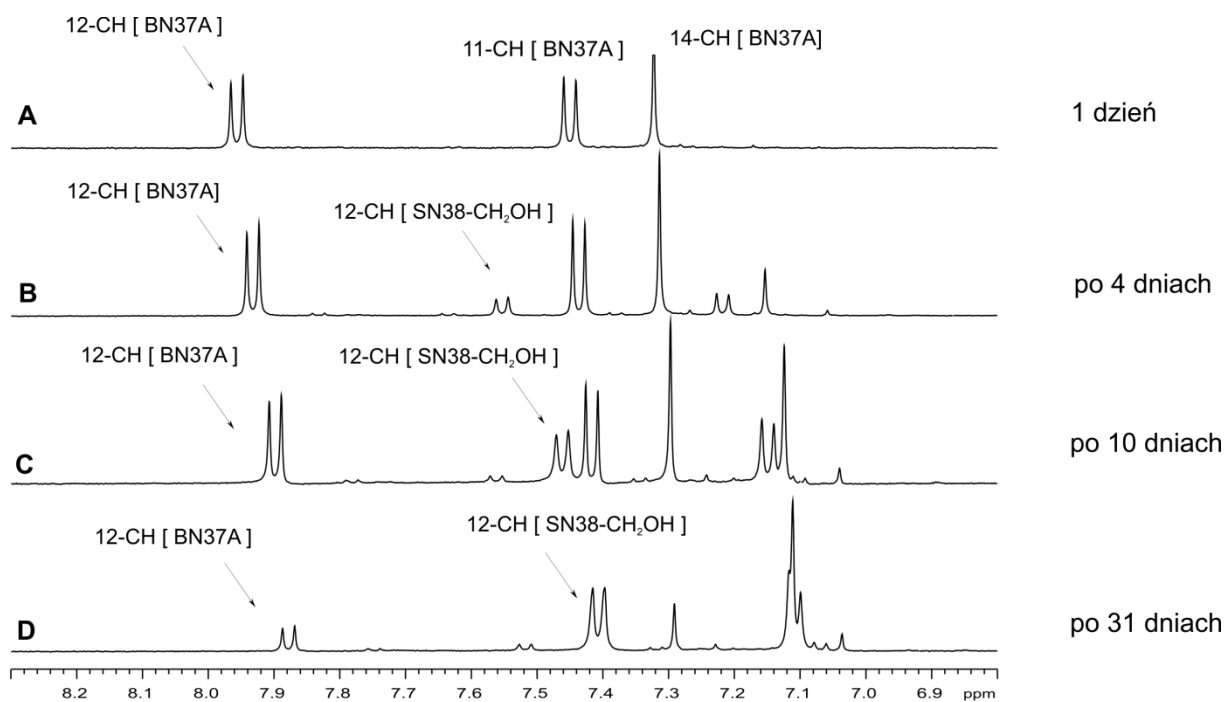
Rysunek 7.1 Fragment widma ^1H NMR chlorowodoru pochodnej BN71A w D_2O , $\text{pH}=4$ przedstawiający nierównocенność protonów geminalnych wewnątrz grup $-\text{CH}_2$ w pierścieniu piperydyny, w położeniach α i β do atomu azotu.

Badając stabilność związków w wodzie zaobserwowano, że pochodna SN-NMe_2 w postaci soli kwasu mrówkowego ulega reakcji hydrolizy w roztworze D_2O o $\text{pH}=5$ w temperaturze pokojowej (Rysunek 7.2) Na widmach B i C widoczny jest zanik sygnału pochodzącego od grupy $\text{SN-NHMe}_2^+\text{HCOO}^-$ oraz wzrost intensywności sygnału pochodzącego od wolnej aminy $\text{NH}_2\text{Me}_2^+\text{HCOO}^-$. Po 26 dniach mrówczan pochodnej SN-NMe_2 ulega prawie całkowitej przemianie do produktu hydrolizy $\text{SN38-CH}_2\text{OH}$ oraz SN38 (masy produktów potwierdzono techniką ESI-MS). Na widmie A widoczne jest niewielkie zanieczyszczenie, które ze względu na niską intensywność sygnałów nie zostało zidentyfikowane.



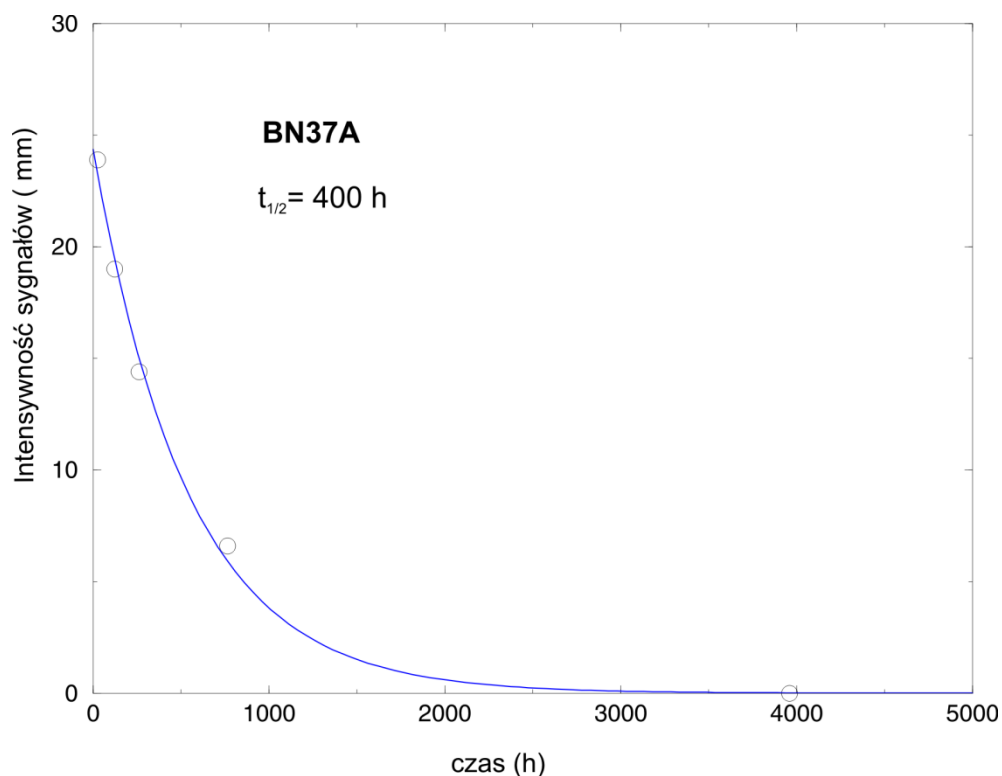
Rysunek 7.2 Monitorowanie stabilności pochodnej $[\text{SN-NMe}_2]^+\text{HCOO}^-$ w D_2O o $\text{pH}=5$ przy pomocy ^1H NMR. Sygnał od wolnej dimetyloaminy na widmie B i C nakłada się na widmo A.

Chlorowodorek pochodnej BN37A ulega temu samemu procesowi co mrówczan pochodnej SN-NMe₂. Eksperyment prowadzono w roztworze D₂O w pH=3 (pH próbki otrzymane po rozpuszczeniu pochodnej w wodzie). Na Rysunku 7.3 przedstawiono zakres aromatyczny widm ^1H NMR monitorujących zachodzące procesy. Na widmie A widoczne są sygnały protonów 14-CH, 11-CH oraz 12-CH należące do badanego związku, po 4 dniach pojawia się dodatkowy zestaw sygnałów, który został zidentyfikowany jako produkt hydrolizy SN38-CH₂OH. Po 31 dniach na widmie D widoczny jest głównie sygnał protonu 12-CH należący do SN38-CH₂OH, niewielki sygnał od protonu 12-CH pochodnej BN37A oraz dodatkowy zestaw sygnałów zidentyfikowany jako SN38 (ESI-MS $m/z=393$). Wartości przesunięć chemicznych protonów należących do pochodnych kamptotecyn są wrażliwe na zmiany pH dlatego też, niewielka zmiana pH wynikająca z eliminacji cząsteczki morfoliny związanej z pochodną BN37A powoduje zmianę przesunięć chemicznych protonów w stronę niższych częstości.



Rysunek 7.3 Zakres aromatyczny widm ^1H NMR monitorujących stabilność chlorowodorku BN37A w D_2O o $\text{pH}=3$.

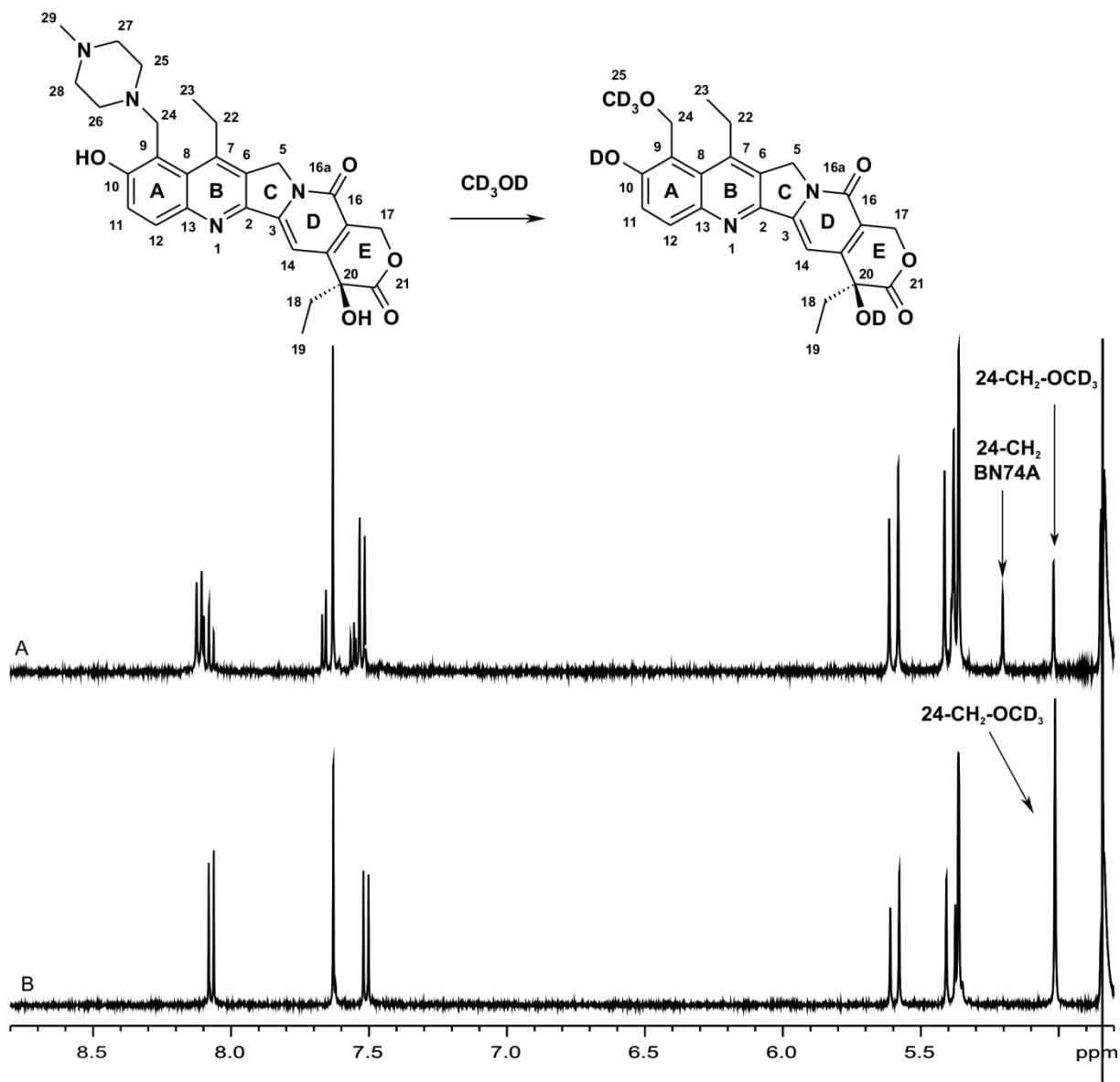
Wykres 7.1 przedstawia zanik intensywności sygnałów protonów morfoliny chlorowodorku BN37A w czasie. Z równania krzywej wyznaczono okres półtrwania pochodnej, wynoszący 400 h. Pochodne BN49A, BN67A oraz BN71A wykazują stabilność w roztworach wodnych o pH równym 3-5. Chlorowodorek pochodnej BN74A w roztworze wodnym ulega całkowitej hydrolizie bezpośrednio po rozpuszczeniu. Przypisania sygnałów protonowych i węglowych dla pochodnej BN74A (Załącznik 6) w wodzie wyznaczono dla soli kwasu mrówkowego, która wykazuje nieco większą stabilność w wodzie, umożliwiającą wykonanie pomiarów NMR.



Wykres 7.1 Zanim intensywności sygnałów morfolino w związku BN37A w czasie, obserwowany w D_2O o pH 3.

Ze względu na obserwowany rozpad topotekanu w homogenatach tkanek serca (przechowywane w metanolu w temperaturze pokojowej),¹⁰⁹ a także doniesienia literaturowe potwierdzające niestabilność TPT w metanolu,³¹ zbadano stabilność nowych pochodnych SN38 w tym rozpuszczalniku. Zaobserwowano proces eliminacji podstawnika w pozycji 24-C dla pochodnej BN74A prowadzący do powstania eteru 24- CH_2-OCD_3 (Rysunek 7.4), identycznemu procesowi w metanolu ulega cząsteczka topotekanu.

Obecność produktu reakcji z CD_3OD widoczna jest bezpośrednio po rozpuszczeniu związku w metanolu. Na widmie A (Rysunek 7.4) widoczny jest sygnał 24- CH_2-OCD_3 przy wartości δ 5.01 ppm pochodzący od eteru, stanowiący ponad 50 %. Chlorowodorek BN74A ulega całkowitej przemianie po 3 dniach o czym świadczy brak sygnału 24- CH_2 na widmie B przy 5.20 ppm należącego do badanego związku. Produkt reakcji został potwierdzony w widmie ESI-MS ($[M+H]^+=440$). Na podstawie widma protonowego oraz widm HSQC i HMBC dokonano przypisań sygnałów protonowych i atomów węgla (Tabela 7.2),



Rysunek 7.4 Proces eliminacji podstawnika aminowego w pozycji 24-C chlorowodoru BN74A w CD₃OD prowadzący do powstania eteru 24-CH₂-OCD₃. A-fragment widma ¹H NMR po rozpuszczeniu związku w CD₃OD; B-fragment widma ¹H NMR po 3 dniach.

Dowodem potwierdzającym powstawanie eteru pochodnej SN38 jest duża wartość $\delta^{13}\text{C}$ atomu 24-CH₂-OCD₃, wynosząca 64.6 ppm. Zaobserwowano także sygnał należący do grupy -OCD₃ przy 55.9 ppm.

Numer atomu	δ ¹ H	δ ¹³ C
2-C	-	147.8
3-C	-	146.3
5-CH ₂	5.36 s	50.2
6-C	-	130.8
7-C	-	146.7
8-C	-	128.9
9-C	-	116.0
10-C	-	157.1
11-CH	7.51, d, J=9.2 Hz	122.0
12-CH	8.07, d, J=9.2 Hz	131.4
13-C	-	145.2
14-CH	7.63, s	98.1
15-C	-	151.4
16-C	-	118.7
16a-C(O)	-	no
17-CH ₂	5.40,5.60, układ AB, J=16.1 Hz	65.4
18-CH ₂	1.97, m	30.8
19-CH ₃	1.01, t, J=7.4 Hz	7.0
C-20	-	73.0
21-C(O)	-	173.6
22-CH ₂	3.42, q, J=7.6 Hz	24.8
23-CH ₃	1.43, t, J=7.6 Hz	14.2
24-CH ₂ (O)	5.02, s	64.6
25-CD ₃ (O)	-	55.9

Tabela 7.2 Przesunięcia chemiczne ¹H i ¹³C (ppm) eteru 24-CH₂-OCD₃ w metanolu-d₄.

Wszystkie badane związki wykazują stabilność w DMSO w temperaturze pokojowej. Dopiero po okresie ponad 6 miesięcy ulegają rozkładowi do alkoholu i SN38. Otrzymane wyniki są korzystne ze względu na badania biologiczne *in vitro* podczas których pochodne SN38 podawane były jako roztwory w DMSO.

7.3 Oddziaływanie pochodnych SN38 z oligomerem DNA

Do wstępnych badań mechanizmu oddziaływania pochodnych SN38 z oligomerem DNA wybrano oktamer o sekwencji d(GCGATCGC)₂. Wybór tej sekwencji wydawał się uzasadniony, ze względu na wcześniejsze badania oddziaływania TPT z tym oktamerem.³⁰ Pierwszym etapem zbadania oddziaływania związków z DNA było przypisanie przesunięć chemicznych protonów w duplesie DNA w warunkach analogicznych do warunków prowadzenia eksperymentów. Na podstawie widm NOESY, TOCSY oraz HSQC dokonano przypisań sygnałów DNA w temperaturze pokojowej (Tabela 7.3) oraz w 10 °C (Tabela 7.4). W celu przypisania sygnałów NH i NH₂ roztwory DNA przygotowano w roztworze H₂O buforu 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ o pH=6 zawierającego 10 v/v % D₂O.

zasada	NH	NH ₂	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	na	7.98	–	5.99	2.61	2.79	4.86	4.25	3.73
C2	–	6.52/8.45	7.40	5.40	5.68	2.05	2.42	na	na	na
G3	12.77	na	7.93	–	5.69	2.75	2.86	5.05	4.39	na
A4	–	na	8.21	7.80	6.28	2.64	2.99	5.03	4.5	4.28
T5	13.56	–	7.16	1.36	5.93	2.07	2.49	na	4.21	4.17
C6	–	6.80/8.48	7.45	5.61	5.76	2.05	2.43	4.87	4.15	4.07
G7	13.06	na	7.93	–	5.97	2.63	2.74	5	4.37	4.08
C8	–	6.74	7.46	5.52	6.20	2.20	2.20	4.51	4.07	na

Tabela 7.3 Przesunięcia chemiczne ¹H (ppm) oktameru d(GCGATCGC)₂ w temp. pokojowej (25 °C), pH=6 w buforze 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄, 10 % D₂O; na -nie przypisano (not assigned).

zasada	NH	NH ₂	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	na	7.99	–	5.99	2.63	2.79	4.87	4.25	3.72
C2	–	6.59/8.51	7.41	5.39	5.65	2.09	2.43	4.90	4.19	4.14
G3	12.80	na	7.95	–	5.71	2.77	2.86	5.06	4.40	4.07
A4	–	na	8.24	7.79	6.28	2.66	2.99	5.04	4.52	4.28
T5	13.64	-	7.18	1.35	5.94	2.07	2.49	na	4.21	4.18
C6	–	6.89/8.48	7.46	5.60	5.77	2.06	2.44	4.88	4.18	na
G7	13.09	na	7.95	–	5.95	2.64	2.75	5.00	4.38	4.08
C8	–	6.81	7.47	5.49	6.20	2.19	2.19	4.52	4.07	na

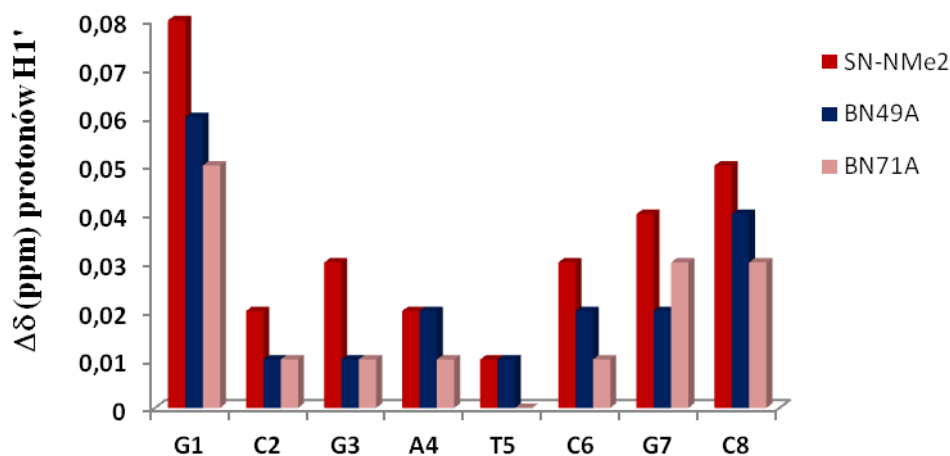
Tabela 7.4 Przesunięcia chemiczne ¹H (ppm) oktameru d(GCGATCGC)₂ w 10 °C, pH=6 w buforze 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄, 10 % D₂O; na -nie przypisano (not assigned).

7.3.1 Kompleksy pochodnych SN38 z d(GCGATCGC)₂

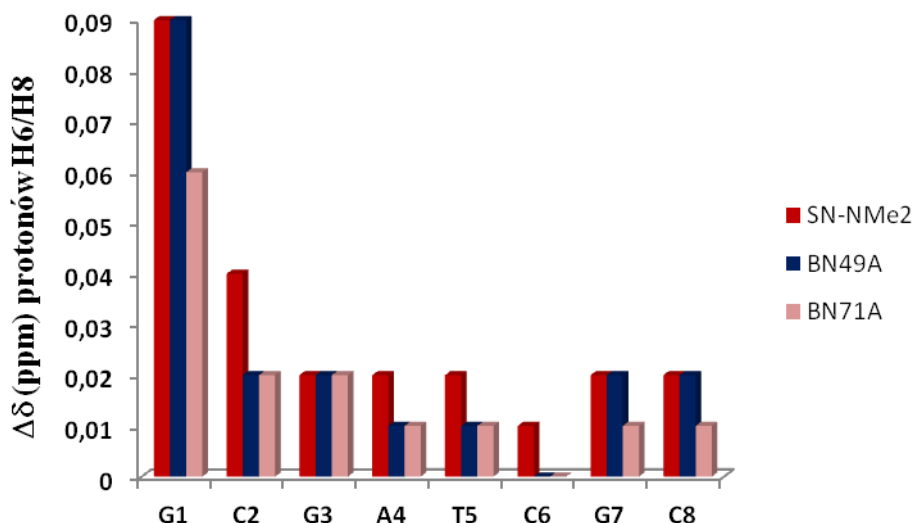
Wiedząc, że topotekan interkaluje do terminalnej pary GC odpowiadającej motywowi GC w przerwie w rozciętym DNA, postanowiono zbadać czy pochodne SN38 oddziałują w podobny sposób. W tym celu wykonano serie eksperymentów NOESY i TOCSY w temperaturze pokojowej oraz w 10 °C, używając dwukrotnego nadmiaru ligandów w stosunku do oktameru DNA.

7.3.1.1 Kompleksy w temperaturze pokojowej

Wykonano widma NOESY dla pochodnych SN-NMe₂, BN49A oraz BN71A dla których zaobserwowano zmiany przesunięć chemicznych sygnałów należących do DNA w kierunku niższych częstości co świadczy o oddziaływaniu pochodnych z DNA. Nie zaobserwowano sygnałów korelacyjnych międzycząsteczkowych pomiędzy protonami pochodnych i DNA. Oddziaływanie ligandów powoduje poszerzenie sygnałów protonowych zarówno należących do ligandu jak i do DNA, co może to być spowodowane pośrednią szybkością wymiany pomiędzy formą związanego i wolnego DNA. Ponadto, uniemożliwia to zaobserwowanie sygnałów korelacyjnych oddziaływań międzycząsteczkowych. Tabele przesunięć chemicznych protonów DNA oraz różnice przesunięć chemicznych $\Delta\delta$ przedstawiono w załącznikach: dla pochodnej SN-NMe₂ załączniki 7-8, BN49A załączniki 10-11, BN71A załączniki 16-17.



Wykres 7.2 Porównanie zmian przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta(\text{oktamer}) - \delta(\text{oktamer/pochodne SN38})$ protonów H1' oktameru d(GCGATCGC)₂ w obecności pochodnych SN-NMe₂, BN49A oraz BN71A w temperaturze pokojowej.

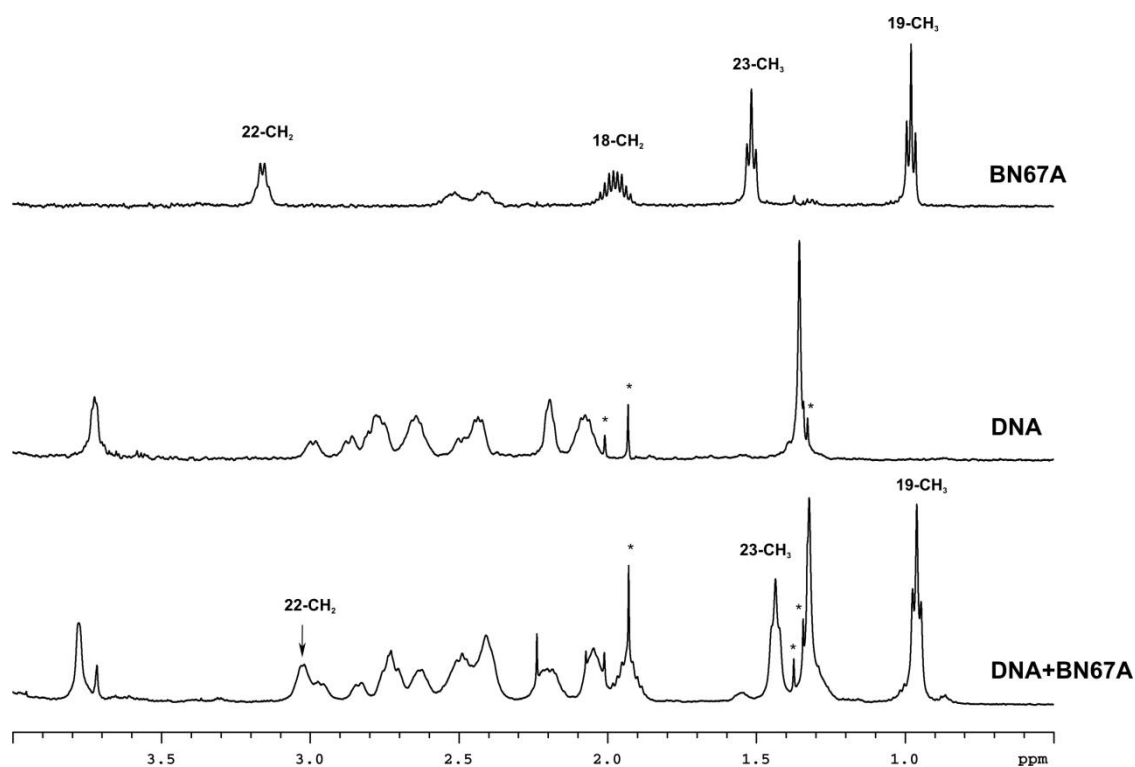


Wykres 7.3 Porównanie zmian przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta(\text{oktamer}) - \delta(\text{oktamer/pochodne SN38})$ protonów H6/H8 oktameru $d(\text{GCGATCGC})_2$ w obecności pochodnych SN-NMe₂, BN49A oraz BN71A w temperaturze pokojowej.

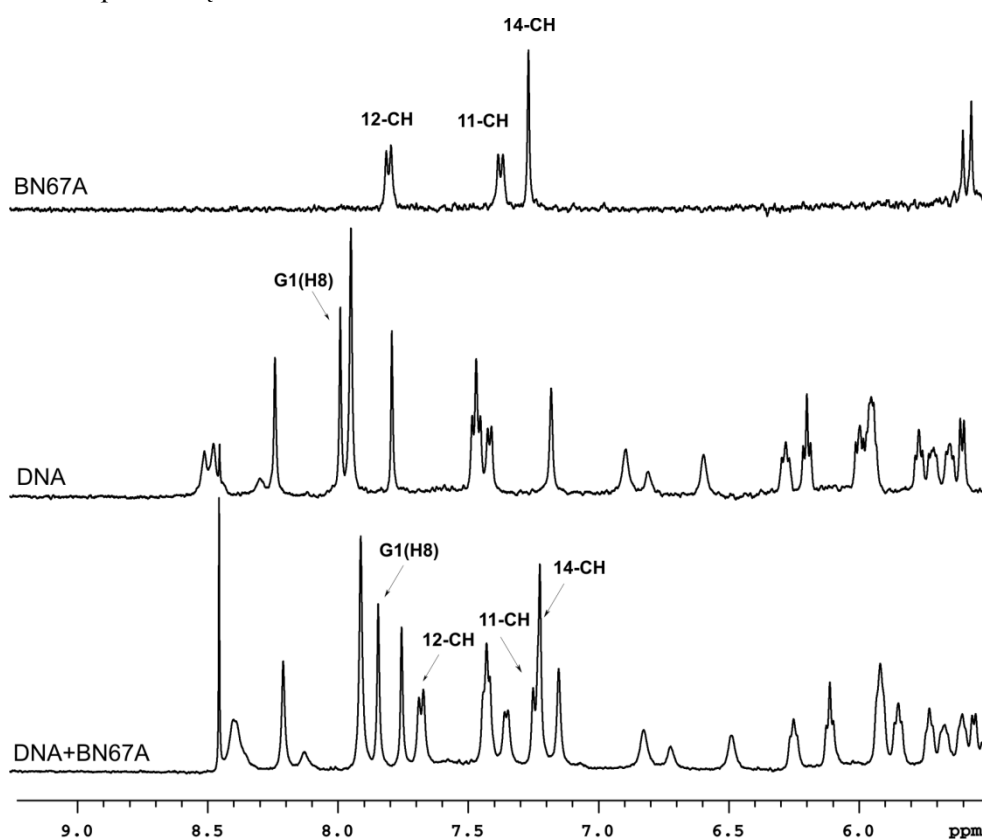
Największe zmiany $\Delta\delta$ zaobserwowano dla protonów H1' oraz H6/H8 (Wykres 7.2, 7.3) terminalnych nukleotydów. Może to świadczyć o oddziaływaniu pochodnych SN38 z krańcowymi parami zasad GC. Różnica przesunięcia chemicznego dla protonów H8 nukleotydu G1 w przypadku oddziaływania pochodnych SN-NMe₂ oraz BN49A wynosi 0.09 ppm. Natomiast dla kompleksu pochodnej BN71A 0.06 ppm. Porównując $\Delta\delta$ dla protonów H1' (Wykres 7.2) widoczny jest największy wzrost różnicy przesunięcia chemicznego dla krańcowych nukleotydów (G1, C8) w porównaniu do pozostałych nukleotydów sekwencji DNA. Najślabsze oddziaływanie z DNA wykazuje pochodna BN71A.

7.3.1.2 Kompleksy w temperaturze 10 °C

Obniżenie temperatury miało na celu zwiększenie siły oddziaływania badanych związków, przesuając równowagę reakcji w stronę powstającego kompleksu DNA/ ligand. Pomiary wykonano dla pochodnych BN37A, BN67A, BN71A oraz BN74A. Na zarejestrowanych widmach NOESY oraz ¹H NMR zaobserwowano identyczną tendencję jak w przypadku eksperymentów prowadzonych w temperaturze pokojowej. Przykładowe widmo ¹H NMR kompleksu BN67A z $d(\text{GCGATCGC})_2$ przedstawiające zmiany przesunięć chemicznych liganda oraz protonów oligomeru DNA pokazano na Rysunkach 7.5, 7.6.



Rysunek 7.5 Zakres alifatyczny widma ^1H NMR oktaimeru $\text{d}(\text{GCGATCGC})_2$ w obecności pochodnej BN67A, pH=6, bufor 25 mM NaCl/ 25 mM K_3PO_4 $\text{H}_2\text{O}/$ 10 % D_2O , 10 °C. *-oznacza zanieczyszczenia pochodzące od DNA.



Rysunek 7.6 Zakres aromatyczny widma ^1H NMR próbki BN67A.

Oddziaływanie pochodnej BN67A z DNA powoduje zmianę przesunięć chemicznych protonów należących do pochodnej oraz DNA w stronę niższych częstości (Rysunek 7.5, 7.6). Największą zmianę zaobserwowano dla protonów aromatycznych 11-CH oraz 12-CH cząsteczki BN67A, dla których wartości $\Delta\delta$ wynoszą odpowiednio 0.13 ppm i 0.11 ppm (Tabela 7.5). Na Rysunku 7.5 pokazano widmo ^1H NMR zakresu alifatycznego pochodnej (widmo górne) na którym widoczne są sygnały od grup etylowych pochodnej SN38 w pozycji 7-C pierścienia B (23-CH₃ i 22-CH₂) oraz w pozycji C-20 pierścienia E (19-CH₃, 18-CH₂). Po dodaniu związku do DNA (widmo dolne) obserwujemy przede wszystkim poszerzenie się sygnałów protonów 23-CH₃ oraz 22-CH₂, które wykazują znacznie większe wartości $\Delta\delta$ w porównaniu do protonów grupy etylowej w pozycji 20-C (Tabela 7.5), wynoszące odpowiednio 0.08 oraz 0.14 ppm. Świadczy to o silniejszym oddziaływaniu z cząsteczką DNA grupy etylowej w pozycji 7-C pochodnej.

Numer atomu	BN67A	DNA+BN67A	$\Delta\delta$
11-CH	7.37	7.24	0.13
12-CH	7.80	7.69	0.11
14-CH	7.27	7.23	0.04
5-CH ₂	5.21; 5.08	na ^a	-
17-CH ₂	5.58; 5.42	5.51	0.07
		5.36	0.06
18-CH ₂	1.97	1.93 ^b	0.04
22-CH ₂	3.16	3.02	0.14
19-CH ₃	0.98	0.96	0.02
23-CH ₃	1.52	1.44	0.08
24-CH ₂	na ^a	na ^a	-
25-CH ₂	4.14	4.16 ^b	-
26-CH ₂	4.24; 4.14		
27-CH ₂	2.42; 2.52	2.42; 2.52 ^b	-

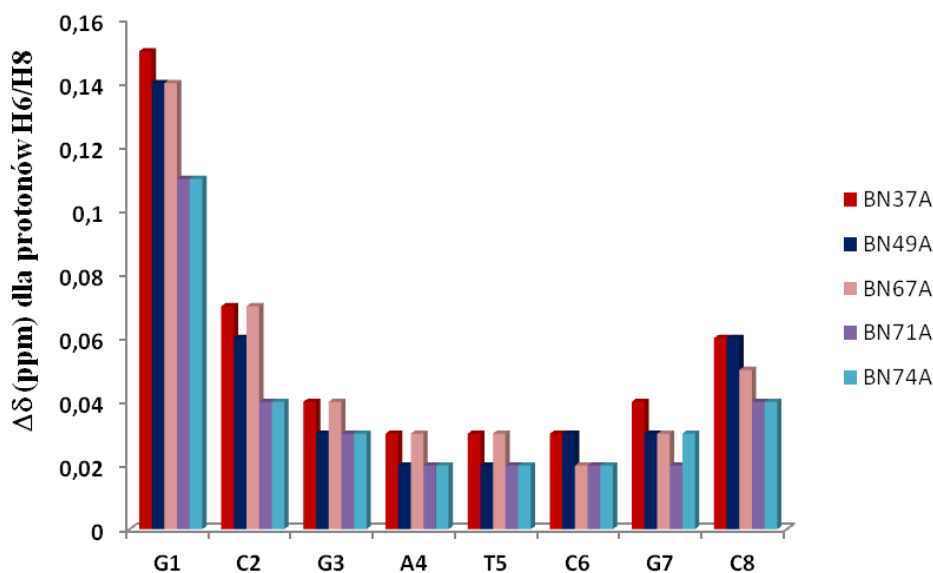
Tabela 7.5 Zmiany wartości przesunięć chemicznych niezwiązanej pochodnej BN67A oraz w obecności DNA w temp. 10 °C, w buforze 25mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ H₂O/ 10 % D₂O o pH=6; a-sygnał pod lub blisko H₂O; b-pod sygnałem DNA; na -nie przypisano (not assigned); $\Delta\delta = \delta(\text{BN67A}) - \delta(\text{DNA+BN67A})$.

Najsilniejsze oddziaływanie z oktamerem DNA zaobserwowano dla pochodnej BN37A. Różnice przesunięć chemicznych protonów DNA przedstawiono w Tabeli 7.6.

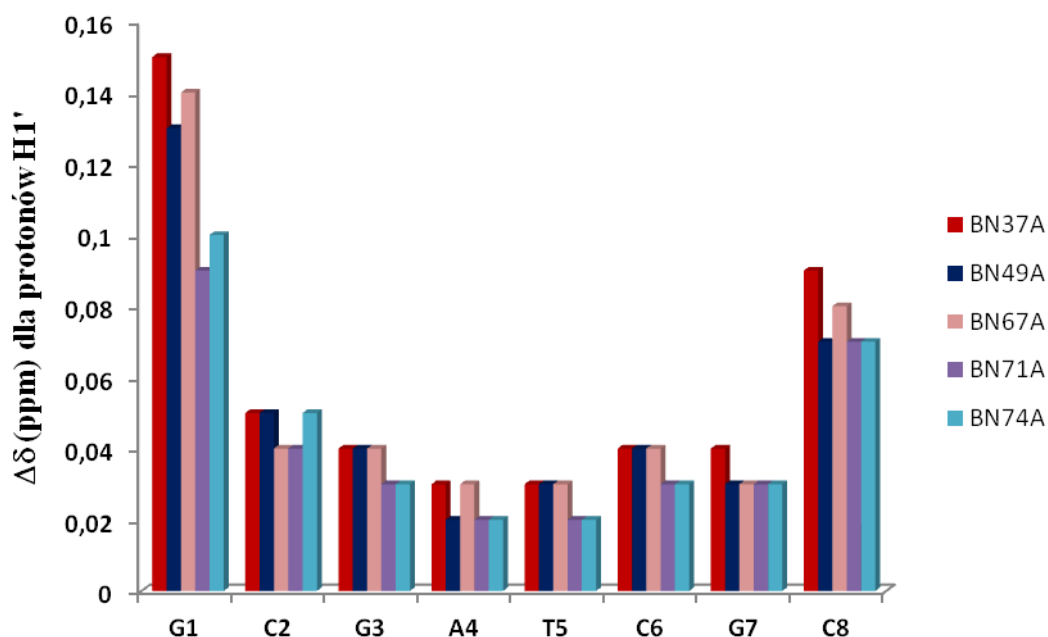
	NH	NH ₂ '	NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	-	-	-	0.15	-	0.15	0.13	0.09	0.04	0.01	-0.03
C2	-	0.11	0.12	0.07	0.09	0.05	0.05	0.04	-	-	-
G3	0.05	-	-	0.04	-	0.04	0.03	0.03	0.02	0.03	-
A4	-	-	-	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02
T5	0.03	-	-	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	-	-	-
C6	-	0.06	0.07	0.03	0.04	0.04	0.02	0.02	0.01	0.02	-
G7	0.10	-	-	0.04	-	0.04	0.02	0.01	0.01	0.01	-
C8	-	0.10	0.15	0.06	0.11	0.09	-0.01	-0.01	-0.02	0.01	-

Tabela 7.6 Różnice wartości przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta(\text{oktamer}) - \delta(\text{oktamer}/\text{BN37A})$ w 10 °C.

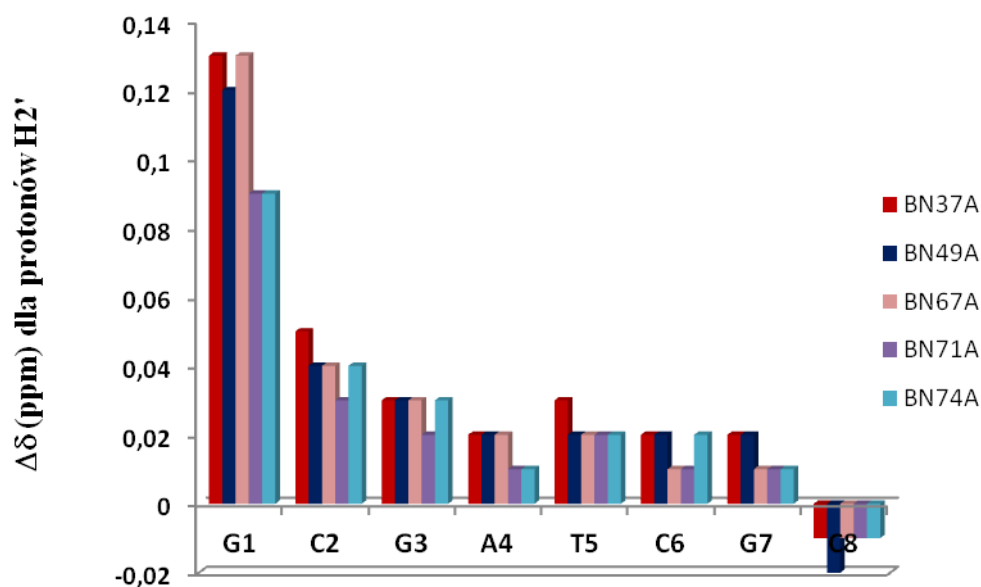
Największej zmianie uległy przesunięcia protonów należące do terminalnych par zasad GC, wartość $\Delta\delta$ dla protonów H8 oraz H1' nukleotydu G1 wyniosła 0.15 ppm. Zaobserwowano także znaczną wartość $\Delta\delta$ dla grupy NH₂ wynoszącą 0.10 ppm oraz 0.15 ppm w stronę niższych częstości. Przedstawione wyniki sugerują, iż pochodna BN37A oddziałującej z terminalną parą oktameru d(GCGATCGC)₂. Oddziaływanie pochodnej SN38 także wpływa na przesunięcia chemiczne protonów sąsiadujących par zasad o czym świadczą znaczne wartości $\Delta\delta$ dla nukleotydów G7 oraz C2. Różnice przesunięć chemicznych maleją w stronę centralnych par zasad. Identyczną tendencję zaobserwowano dla pozostałych pochodnych (Wykresy 7.4-7.6).



Wykres 7.4 Porównanie zmian wartości przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta(\text{oktamer}) - \delta(\text{oktamer}/\text{pochodne SN38})$ protonów H6/H8 oktameru d(GCGATCGC)₂ w obecności pochodnych BN37A, BN49A, BN67A, BN71A, BN74A w temperaturze 10 °C.



Wykres 7.5 Porównanie zmian wartości przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta(\text{oktamer}) - \delta(\text{oktamer/pochodne SN38})$ protonów H1' oktameru d(GCGATCGC)₂ w obecności pochodnych BN37A, BN49A, BN67A, BN71A, BN74A w temperaturze 10 °C.



Wykres 7.6 Porównanie zmian wartości przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta(\text{oktamer}) - \delta(\text{oktamer/pochodne SN38})$ protonów H2' oktameru d(GCGATCGC)₂ w obecności pochodnych BN37A, BN49A, BN67A, BN71A, BN74A w temperaturze 10 °C.

Ponadto, w przypadku każdego z kompleksów zauważono dużą zmianę wartości przesunięcia chemicznego w stronę niższych częstości dla protonów reszty cukrowej H2'/H2'' nukleotydu G1 oraz niewielką zmianę δ w stronę wyższych częstości dla nukleotydu C8 (Wykres 7.6). Przypisania przesunięć chemicznych oraz różnice $\Delta\delta$ dla kompleksów DNA z badanymi pochodnych SN38 przedstawiono w załącznikach: pochodna BN37A załącznik 9, BN49A załącznik 12-13, BN67A załącznik 14-15, BN71A załącznik 18-19 oraz BN74A załącznik 20-21. Porównując dane otrzymane na podstawie przeprowadzonych eksperymentów można stwierdzić, że wszystkie pochodne oddziałują z terminalną parą GC tworząc kompleksy molekularne. Najslabiej oddziałują pochodne BN71A oraz BN74A, najsilniej zaś związki BN37A, BN49A i BN67A.

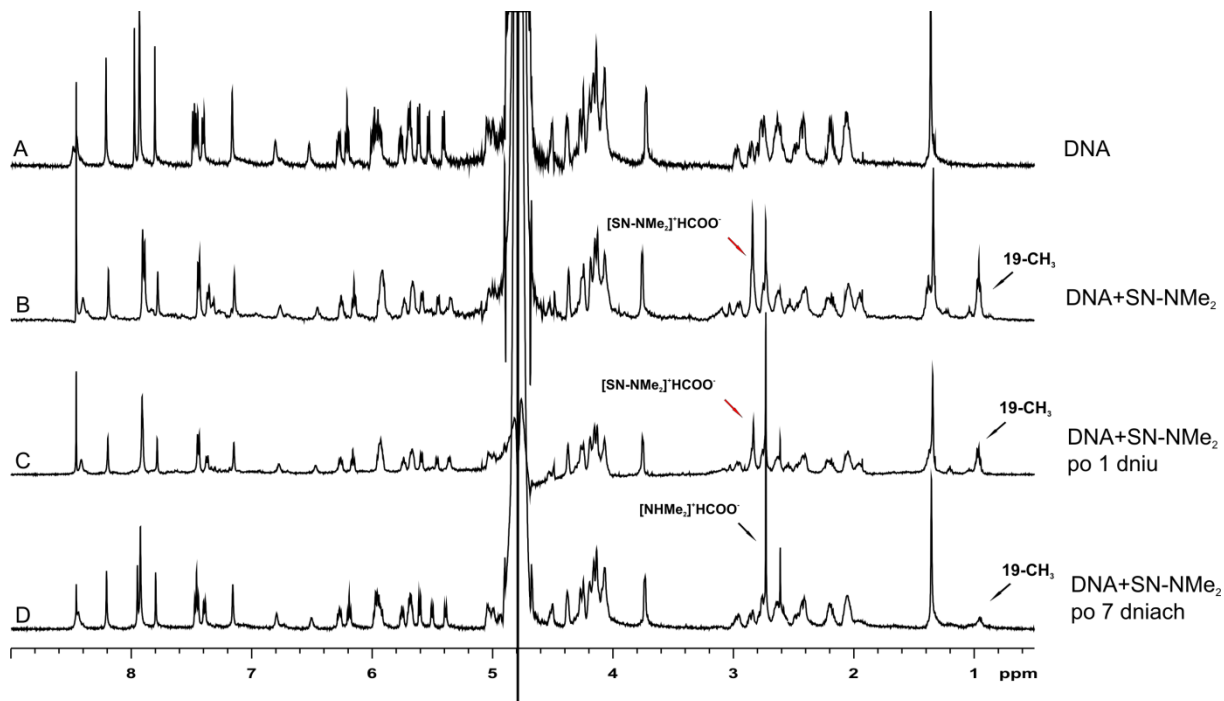
Wiadomo, że związki otrzymywane w reakcji Mannicha mogą ulegać reakcji retro-Mannicha a także ulegać przemianie do związków typu *o*-metylenochinonu, który może reagować z nukleofilowymi cząsteczkami.¹¹⁰ W trakcie badania oddziaływań otrzymanych pochodnych z oktamerem zarówno w temperaturze pokojowej jak i w 10 °C zaobserwowano, że pochodne ulegają reakcji retro-Mannicha prowadzącej do związku SN38 oraz tworzy się alkohol jako produkt reakcji z wodą. Zaobserwowano także alkilowanie oktameru o sekwencji d(GCGATCGC)₂.

7.3.2 Alkilowanie oligomeru DNA

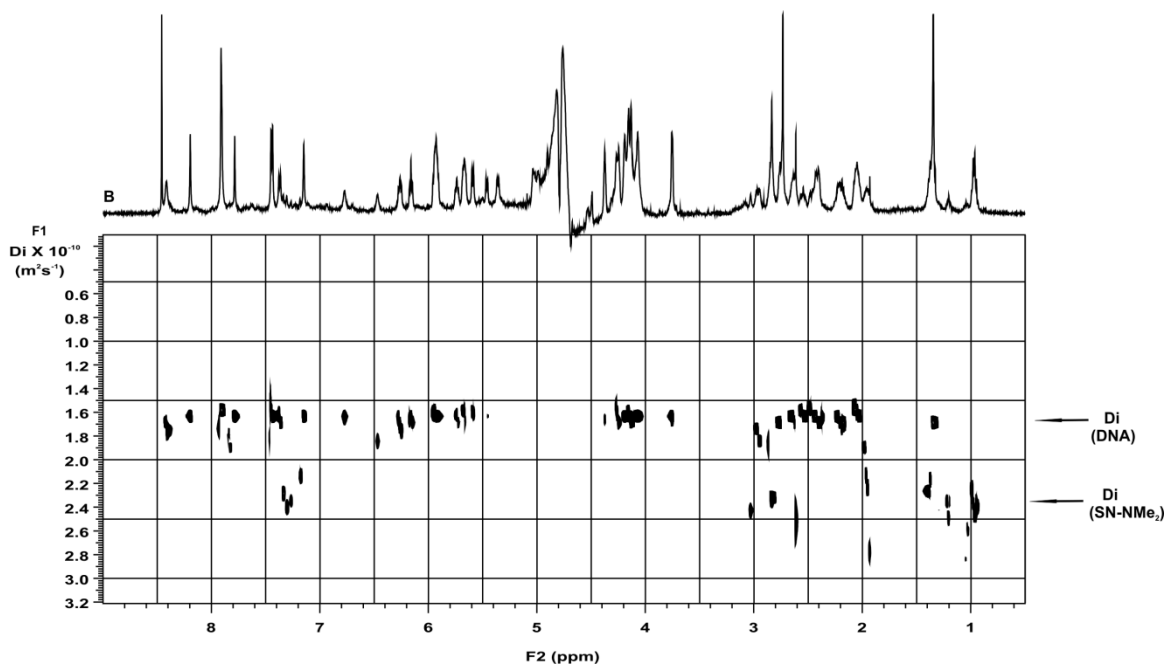
7.3.2.1 Pochodna SN-NMe₂

Podczas prowadzenia eksperymentów mających na celu zbadanie kompleksu pochodnej [SN-NMe₂⁺HCOO⁻] zauważono, że grupa dimetyloaminowa ulega eliminacji w roztworze DNA. Przebieg procesu monitorowano przy pomocy widm ¹H NMR (Rysunek 7.7). Zmiany przesunięć chemicznych protonów DNA oraz poszerzenie sygnałów należących do pochodnej SN38 świadczą o tworzeniu kompleksu molekularnego badanego związku z oligomerem DNA. Oddziaływanie to zostało potwierdzone eksperymentem DOSY (Rysunek 7.8) wykonanym bezpośrednio po dodaniu SN-NMe₂ do roztworu DNA. Widoczne są dwa współczynniki dyfuzji należące do związanego niekowalencyjnie DNA (Di, 1.7 x 10⁻¹⁰ m²/s) oraz pochodnej SN38 w szybkiej wymianie z DNA (Di, 2.3 x 10⁻¹⁰ m²/s). Współczynnik dyfuzji niezwiązanej pochodnej SN38 wynosi około 3.5 x 10⁻¹⁰ m²/s. Na widmie B i C zaznaczone zostały sygnały grupy metylowej oraz dimetyloaminowej związku SN-NMe₂.

Sygnaly te zanikają w czasie. Związek po upływie 7 dni prawie całkowicie przereagował o czym świadczy obecność sygnału należącego do mrówczanu dimetyloaminy pokazanego na widmie D (Rysunek 7.7), a słaby sygnał grupy metylowej świadczy o obecności związanej kowalencyjnie pochodnej SN38.

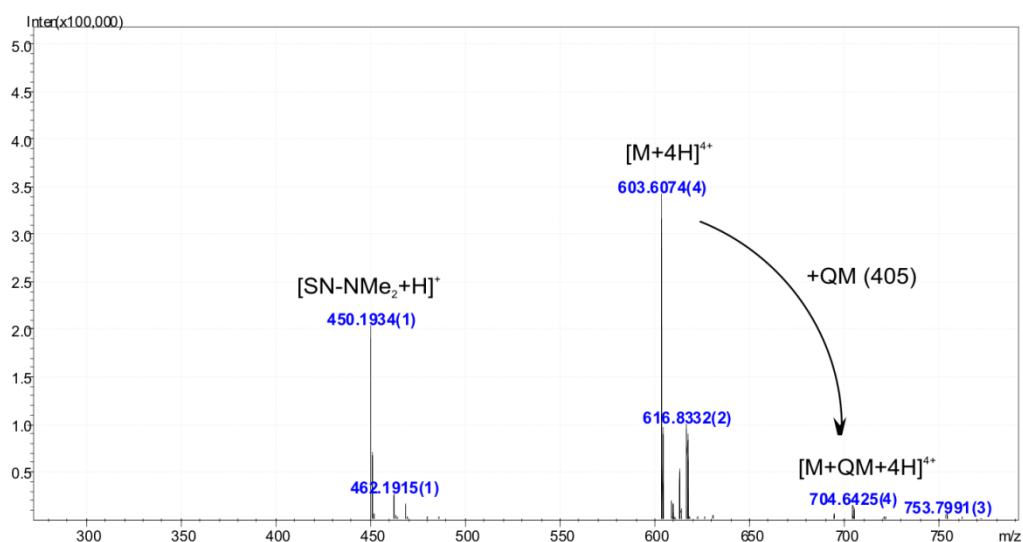


Rysunek 7.7 Monitorowanie ^1H NMR reakcji $[\text{SN-NMe}_2]^+\text{HCOO}^-$ (0.62 mM) z oligomerem $\text{d}(\text{GCGATCGC})_2$ (0.31 mM ds.) w roztworze buforu 25 mM NaCl/ 25 mM K_3PO_4 , $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 90/10 v %) o $\text{pH}=6$: A-widmo czystego DNA; B- widmo DNA wykonane bezpośrednio po dodaniu pochodnej; C-widmo mieszaniny reakcyjnej po 1 dniu, na widmach B i C strzałkami zaznaczono grupę metylową ok 1 ppm oraz grupę dimetyloaminowej ok. 2.9 ppm należące do pochodnej SN-NMe₂ D- widmo mieszaniny reakcyjnej po 7 dniach reakcji, strzałkami zaznaczono sygnał grupy metylowej pochodnej oraz mrówczan dimetyloaminy ok 2.85 ppm który częściowo nakłada się na widmo C.



Rysunek 7.8 Eksperyment PFGSE na próbce B z Rysunku 7.7. Strzałki wskazują współczynniki dyfuzji: dla DNA związanego w kompleksie molekularnym z pochodną SN-NMe₂, Di, 1.7×10^{-10} m²/s oraz dla wolnej pochodnej w szybkiej wymianie z DNA, Di, 2.3×10^{-10} m²/s.

Obecność produktu alkirowania DNA została potwierdzona przy pomocy techniki ESI/MS (Rysunek 7.9). Na widmie mieszaniny wykonanym po 7 dniach reakcji widoczny jest sygnał należący do niezwiązanego DNA $[M+4H]^{4+}$ o wartości 603.6 ($M=2410$) oraz sygnał odpowiadający masie $[M+QM+4H]^{4+}$ o wartości 704.6 ($M=2814$). Różnica mas pomiędzy wolnym DNA i alkirowanym równa jest 405 co odpowiada masie *o*-metylenochinonu pochodnej SN38 (Schemat 2.1). Na widmie widoczny jest także sygnał należący do pochodnej SN-NMe₂ ($m/z=450$). Z widma D na Rysunku 7.7 wynika, że pochodna przereagowała prawie całkowicie. Duża intensywność sygnału wynika zapewne z bardzo dobrej jonizacji lub jest wynikiem reakcji zachodzących w źródle podczas pomiaru ESI MS. Masy odpowiadające DNA i produktowi alkirowania DNA+QM odpowiadają masom pojedynczej nitki oktameru d(GCGATCGC)₂, natomiast na widmie D (Rysunek 7.7) widzimy sygnały pochodzące jedynie od dupleksu DNA. Prawdopodobnie spowodowane jest to warunkami prowadzonego eksperymentu.

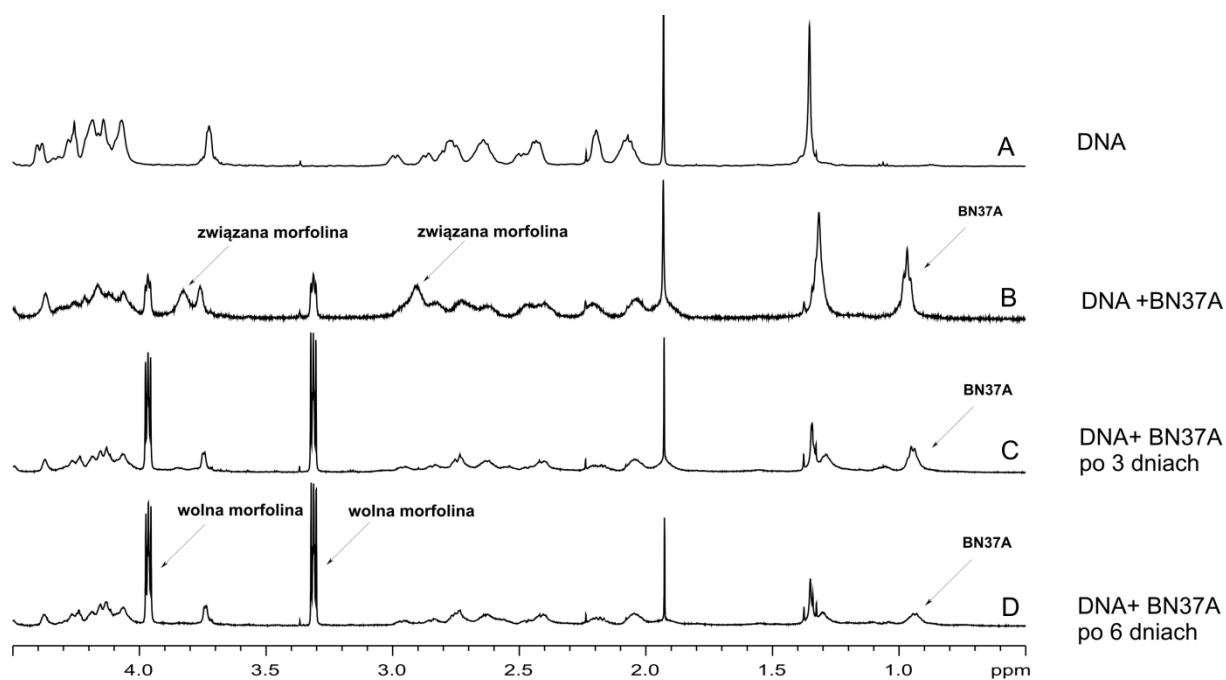


Rysunek 7.9 Widmo LR-MS ESI wykonane na próbce D z Rysunku 7.7. Strzałka wskazuje produkt alkilowania oktameru d(GCGATCGC)₂.

Wydajność procesu alkilowania oktameru d(GCGATCGC)₂ jest niska, dlatego też wykonanie eksperymentu DOSY po 7 dniach reakcji było niemożliwe. Wykazano jednak, że pochodna SN-NMe₂ oddziałuje z krańcową parą oktameru a także prowadzi do powstania produktów alkilowania DNA.

7.3.2.2 Pochodna BN37A

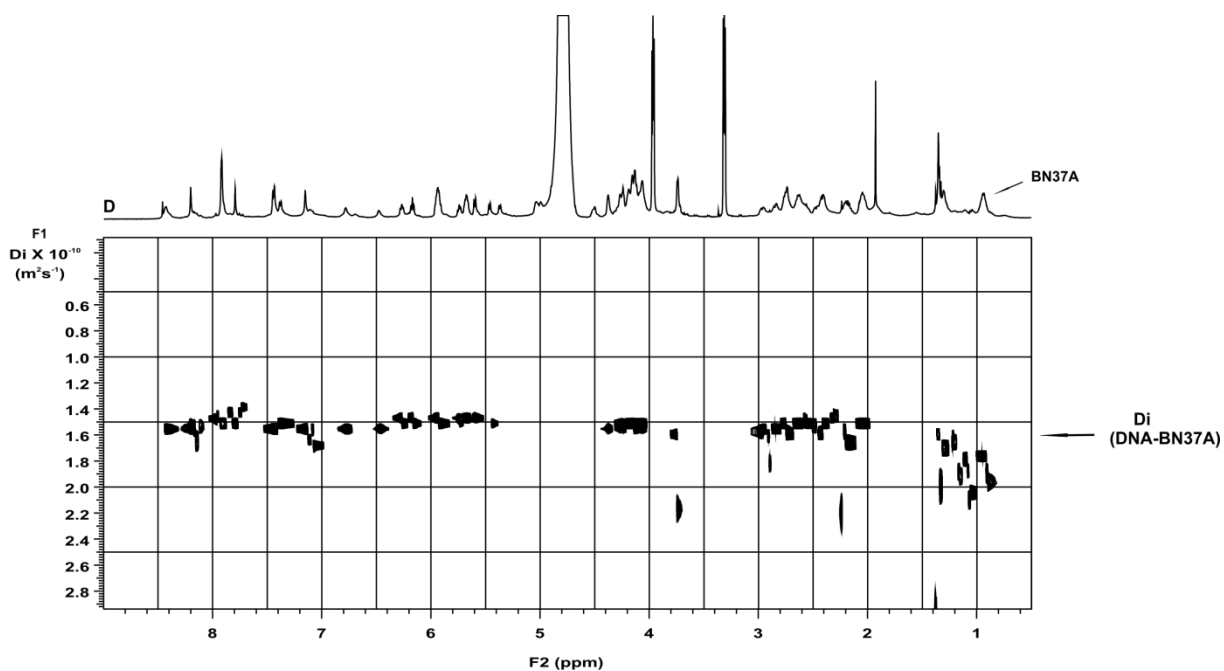
Obserwacje oddziaływania pochodnej BN37A z oktamerem DNA prowadzono w analogicznych warunkach jak dla związku SN-NMe₂, w temperaturze pokojowej. W celu zwiększenia oddziaływania liganda z DNA wykonano również eksperyment w temperaturze 10 °C. W obydwu eksperymentach zaobserwowano zmiany przesunięć chemicznych protonów DNA, sygnały należące do pochodnej SN38 były poszerzone. Na Rysunku 7.10 przedstawiono fragment widma ¹H NMR pokazujący przebieg reakcji w 10 °C (całe widmo przedstawiono w Załączniku 22). Na widmie B widoczne są sygnały należące do protonów morfoliny związanej z BN37A. Można także oszacować, że połowa związku przereagowała bezpośrednio po dodaniu jej do roztworu DNA. Po 6 dniach reakcji na fragmencie widma D widoczne są wyłącznie sygnały należące do wolnej morfoliny a sygnał grupy metylowej BN37A świadczy o obecności związanej kowalencyjnie z DNA pochodnej. Poszerzenie sygnału może wynikać z pokrywania się sygnałów rezonansowych grup metylowych należących do różnych produktów reakcji alkilowania bądź też, jak wcześniej wspomniano, przebiegiem reakcji odwracalnych pomiędzy kinetycznymi produktami reakcji.



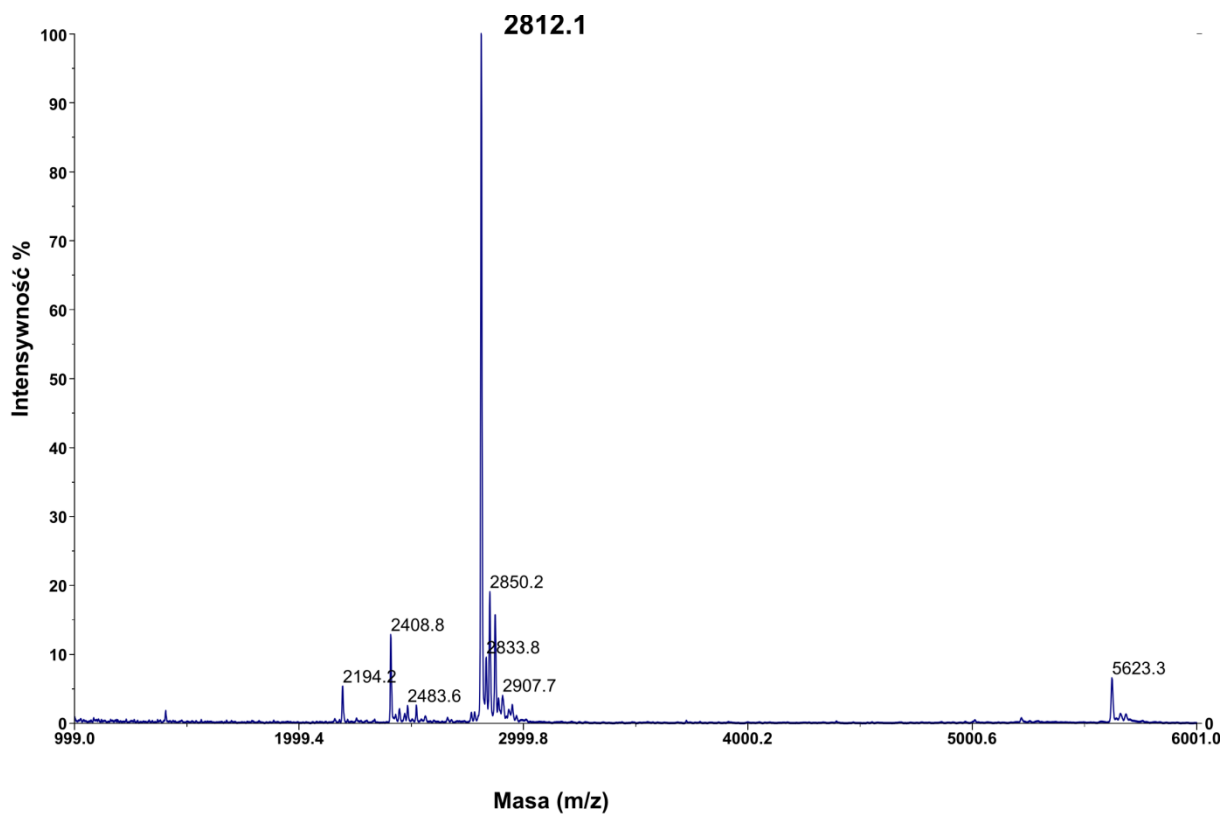
Rysunek 7.10 Fragment widma ^1H NMR (0.5-4.5 ppm) z monitorowania reakcji BN37 ($C=0.88$ mM) z $d(\text{GCGATCGC})_2$ ($C=0.44$ mM) w buforze 25 mM NaCl/ 25 mM K_3PO_4 o pH=6 (10 % D_2O) w temp. 10 °C: A- DNA; B-DNA po dodaniu BN37A; C-tak jak B po 3 dniach; D-tak jak B po 6 dniach.

Obecność związanej kowalencyjnie pochodnej BN37A z $d(\text{GCGATCGC})_2$ została potwierdzona eksperymentami DOSY, które wykonano zarówno dla reakcji prowadzonej w temperaturze pokojowej (po 7 dniach reakcji, załącznik 23) jak i prowadzonej w temperaturze 10 °C (Rysunek 7.11). Na widmach DOSY widoczny jest współczynnik dyfuzji wspólny dla fragmentu DNA i pochodnej SNB37A, 1.6×10^{-10} m^2/s . Wydajność dla reakcji z BN37A prowadzonej w temperaturze pokojowej wynosi ok 25 % a prowadzonej w 10 °C 50 %.

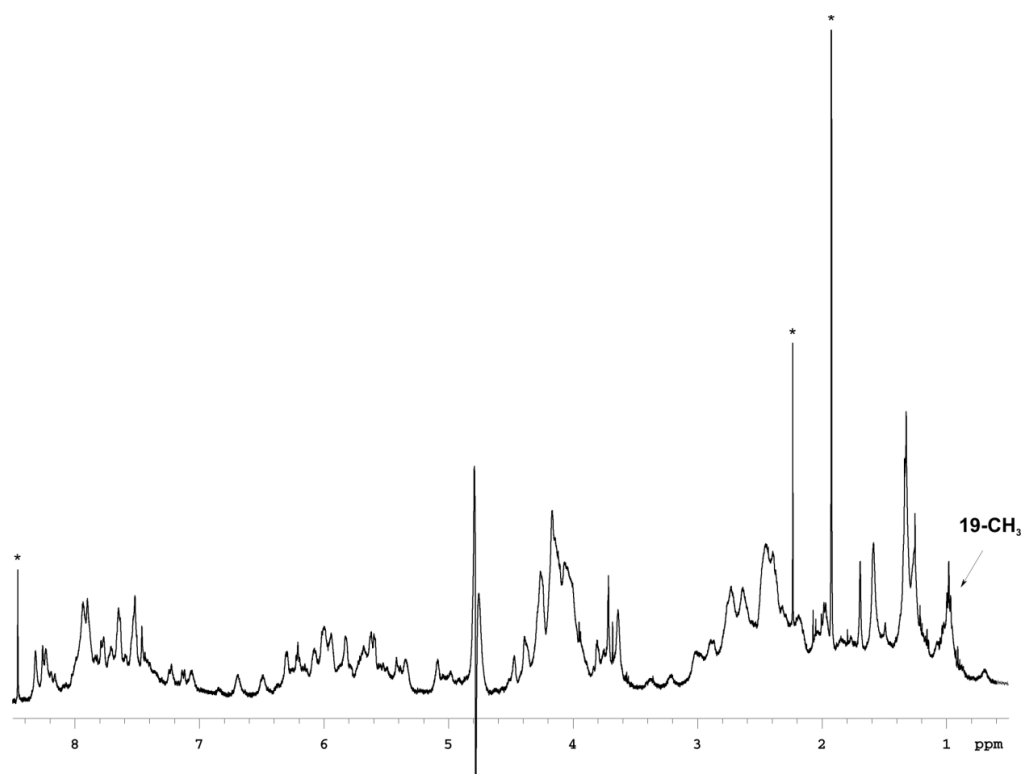
Ponieważ stwierdzono, że pochodna BN37A alkiluje oktamer $d(\text{GCGATCGC})_2$ podjęto próby oczyszczenia mieszaniny reakcyjnej w celu zidentyfikowania produktów reakcji. Używając techniki HPLC w odwróconych fazach wyizolowano frakcję, która zawiera produkty alkilowania DNA. Obecność produktu alkilowania potwierdzono techniką MALDI MS. Na Rysunku 7.12 widoczny jest sygnał o masie $m/z=2812$ odpowiadający masie produktu alkilowania pojedynczej nici oktameru DNA. Z zebranej frakcji wykonano widmo ^1H NMR (Rysunek 7.13) na którym widoczne są sygnały od fragmentu pochodnej SN38 (grupa 19- CH_3) oraz sygnały należące do DNA. Okazało się, że zebrana frakcja zawiera kilka produktów alkilowania oktameru. Obecnie trwają próby wyizolowania pojedynczych produktów reakcji.



Rysunek 7.11 Eksperyment PFGSE na próbce D z załącznika 22. Strzałka wskazuje współczynnik dyfuzji wspólny dla DNA i pochodnej BN37A, D_i , $1.6 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.



Rysunek 7.12 Widmo MALDI MS frakcji zawierającej produkty alkilowania oktameru DNA w 10°C po rozdziale HPLC oraz kolumnie sephadex G-10.



Rysunek 7.13 Widmo ^1H NMR wykonane dla próbki z Rysunku 7.12, D_2O , $\text{pH}=6$. *-oznaczono zanieczyszczenia.

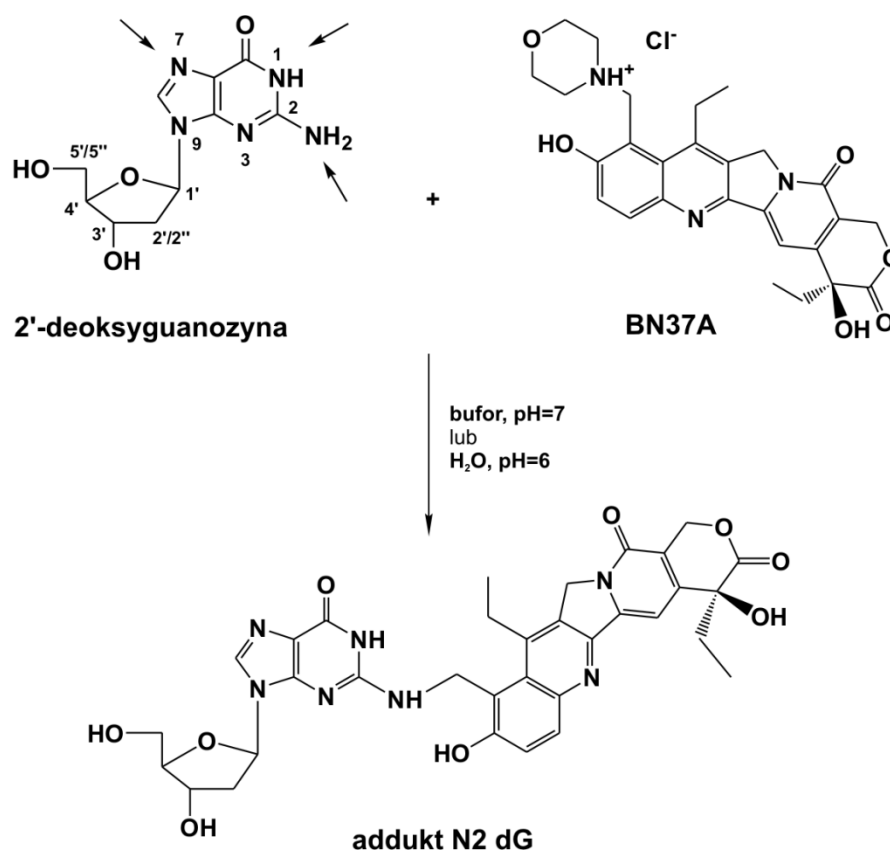
Na podstawie widm ESI-MS reakcji pozostałych pochodnych z oktamerem $\text{d}(\text{GCGATCGC})_2$ zaobserwowano, że pochodne BN71A oraz BN74A także prowadzą do produktów alkilowania DNA, z różnymi wydajnościami.

Powyższe wyniki potwierdzają, że pochodne SN38 ulegają spontanicznej eliminacji podstawnika w pozycji 24-C do produktu pośredniego typu QM tworzącego wiązanie kowalencyjne z oligomerem DNA, bez udziału fotochemicznej aktywacji, jak w przypadku pochodnej TPT. Alkilowanie DNA może także zachodzić poprzez mechanizm substytucji nukleofilowej. Dokładne poznanie mechanizmu działania wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

7.4 Alkilowanie 2'-deoksyguanozyny

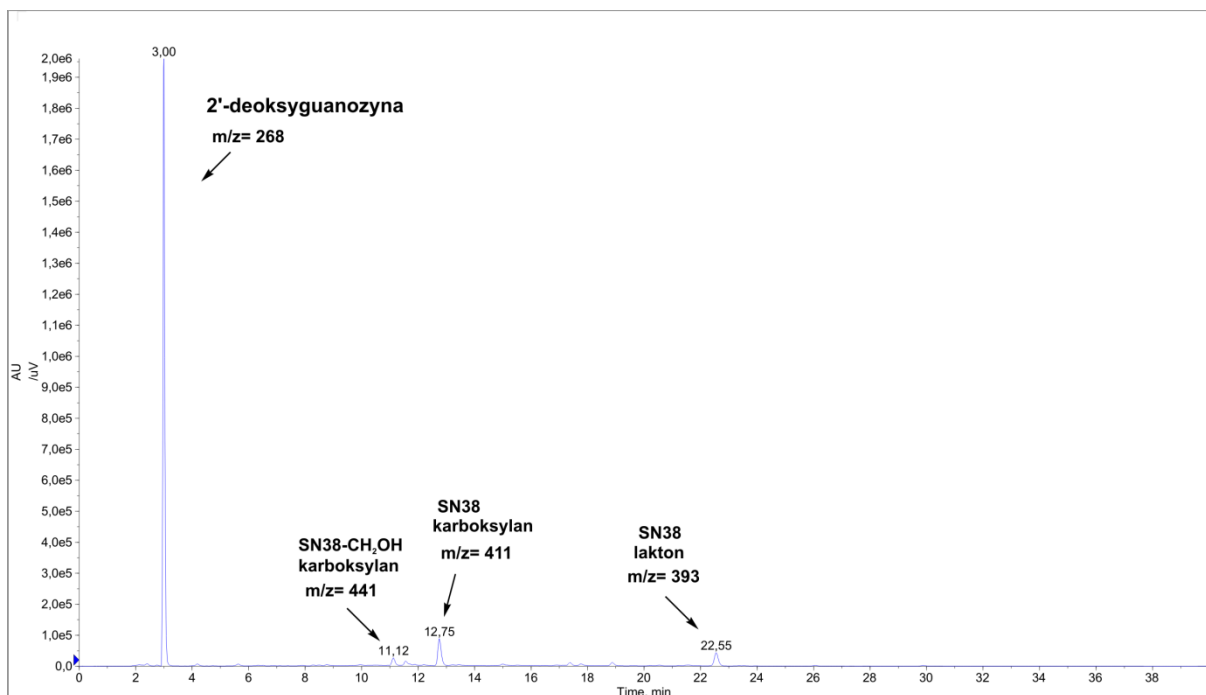
Z przedstawionych dotychczas badań wiadomo, że pochodne SN38 oddziałują z terminalną parą GC oligomeru DNA a następnie mogą tworzyć wiązania kowalencyjne z centrami nukleofilowymi kwasu deoksyrybonukleinowego jakimi są atomy azotu zasad aromatycznych. Dlatego też, w celu zbadania regioselektywności reakcji alkilowania i lepszego zrozumienia kinetyki reakcji oraz mechanizmu działania pochodnych SN38 postanowiono zbadać ich oddziaływanie z pojedynczymi modelowymi nukleozydami. Ze względu na stwierdzone w poprzednich badaniach oddziaływanie pochodnych kamptotecyny z parą GC w pierwszej kolejności do badań użyto 2'-deoksyguanozyny.

Do reakcji alkilowania 2'-deoksyguanozyny wybrano pochodną BN37A ze względu na jej większą zdolność do alkilowania oktameru DNA w porównaniu do pozostałych pochodnych SN38. Reakcję prowadzono w roztworze buforu 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ o pH=7 (w D₂O) oraz w roztworze D₂O o pH=6 (Schemat 7.1). Warunki reakcji prowadzonej w buforze odpowiadają warunkom reakcji pochodnej BN37A z oktamerem DNA. Natomiast reakcja prowadzona w pH=7 w roztworze buforu wydaje się korzystna ze względu na słabsze protonowanie atomów azotu, które są aktywnymi centrami nukleofilowymi w cząsteczce dG. Stężenie 2'-deoksyguanozyny w obydwu reakcjach wynosiło 1 mM. Związku alkilującego BN37A dodano w 2-krotnym nadmiarze (C=2 mM) ze względu na konkurencyjny proces hydrolizy pochodnej SN38. Postęp reakcji monitorowano przy użyciu techniki ¹H NMR (w tym celu sporządzono roztwory w D₂O) oraz LC/MS. W wyniku obydwu procedur otrzymano produkt alkilowania grupy 2-NH₂ cząsteczki 2'-deoksyguanozyny (określany dalej jako N2 dG addukt). Reakcję prowadzoną w roztworze wodnym o pH=6 zakończono po upływie 24 godz., gdy stwierdzono całkowite przereagowanie związku BN37A (na widmie ¹H NMR widoczne były jedynie sygnały należące do wolnej cząsteczki morfoliny). Reakcja prowadzona w roztworze buforowanym została zakończona po upływie 48 godz..



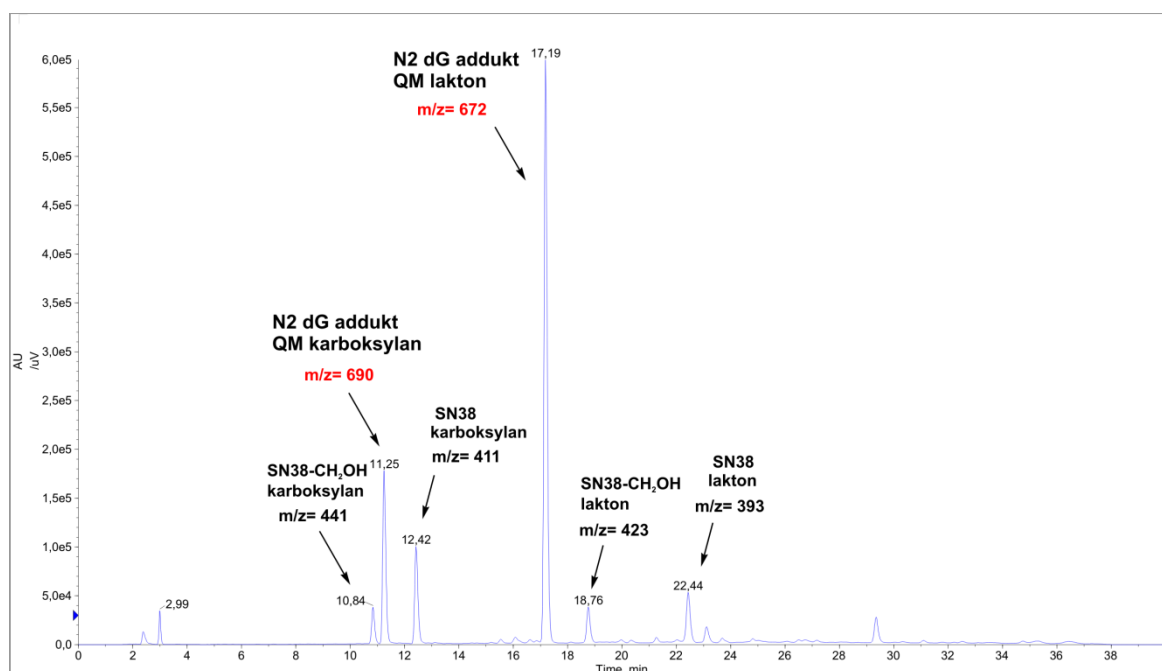
Schemat 7.1 Reakcja 2'-deoksyguanozyny z pochodną BN37A. Strzałki wskazują możliwe miejsca alkirowania dG.

W celu zbadania składu mieszaniny reakcyjnej, roztwory oraz osady wytrącone podczas reakcji prowadzonych w różnych warunkach poddano analizie LC/MS. Okazało się, że w roztworze znajduje się nieprzereagowana 2'-deoksyguanozyna oraz niewielkie ilości produktu hydrolizy pochodnej BN37A (SN38-CH₂OH) oraz SN38 (Rysunek 7.14), chromatogram LC/MS z reakcji w D₂O o pH=6 przedstawiono w Załączniku 24.



Rysunek 7.14 Chromatogram LC/MS roztworu po 48 godz. reakcji 2'-deoksyguanozyny z pochodną BN37A. Reakcja prowadzona w buforze 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ o pH=7.

Analiza osadów wykazała obecność produktu alkilowania 2'-deoksyguanozyny przez pochodną BN37 (N2 dG addukt $m/z=672$ dla formy laktonowej oraz $m/z = 690$ dla karboksylanu) a także produkt jej hydrolizy ($m/z=423$ lakton i $m/z= 441$ karboksylan) oraz SN38 ($m/z=393$ lakton, $m/z=411$ karboksylan) (Rysunek.7.15). Chromatogram LC/MS osadu z reakcji prowadzonej w D₂O i pH=6 przedstawiono w Załączniku 25. Na wykresach chromatogramów (Rysunki 7.14, 7.15) widoczne są sygnały należące do produktów reakcji, występujących zarówno w formie laktonu i karboksylanu. Prawdopodobnie wynika to z ustalania się równowagi pomiędzy obiema formami, spowodowane warunkami pH pomiaru LC/MS bądź pH analitów, które po rozpuszczeniu próbek wyniosło znacznie powyżej pH=6. Porównując chromatogramy osadów otrzymanych w różnych warunkach reakcji, w pH 6 i w pH 7, można stwierdzić, że w reakcji prowadzonej z użyciem buforu o pH=7, N2 dG addukt stanowi główny produkt reakcji. W wyniku reakcji powstaje mniejsza ilość alkoholu oraz SN38. W przypadku reakcji prowadzonej w D₂O i pH=6 zachodzi w większym stopniu proces konkurencyjny, prowadzący do reakcji retro-Mannicha której produktem jest SN38.

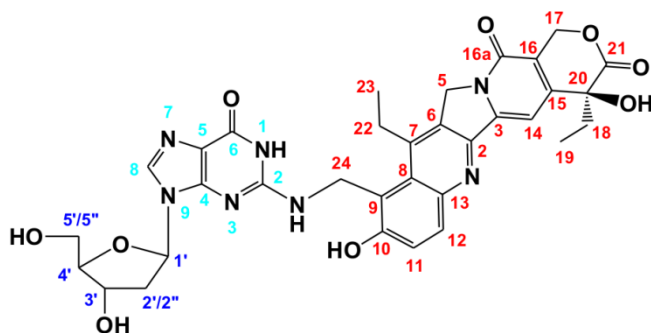


Rysunek 7.15 Chromatogram LC/MS wytrąconego osadu po 48 godz. reakcji 2'-deoksyguanozyny z pochodną BN37A. Reakcja prowadzona w buforze 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ o pH=7.

Osad z reakcji zawierający produkt reakcji oczyszczano stosując HPLC RP. W celu uniknięcia występowania produktów reakcji w formie karboksylanu przed rozdzieleniem przygotowany roztwór został zakwaszony kwasem octowym (pH = 5.5-6.5) i pozostawiony na okres 2-24 godz. (w celu przesunięcia równowagi w stronę formy laktonowej) Po oczyszczeniu mieszanin reakcyjnych addukt N2 dG otrzymano z wydajnością 7- 10%.

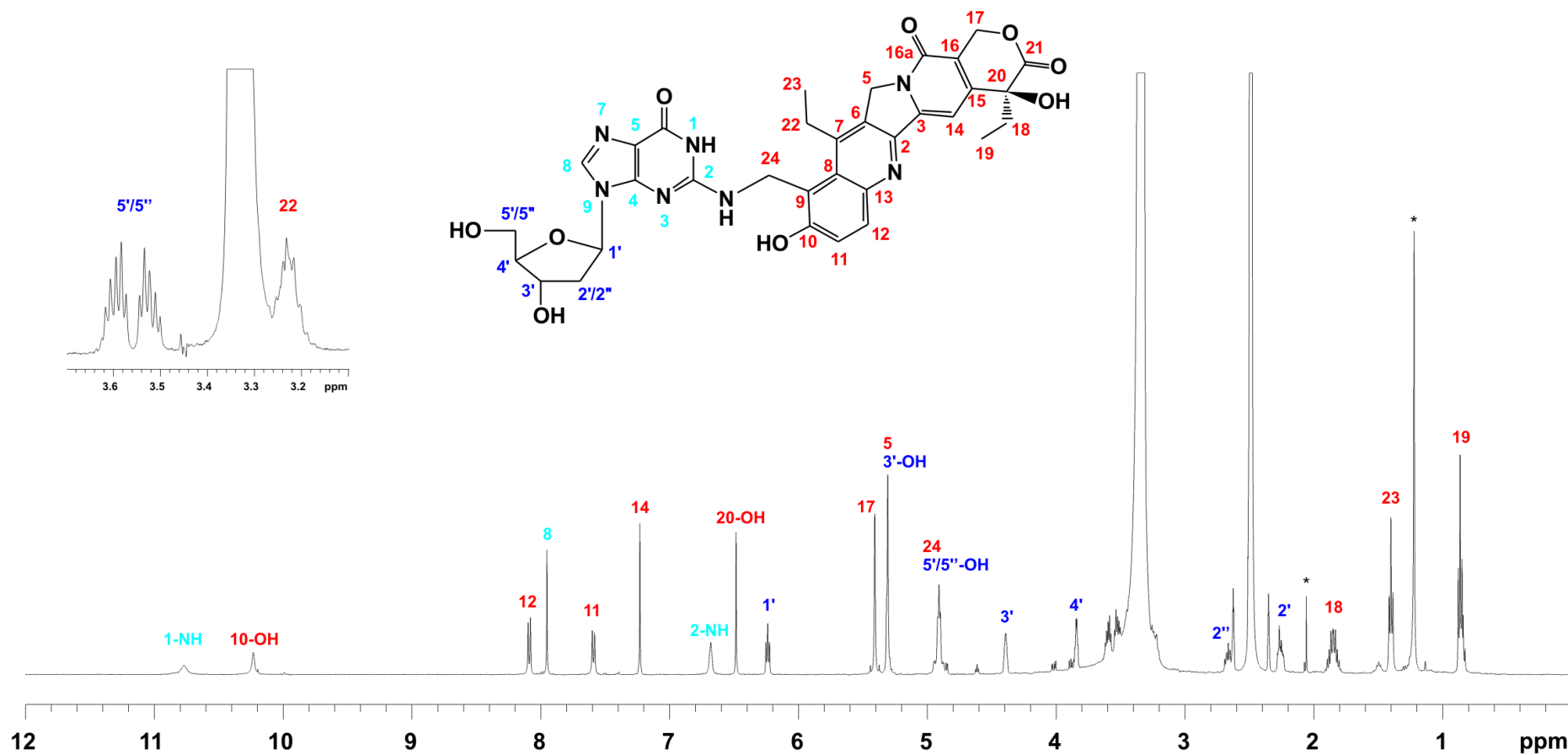
Strukturę otrzymanego adduktu potwierdzono przy użyciu technik NMR. Na widmie ¹H NMR (Rysunek 7.16) przypisano wszystkie sygnały protonowe należące do adduktu N2 dG, otrzymanego w reakcji z użyciem buforu o pH=7. Podobnie w przypadku produktu otrzymanego w reakcji prowadzonej w D₂O o pH=6, którego widmo protonowe zostało przedstawione w Załączniku 26. Na widmie przedstawionym na Rysunku 7.16 widoczne są protony wszystkich grup NH oraz OH należących do produktu reakcji. Sygnał grupy 3'-OH 2'-deoksyguanozyny pokrywa się z sygnałem od grupy 5-CH₂ należącej do ugrupowania pochodnej BN37A. Podobnie, proton hydroksylowy 5'/5''-OH pokrywa się z sygnałem grupy 24-CH₂ łączącej cząsteczkę dG ze strukturą pochodnej SN38. Przypisania sygnałów atomów węgla dokonano na podstawie widm HMBC i HSQC. W załączniku 27 pokazano fragment widma HSQC pokazujący przesunięcia ¹H/¹³C grup CH-8G oraz 24-CH₂, natomiast załącznik 28 przedstawia fragment widma HMBC pokazujący korelację protonu CH-8G do atomów

węgla C-4G oraz C-5G. Przesunięcia ^1H / ^{13}C NMR adduktu N2 dG przedstawiono w Tabeli 7.7.



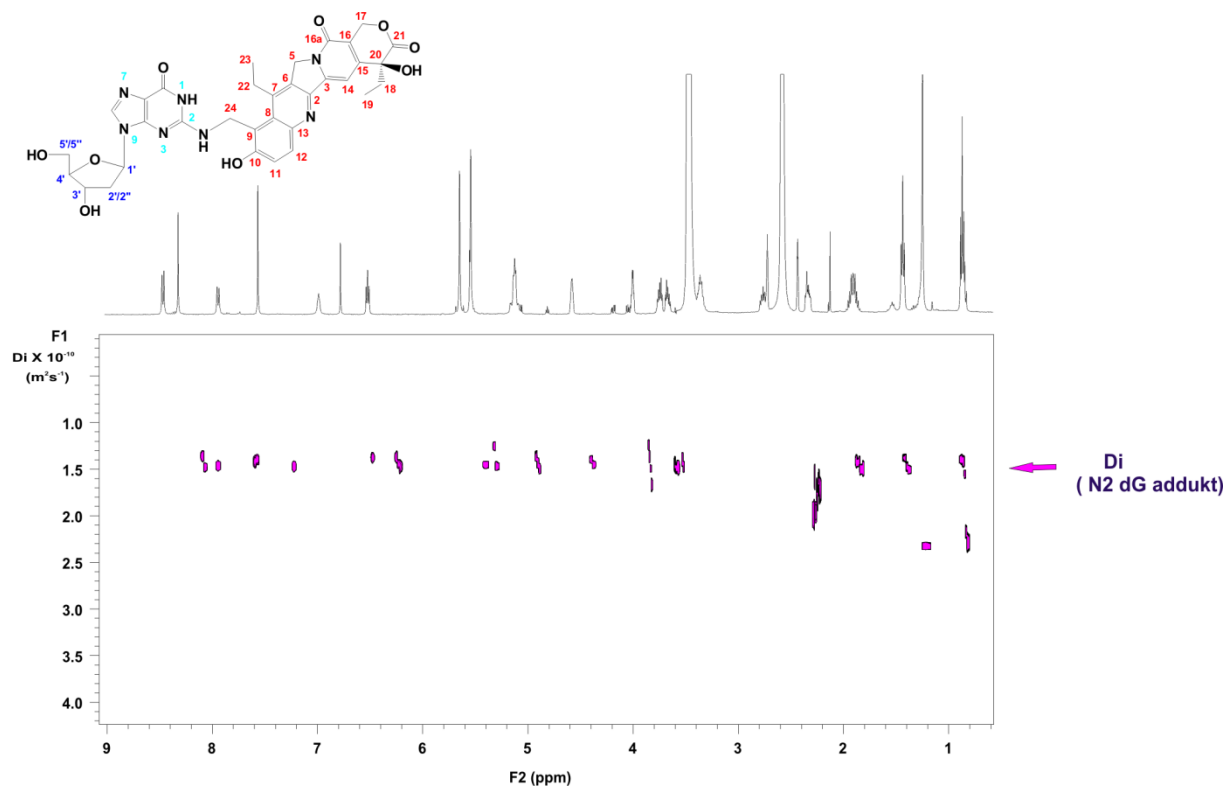
Numer atomu	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
2-C	-	148.9
3-C	-	146.8
5-CH ₂	5.30	50.6
6-C	-	131.4
7-C	-	144.4
8-C	-	120.3
9-C	-	n.o
10-C(OH)	10.23	157.1
11-CH	7.58	122.2
12-CH	8.08	133.2
13-C	-	145.8
14-CH	7.23	96.5
15-C	-	150.7
16-C	-	118.7
16a-C(O)	-	157.4
17-CH ₂	5.40	65.8
18-CH ₂	1.85	30.9
19-CH ₃	0.86	8.9
20-C(OH)	6.48	72.9
21-C(O)	-	173.2
22-CH ₂	3.23	25.5
23-CH ₃	1.40	15.4
24-CH ₂	4.91	38.2
NH-1G	10.77	-
C(NH)-2G	6.68	n.o
C-4G	-	150.8
C-5G	-	117.5
C(O)-6G	-	n.o
CH-8G	7.95	136.8
CH-1'	6.23	83.8
CH ₂ -2'/2''	2.25/2.66	39.9
CH-3'	4.39	71.5
3'-OH	5.31	-
CH-4'	3.83	88.3
CH ₂ -5'/5''	3.52/3.59	62.6
5'-OH	4.91	-

Tabela 7.7 Przesunięcia chemiczne $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ adduktu N2 dG; n.o- nie zaobserwowano (not observed).



Rysunek 7.16 Widmo ^1H NMR adduktu N2 dG wykonane w DMSO-d_6 . Addukt otrzymany w reakcji 2'-deoksyguanozyny z BN37A prowadzonej w roztworze buforu 25mM NaCl/ 25 mM K_3PO_4 o pH=7. *- oznacza zanieczyszczenia pochodzące od 2'-deoksyguanozyny.

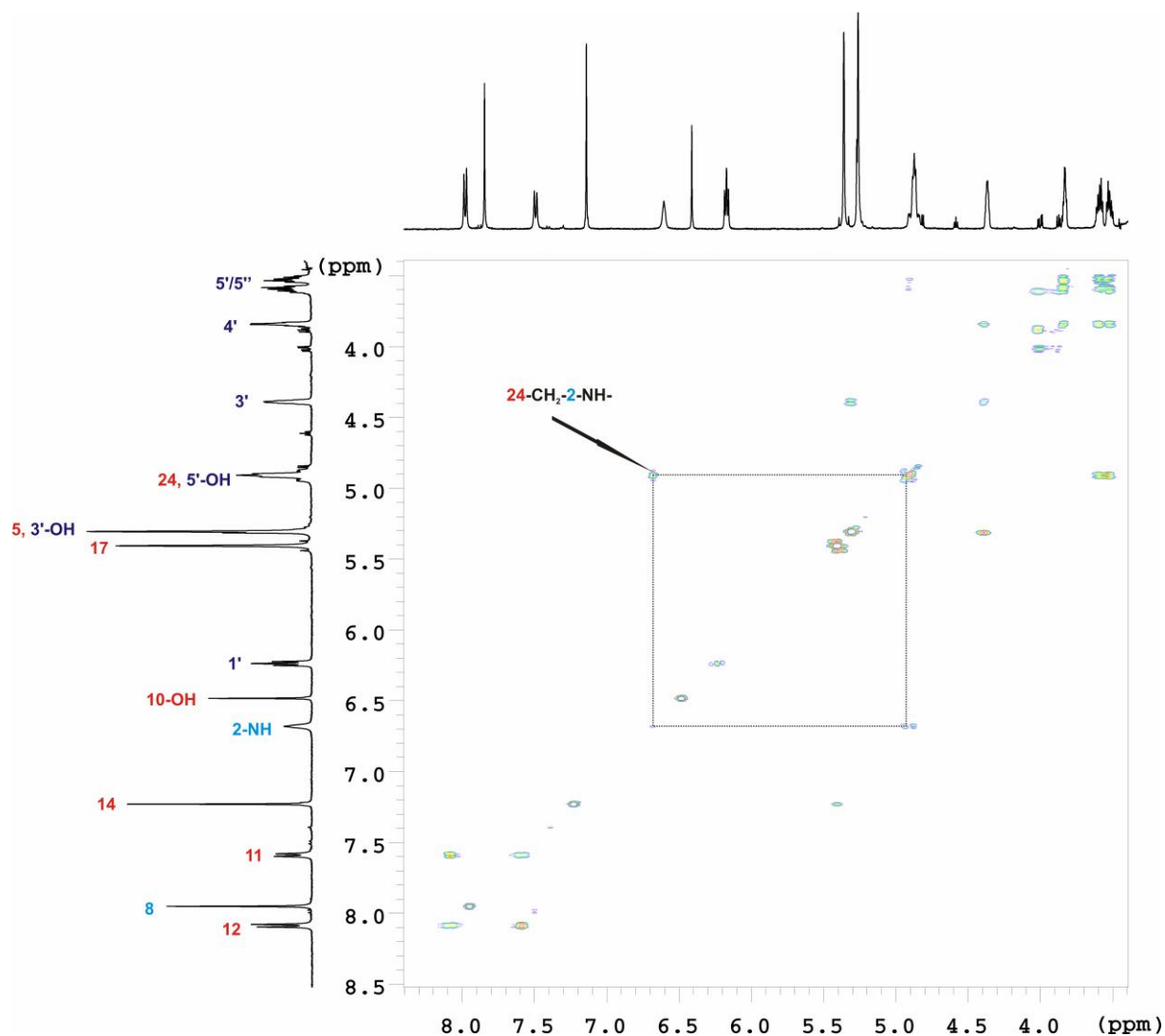
Obecność adduku została również potwierdzona w eksperymencie DOSY (Rysunek 7.17) na którym zaznaczony jest współczynnik dyfuzji, D_i , $1.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, wspólny dla fragmentu pochodzącego od 2'-deoksyguanozyny i pochodnej BN37A.



Rysunek 7.17 Eksperyment PFGSE na próbce z rysunku 7.16. Strzałka wskazuje współczynnik dyfuzji wspólny dla fragmentu dG oraz BN37A, D_i , $1.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

Dowodem potwierdzającym alkirowanie grupy 2-NH₂ cząsteczki 2'-deoksyguanozyny przez pochodną BN37A jest również korelacja (sprzężenie skalarne) pomiędzy protonem grupy 2-NH dG a protonami grupy 24-CH₂ łączącej oba ugrupowania, widoczne na widmie COSY (Rysunek 7.18).

Przedstawione dowody świadczą o regioselektywności procesu alkirowania dG przez pochodną BN37A. W wyniku reakcji prowadzonych w opisanych warunkach powstaje jedynie N2 dG addukt. Grupa aminowa 2'-deoksyguanozyny jest słabym nukleofilem, który według Weinerta⁸⁴ w reakcji z QM tworzy produkt termodynamiczny. W celu lepszego zrozumienia mechanizmów oddziaływania oraz regioselektywności i kinetyki reakcji konieczne są dalsze badania uwzględniające wszystkie nukleozydy i pochodne SN38.



Rysunek 7.18 Fragment widma COSY adduktu N2 dG o zakresie 4-8.5 ppm (patrz rysunek 7.16) Strzałka wskazuje jeden z sygnałów korelacyjnych 24-CH₂-2-NH-. Sygnały korelacyjne połączone liniami.

7.5 Badania biologiczne dla pochodnych SN38

W celu zbadania aktywności biologicznej nowych pochodnych SN38 w stosunku do komórek nowotworowych wykonano serie badań *in vitro* na komórkach raka piersi, płuc, okrężnicy oraz krwi. Jako związków referencyjnych użyto irinotekanu oraz SN38. Wykonano także testy na komórkach prawidłowych w celu sprawdzenia toksyczności związków w stosunku do zdrowych komórek (Tabela 7.8). Toksyczność związków mierzono za pomocą testu MTT.

Rodzaj komórek	Linia komórkowa	Czas inkubacji (godz.)	IC ₅₀ , µmol/l						
			SN38	BN67A	BN49A	BN71A	BN37A	BN74A	Irinotecan
Rak piersi	MDA	24	-	-	-	-	-	-	-
		48	0.71	5.95	1.68	1.79	3.01	5.95	29.95
		72	0.078	0.63	0.19	0.28	0.32	0.63	6.17
Rak piersi	MCF7	24	17.86	24.0	-	18.84	-	-	-
		48	2.37	5.25	6.65	4.42	29.47	35.24	36.85
		72	0.66	0.99	1.43	0.88	2.41	16.63	14.10
Rak okrężnicy	Caco2	24	-	-	-	-	-	-	-
		48	8.54	10.62	24.08	13.78	13.05	23.03	-
		72	0.95	1.83	7.73	1.51	29.44	6.35	-
Rak okrężnicy	HT29	24	18.50	-	21.35	-	27.56	31.61	-
		48	0.12	0.84	2.62	0.67	1.41	2.17	20.00
		72	0.02	0.07	0.24	0.11	0.22	0.18	6.85
Rak krwi	HL60	24	0.086	0.086	0.035	0.19	0.128	2.67	-
		48	0.004	0.026	0.015	0.046	0.033	0.078	3.45
		72	0.004	0.012	0.014	0.043	0.022	0.074	4.24
Rak płuc	A549	24	-	-	-	-	-	-	-
		48	0.025	0.20	0.24	0.17	0.56	2.26	12.93
		72	0.028/0.07 ^a	0.071/0.019 ^a	0.083	0.077	0.29/0.135 ^a	0.90	26.69
Komórki prawidłowe	CRL1790	72	4.98	80.52	237.0	75.54	1077.0	1703.0	90.25

^a-wartości IC₅₀ otrzymane dla testu CVS; znak "-,, oznacza IC₅₀ powyżej 50 µmol/l

Tabela 7.8 Wyniki badań biologicznych *in vitro* dla nowych pochodnych SN38 oraz związków referencyjnych na komórkach nowotworowych oraz dla komórek prawidłowych.

Badane związki mogą być uznane za potencjalne związki PAINS (ang. *pan-assay interference compounds*), których wyniki aktywności biologicznej mogą być zależne od składników pożywki biologicznej w teście MTT.¹¹¹ Wykonano więc dodatkowe badania potwierdzające, że związki te nie reagują z odczynnikami wykorzystywanymi w teście MTT. Ponadto, wyniki testu MTT mogą być zafałszowane przez związki wpływające na metabolizm komórek i mitochondriów. W tym celu wykonano dla trzech związków (SN38, BN37A oraz BN67A) test CVS, który jest niezależny od wpływu związków na wewnątrzkomórkowy metabolizm. Wartości IC₅₀ otrzymane w teście MTT i CVS (linia komórkowa A549, 72 godz., Tabela 7.8) są różne ale ich względny stosunek toksyczności jest porównywalny. Można więc uznać, że test MTT jest odpowiednim testem sprawdzającym zdolność badanych związków do antyprolifracji.

Wyniki otrzymane dla nowych pochodnych SN38 potwierdzają, że wykazują one znacznie lepszą aktywność w stosunku do komórek nowotworowych niż irinotekan, który jest stosowany w terapii antynowotworowej. Ponadto, związki te nie wykazują toksyczności dla komórek prawidłowych jak w przypadku SN38. W porównaniu do irinotekanu, wartości IC₅₀ dla linii CRL1790 są porównywalne a nawet lepsze (pochodna BN37A, BN49A oraz BN74A). Tabela 7.9 przedstawia indeks selektywności (SI, ang. *Selectivity Index*), określający ile razy bardziej dany związek powoduje apoptozę komórek nowotworowych niż komórek normalnych. Nowe pochodne SN38 wykazują co najmniej kilka rzędów wielkości większy indeks selektywności niż SN38, który wykazuje znakomitą aktywność w stosunku do komórek nowotworowych.

Linia komórkowa	Stosunek IC ₅₀ , komórki prawidłowe vs. komórki nowotworowe						
	SN38	BN67A	BN49A	BN71A	BN37A	BN74A	Irinotekan
MDA	64	366	1250	270	3365	2700	14.6
MCF7	7.5	81	166	87	447	103	6.4
Caco2	5.2	44	30.7	50	37	268	0.46
HT29	249	895	988	687	4900	9460	13.2
HL60	1245	6710	16900	1760	46800	23000	21.3
A549	178	1130	2860	981	3700	1890	3.38

Tabela 7.9 Stosunek IC₅₀ komórek prawidłowych w porównaniu z komórkami nowotworowymi (SI) obliczony dla wartości z Tabeli 7.8 po 72 godz. inkubacji.

8 Podsumowanie

W niniejszej rozprawie przedstawiłam syntezę oraz podstawowe właściwości fizykochemiczne i biologiczne nowej grupy związków alkilujących oligomery DNA *in vitro*. Opisałam syntezę, badania fizykochemiczne i biologiczne wybranych związków z serii TPT i SN38 z rodziny kamptotecyny, jako potencjalnych inhibitorów topoisomerazy I. Opracowałam sposób syntezy i oczyszczania nieopisanych w literaturze nowych pochodnych SN38 rozpuszczalnych w wodzie. Przedstawiłam dowody trwałości (czas półtrwania $t_{1/2}$), nowych pochodnych w rozpuszczalnikach stosowanych dla leków. Badania oddziaływania nowych związków z oligomerem i modelowym nukleozydem dostarczają dowodów na spontaniczne oraz indukowane naświetlaniem UV kowalencyjne wiązanie tych związków z oligomerem DNA. Badania biologiczne *in vitro* na komórkach nowotworowych pokazują, że nowe pochodne są o kilka rzędów wielkości bardziej cytotoksyczne niż stosowany klinicznie irinotekan. Jednocześnie, związki te są porównywalnie lub rzędy wielkości mniej cytotoksyczne w stosunku do komórek normalnych. W konkluzji można stwierdzić, że nowe pochodne SN38 opisane w pracy mogą spełniać warunki wymagane w bezpiecznej celowanej chemioterapii.

Dla pochodnych TPT przedstawiłam następujące wyniki;

- ✓ Oczyszczając wieloskładnikową mieszaninę reakcyjną czwartorzędowania topotekanu zaproponowaną przeze mnie metodą było możliwe otrzymanie mieszaniny zawierającej tylko sole kwasu mrówkowego pożądanej pochodnej TPT oraz TPT. Badając oddziaływanie czwartorzędowej soli $[TPT-Me_3N]^+ X^-$ ($X=CF_3SO_3^-, HCOO^-$) z oktamerem DNA (w pH= 6 oraz pH= 7) okazało się, że związek ten pod wpływem fotochemicznej aktywacji tworzy produkt przejściowy QM, który wiąże się kowalencyjnie z DNA. Reakcja alkilowania nie przebiega jednak selektywnie, o czym mogą świadczyć szerokie sygnały na widmach NMR. W wyniku reakcji powstają zarówno produkty alkilowania pojedynczej nici jak i podwójnej. Okazało się także, że sól kwasu mrówkowego jest bardziej reaktywna i wymaga krótszego czasu naświetlania światłem UV niż sól $[TPT-Me_3N]^+CF_3SO_3^-$.
- ✓ Wyniki testu MTT pokazują, że pochodna TPT wykazuje lepszą aktywność biologiczną wobec komórek białaczki mysiej po naświetlaniu światłem UV niż bez naświetlania.

Dla pochodnych SN38 przedstawiłam następujące wyniki;

- ✓ Stosując reakcję Mannicha otrzymano szereg pochodnych SN38 w postaci soli kwasu mrówkowego oraz soli kwasu chlorowodorowego, wykazujących bardzo dobrą rozpuszczalność w wodzie. Badając właściwości fizykochemiczne wykazano, że nowe pochodne wykazują długotrwałą stabilność w DMSO. Pochodne SN-NMe₂, BN37A oraz BN74A w wodzie ulegają procesowi hydrolizy, którego szybkość zależy od pH roztworu. Pochodna BN74A, podobnie jak topotekan, nie wykazuje stabilności w roztworze metanolu, ulega reakcji prowadzącej do powstania eteru 24-CH₂-OCD₃.
- ✓ Zbadano oddziaływanie pochodnych SN38 z oligomerem DNA o sekwencji d(GCGATCGC)₂ w temperaturze pokojowej oraz w 10 °C. Potwierdzono, że związki te oddziałują z terminalną parą zasad GC oktameru o czym świadczą największe zmiany przesunięć chemicznych protonów DNA. Ponadto, wykazano zdolność pochodnych SN38 do alkilowania DNA poprzez produkt pośredni QM lub mechanizm substytucji nukleofilowej. Reakcja ta nie przebiega jednak selektywnie.
- ✓ Badając regioselektywność oraz kinetykę reakcji związku BN37A z 2'-deoksyguanozyną w różnych warunkach, potwierdzono powstawanie jedynie termodynamicznego produktu reakcji, adduktu N2 dG.
- ✓ Wykonane badania biologiczne pokazują, że nowe pochodne SN38 wykazują lepszą aktywność biologiczną *in vitro* przeciwko komórkom nowotworowym niż stosowany w chemioterapii irinotekan. Ponadto, nie prowadzą do antyproliferecji komórek prawidłowych jak w przypadku SN38.

9 Część eksperymentalna

9.1 Pochodne TPT

Chlorowodorek Topotekanu zakupiono w firmie Alexis Biochemicals.

Reakcja czwartorzędowania Topotekanu oraz scharakteryzowanie produktów mieszaniny reakcyjnej otrzymanej z zastosowaniem $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{OCH}_3$ jako czynnika metylującego zostały opracowane przez K.Hyz.¹¹² Sole kwasu mrówkowego pochodnej TPT otrzymano w ramach niniejszej pracy.

Otrzymywanie obojętnego TPT

Chlorowodorek TPT (3.74 mg , $8.15 \times 10^{-3} \text{ mmol}$) rozpuszczono w $1.0 \text{ ml H}_2\text{O}$. Roztwór doprowadzono do $\text{pH}=7$ przy użyciu wodnego roztworu NaHCO_3 . Wolny TPT wyekstrahowano CH_2Cl_2 , odparowano rozpuszczalnik pod próżnią a następnie liofilizowano przez 1 godz. w celu usunięcia wody.

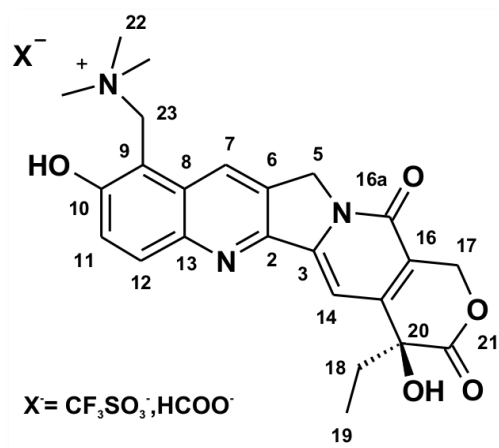
Reakcja czwartorzędowania TPT

Wolny TPT (3.44 mg , $8.15 \times 10^{-3} \text{ mmol}$) rozpuszczono w $5.6 \text{ ml CH}_2\text{Cl}_2$ a następnie dodano $185 \mu\text{l}$ (1.6 mmol) $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ (uprzednio zobojętnionego przy użyciu K_2CO_3 , w celu pozbycia się kwasu $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godz. Mieszaninę reakcyjną odparowano pod próżnią, pozostałość rozpuszczono w $\text{DMSO-}d_6$. W widmie $^1\text{H NMR}$ zaobserwowano 5 produktów: *N*-metylowaną sól ($[\text{TPT-NMe}_3]^+ \text{CF}_3\text{SO}_3^-$); *N*,10-*O*-dimetylowaną sól TPT, protonowany TPT ($[\text{TPT-NHMe}_2]^+ \text{CF}_3\text{SO}_3^-$), alkohol 23- CH_2OH a jednego produktu nie zidentyfikowano.¹¹² Sól ($[\text{TPT-NMe}_3]^+ \text{CF}_3\text{SO}_3^-$) otrzymano z wydajnością ok 50% .

Dane spektralne dla związku $[\text{TPT-NMe}_3]^+ \text{CF}_3\text{SO}_3^-$

LR-MS (ESI): m/z : 149 $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$, 422 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 436 $[\text{M}]^+$, 450 $[\text{M}]^+$.

$^1\text{H NMR}$ δ ($\text{DMSO-}d_6$): 0.86 (t, 3H, $J = 7 \text{ Hz}$, 19- CH_3), 1.84 (m, 2H, $J = 7 \text{ Hz}$, 18- CH_2), 3.10 (s, 9H, 22- Me_3N^+), 4.94 (s, 2H, 23- CH_2), 5.30 (s, 2H, 5- CH_2), 5.39 (s, 2H, 17- CH_2), 7.28 (s,



1H, 14-CH), 7.63 (d, 1H, J = 9 Hz, 11-CH), 8.23 (d, 1H, J = 9 Hz, 12-CH), 8.96 (s, 1H, 7-CH);

¹³C NMR δ (DMSO-*d*₆): 8.3 (19-CH₃), 30.7 (18-CH₂), 50.7 (5-CH₂), 53.2 (22-Me₃N⁺), 58.9 (23-CH₂), 65.7 (17-CH₂), 72.9 (20-C), 96.3 (14-CH), 107.3 (9-C), 118.6 (16-C), 122.9 (11-CH), 126.9 (7-CH), 130.7 (8-C), 131.4 (6-C), 134.5 (12-CH), 144.1 (13-C), 145.9 (3-C), 149.9 (2-C), 150.6 (15-C), 157.3 (16a-C(O)), 158.6 (10-C), 173.0 (21-C(O));

Oczyszczanie produktu czwartorzędowania TPT

Rozpuszczalnik (DMSO-*d*₆) odparowano pod próżnią. Pozostałość przemyto H₂O (5 x 1.0 ml), nierozpuszczalny w wodzie osad odsączono. Roztwór liofilizowano a następnie oczyszczono za pomocą HPLC na kolumnie RP-C18 LPH (150 mm x 10 mm) stosując układ fazy ciekłej: 10 % CH₃CN/ 90 % wodnego 0.1 % HCOOH przez 15 min a następnie układ: 20 % CH₃CN/ 80 % wodnego 0.1 % HCOOH z prędkością przepływu 3 ml/min. Przebieg chromatografii monitorowano za pomocą detekcji UV przy długości fali 260 nm. Zebraną frakcję (o czasie retencji 25 min), zawierającą dwa produkty liofilizowano. Otrzymano mieszaninę soli: [TPT-NHMe₂]⁺ HCOO⁻ oraz [TPT-NMe₃]⁺ HCOO⁻ w stosunku, odpowiednio, 3:1.

LR-MS (ESI): m/z 422 [M+H]⁺; 436 [M]⁺.

9.1.1 Oddziaływanie pochodnej TPT z oligomerem DNA

Alkilowanie DNA

Procedura dla soli [TPT-NMe₃]⁺ HCOO⁻

Roztwór d(GCGATCGC)₂ o stężeniu 0.33 mM w H₂O/D₂O (90/ 10 % v/v, 650 μl) o pH=7 dodano do mieszaniny soli [TPT-NHMe₂]⁺ HCOO⁻ oraz [TPT-NMe₃]⁺ HCOO⁻. Stężenie pochodnej [TPT-NMe₃]⁺ HCOO⁻ w roztworze wynosiło 0.99 mM (3 krotny nadmiar w stosunku do ds DNA). Przygotowany roztwór umieszczono w kwarcowej probówce NMR. Następnie naświetlano przez 1 godz. lampą UV przy długości fali λ=365 nm. Przebieg reakcji monitorowano za pomocą ¹H NMR. Wytrącony osad odsączono, a roztwór liofilizowano. Mieszaninę reakcyjną oczyszczono od nadmiaru niezwiązanej pochodnej TPT oraz nieaktywnego mrówczanu TPT za pomocą HPLC na kolumnie RP-C18 LPH (150 mm x 10 mm). Stosowano układ fazy ciekłej: 50 % CH₃OH/ 50 % H₂O z prędkością przepływu 3 ml/min. Przebieg chromatografii monitorowano za pomocą detekcji UV przy długości fali

260 nm. Zebrano frakcję o czasie retencji 3.4 min i liofilizowano. Na podstawie widma ^1H NMR otrzymano produkt alkilowania z wydajnością ok. 15-20 %.

MALDI MS: 2410 (ssDNA), 2787 (ssDNA + QM).

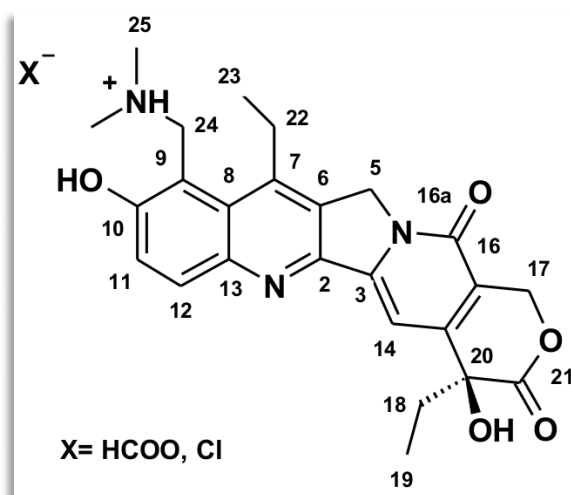
9.2 Pochodne SN38

SN38 (7-etylo-10-hydroksykamptotecynę x H_2O) zakupiono w firmie Tocris Bioscience (czystość 99.2 %).

9.2.1 Otrzymywanie pochodnych SN38

Pochodna SN-NMe₂:

(20 S)-7-etylo-9-[N-(N-dimetyloamino)]metylo-10-hydroksykamptotecyna.



SN38 (7-etylo-10-hydroksykamptotecynę x H_2O) (6.46 mg, 0.016 mmol) zawieszono w 6.5 ml CH_3CN , następnie dodano kwas octowy (202 μl , 3.53 mmol), 37 % wodny roztwór CH_2O (15.5 μl , 0.19 mmol), 40 % wodny roztwór dimetyloaminy (21.5 μl , 0.19 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze 72 °C. Po upływie 7 godz. dodano 15.5 μl (0.19 mmol) roztworu CH_2O oraz 21.5 μl (0.19 mmol)

roztworu dimetyloaminy. Reakcję zakończono po upływie 21 godz., rozpuszczalnik odparowano pod próżnią (w 40 °C). Pozostałość przemyto eterem dietylowym (3 x 1 ml). Mieszaninę reakcyjną oczyszczono za pomocą HPLC na kolumnie RP-C18 LPH (150 mm x 10 mm) stosując układ fazy ciekłej: 10 % CH_3CN / 90 % wodnego 0.1 % HCOOH przez 45 min a następnie układ: 30 % CH_3CN / 70 % wodnego 0.1 % HCOOH z prędkością przepływu 3 ml/min. Przebieg chromatografii monitorowano za pomocą detekcji UV przy długości fali 260 nm. Zebrano frakcję o czasie retencji 48 min i liofilizowano. Otrzymaną sól kwasu mrówkowego przekształcono w chlorowodorek dodając 3 ml 0.5 % roztworu HCl . Po zliofilizowaniu otrzymano produkt z wydajnością 28 %.

LR-MS (ESI): m/z 450 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR δ (D_2O , pH=5.5, TSPA) 500 MHz: 0.88 (t, J=7.3 Hz, 3H, 19- CH_3), 1.51 (t, J=7.7 Hz, 3H, 23- CH_3), 1.99 (m, 2H, 18- CH_2), 2.85 (s, 6H, 25- Me_2N^+), 3.25 (q, 2H, J=7.7 Hz 22-

CH₂), 4.86 (½ AB, d, J=14.3 Hz, 1H, 24-CH₂), 4.89 (½ AB, d, J=14.3 Hz, 1H, 24-CH₂), 5.20 (½ AB, d, J=18.7 Hz, 1H, 5-CH₂), 5.25 (½ AB d, J=18.7 Hz, 1H, 5-CH₂), 5.43 (½ AB, d, J=16.1 Hz, 1H, 17-CH₂), 5.60 (½ AB, d, J=16.1 Hz, 1H, 17-CH₂), 7.29 (s, 1H, 14-CH), 7.42 (d, J=9.2 Hz, 1H, 11-CH), 7.91 (d, J=9.2 Hz, 1H, 12-CH).

¹³C NMR δ (D₂O, TSPA) HSQC/HMBC : 7.2 (19-CH₃), 13.2 (23-CH₃), 26.4(22-CH₂), 30.8 (18-CH₂), 42.4 (25-Me₂N⁺), 50.5 (5-CH₂), 55.0 (24-CH₂), 66.0 (17CH₂-), 73.3 (20-C), 98.2 (14-C), 108.7 (9-C), 118.3 (16-C), 121.5 (11-CH), 127.8 (8-C), 130.9 (6-C), 133.3 (12-CH), 144.2 (7-C), 144.6 (13-C), 146.0 (3-C), 147.2 (2-C), 151.0(15-C), 157.5 (10-C), 174.8 (21-C(O)) 16a - C –nie przypisano

UV (H₂O) nm: 224, 267, 330, 379.

IR (KBr) cm⁻¹ : 1038, 1052, 1115, 1135, 1161, 1240, 1290, 1384, 1411, 1466, 1511, 1593, 1656, 1746, 2878, 2935, 2970, 3422.

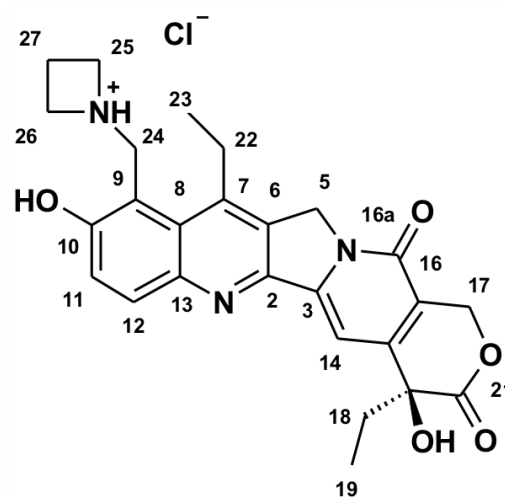
Pochodna **BN67A**:

(20 S)-7-etylo-9-N-azetyldynometylo-10-hydroksykamptocyna.

SN38 (7-etylo-10-hydroksykamptocynę x H₂O) (5.22 mg, 12.7 x 10⁻³ mmol) zawieszono w 5.5 ml CH₃CN, a następnie dodano 37 % wodny roztwór CH₂O (12.5 µl, 0.153 mmol), 98 % azetydynamy (9 µl, 0.153 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze 80 °C. Po upływie 10 min od momentu rozpuszczenia się substratu, rozpuszczalnik odparowano pod próżnią (w 40 °C). Następnie pozostałość przemyto eterem dietylowym (3 x 1 ml).

Mieszaninę oczyszczono za pomocą HPLC na kolumnie RP-C18 LPH (150 mm x 10 mm) stosując układ fazy ciekłej: 20 % CH₃CN/ 80 % wodnego 0.1 % HCOOH z prędkością przepływu 3 ml/min. Przebieg chromatografii monitorowano za pomocą detekcji UV przy długości fali 260 nm. Zebraną frakcję o czasie retencji 8.5 min liofilizowano a następnie przekształcono w chlorowoderek dodając 3 ml roztworu 0.5 % HCl. Ponownie liofilizowano uzyskując czysty produktu (> 98 %) z wydajnością 18 %.

HR-MS (ESI): obliczona dla C₂₆H₂₈N₃O₅, [M+H]⁺: 462.2029, zmierzona: 462.2036.



$^1\text{H NMR}$ δ (D_2O , $\text{pH}=4$, TSPA) 500 MHz: 0.98 (t, $J=7.3$ Hz, 3H, 19- CH_3), 1.42 (t, $J=7.3$ Hz, 3H, 23- CH_3), 2.01 (q, $J=7.3$ Hz, 2H, 18- CH_2), 2.42 (bs, 1H, 27- CH_2 , ax. lub eq.), 2.52 (m, 1H, 27- CH_2 , ax. lub eq.), 3.23 (q, $J=7.3$ Hz, 2H, 22- CH_2), 4.13 (bs, 2H, 25, 26- CH_2 , ax. lub eq.), 4.25 (m, 2H, 25, 26- CH_2 , ax. lub eq.), 5.01 ($1/2$ AB, d, $J=15.4$ Hz, 1H, 24- CH_2), 5.04 ($1/2$ AB, d, $J=15.4$ Hz, 1H, 24- CH_2), 5.37 (s, 2H, 5- CH_2), 5.47 ($1/2$ AB, d, $J=16.4$ Hz, 1H, 17- CH_2), 5.65 ($1/2$ AB, d, $J=16.4$ Hz, 1H, 17- CH_2), 7.53 (s, 1H, 14-CH), 7.57 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, 11- CH_2), 8.10 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, 12-CH).

$^{13}\text{C NMR}$ δ (D_2O , TSPA); HSQC/HMBC : 7.2 (19- CH_3), 13.3 (23- CH_3), 26.4 (22- CH_2), 30.6 (CH_2 -18), 50.7 (5- CH_2), 51.0 (24- CH_2), 54.81 (25,26- CH_2), 66.2 (17- CH_2), 98.6 (14-CH), 108.9 (9-C), 118.6 (16-C), 121.8 (11-CH), 127.8 (8-C), 131.3 (6-C), 133.4 (12-CH), 144.7 (7-C), 151.0 (15-C), 157.0 (10-C), 175.1 (21-C(O)). 2-C, 3-C, 13-C, 16a -C(O), 20-C, 27- CH_2 nie przypisano.

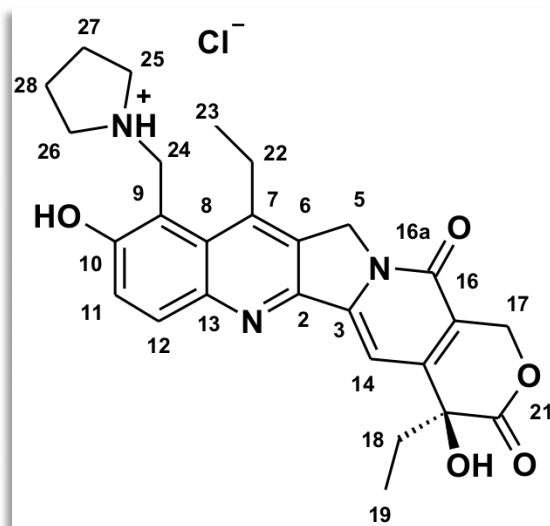
UV (H_2O) nm: 225, 268, 328, 379.

IR (film z CH_3CN) cm^{-1} : 1042, 1057, 1116, 1165, 1245, 1290, 1413, 1450, 1512, 1536, 1603, 1658, 1743, 2630, 2940, 2977, 3419.

Pochodna **BN49A**:

(20 S)-7-etylo-9-N-pirolidynometylo-10-hydroksykamptoteczyna.

SN38 (7-etylo-10-hydroksykamptoteczynę x H_2O) (4.63 mg, 11.3×10^{-3} mmol) zawieszono w 7 ml CH_3CN , a następnie dodano 37 % wodny roztwór CH_2O (11 μl , 0.136 mmol), pirolidynę (11 μl , 0.136 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze 80 $^\circ\text{C}$. Po upływie 1 godz. od momentu rozpuszczenia się substratu, odparowano rozpuszczalnik pod próżnią (w 40 $^\circ\text{C}$). Pozostałość przemyto eterem dietylowym (3 x 1 ml). Następnie mieszaninę oczyszczono za pomocą HPLC na kolumnie RP-C18 LPH (150 mm x 10 mm) stosując układ fazy ciekłej: 25 % CH_3CN / 75 % wodnego 0.1 % HCOOH z



prędkością przepływu 3 ml/min. Przebieg chromatografii monitorowano za pomocą detekcji UV przy długości fali 260 nm. Zebraną frakcję (czas retencji 3 min) liofilizowano a następnie

dodano 3 ml roztworu 0.5 % HCl i ponownie liofilizowano uzyskując czysty produktu (> 98 %) z wydajnością 24 %.

HR-MS (ESI): obliczona dla $C_{27}H_{30}N_3O_5$, $[M+H]^+$: 476.2185, zmierzona: 476.2190

1H NMR δ (D_2O , pH=3, TSPA) 500 MHz: 0.97 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, 19- CH_3), 1.47 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, 23- CH_3), 1.96 (bs 2H, 27,28- CH_2 , ax. lub eq.), 1.98 (m, 2H, 18- CH_2), 2.13 (bs, 2H, 27,28- CH_2 , ax. lub eq.), 3.22 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, 22- CH_2), 3.24 (m, 2H, 25,26- CH_2 , ax. lub eq.), 3.45 (m, 2H, 25,26- CH_2 , ax lub eq), 4.93 ($\frac{1}{2}$ AB, d, $J=14.3$ Hz, 1H, 24- CH_2), 4.97 ($\frac{1}{2}$ AB, d, $J=14.3$ Hz, 1H, 24- CH_2), 5.24 ($\frac{1}{2}$ AB, d, $J=18.7$ Hz, 1H, 5- CH_2), 5.29 ($\frac{1}{2}$ AB, d, $J=18.7$ Hz, 1H, 5- CH_2), 5.43 ($\frac{1}{2}$ AB, d, $J=16.1$ Hz, 1H, 17- CH_2), 5.61 ($\frac{1}{2}$ AB, d, $J=16.1$ Hz, 1H, 17- CH_2), 7.35 (s, 1H, 14-CH), 7.48 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, 11-CH), 7.97 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, 12-CH).

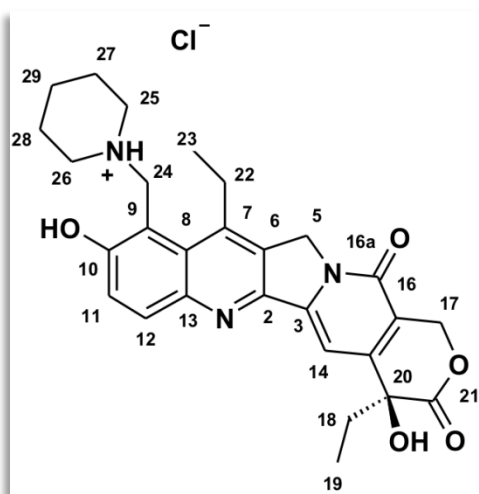
^{13}C NMR δ (D_2O , TSPA); HSQC/ HMBC : 7.1 (19- CH_3), 13.2 (23- CH_3), 22.5 (27,28- CH_2), 26.5 (22- CH_2), 30.6 (18- CH_2), 50.6 (5- CH_2), 51.3 (24- CH_2), 54.5 (25,26- CH_2), 66.0 (17- CH_2), 73.7 (20-C), 98.3 (14-CH), 109.5 (9-C), 118.4 (16-C), 121.3 (11-CH), 127.6 (8-C), 131.0 (6-C), 133.2 (12-CH), 144.6 (7-C), 144.8 (13-C), 146.1 (3-C), 148.1 (2-C), 151.0 (15-C), 156.8 (10-C), 158.2 (16a -C(O)), 174.9 (21-C(O)).

UV (H_2O) nm: 379, 329, 268, 225, 202.

IR (film z CH_3CN) cm^{-1} : 1040, 1056, 1115, 1164, 1234, 1254, 1284, 1346, 1392, 1413, 1458, 1513, 1537, 1593, 1658, 1743, 2723, 2940, 2975, 3387.

Pochodna **BN71A**:

(20 S)-7-etylo-9-N-piperydynometylo-10-hydroksykamptoteczyna



SN38 (7-etylo-10-hydroksykamptoteczynę x H_2O) (3.93 mg, 9.585×10^{-3} mmol) zawieszono w 4,2 ml CH_3CN , a następnie dodano kwas octowy (13.1 μ l, 0.23 mmol)), 37 % wodny roztwór CH_2O (9.3 μ l, 0.115 mmol), piperydynę (11.3 μ l, 0.115 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze 80 $^{\circ}C$. Po upływie 5.5 godz. rozpuszczalnik odparowano pod próżnią (w 40 $^{\circ}C$). Otrzymaną pozostałość przemyto eterem dietylowym (3 x 1 ml). Następnie mieszaninę

oczyszczono za pomocą HPLC na kolumnie RP-C18 LPH (150 mm x 10 mm) stosując układ fazy ciekłej: 25 % CH_3CN / 75 % wodnego 0.1 % $HCOOH$ z prędkością przepływu 3 ml/min.

Przebieg chromatografii monitorowano za pomocą detekcji UV przy długości fali 260 nm. Zebraną frakcję (czas retencji 4.3 min) liofilizowano a następnie dodano 3 ml roztworu 0.5 % HCl i ponownie liofilizowano uzyskując czysty produktu (> 98 %) z wydajnością 30 %.

HR-MS (ESI): obliczona dla $C_{28}H_{32}N_3O_6$, $[M+H]^+$: 490.2342, zmierzona: 490.2352.

1H NMR δ (D_2O , pH=4, TSPA) 500 MHz: 1.00 (t, J=7.3 Hz, 3H, 19-CH₃), 1.50 (t, J=7.7 Hz, 3H, 23-CH₃), 1.69 (m, 2H, 27, 28-CH₂, ax.), 1.77 (m, 2H, 29-CH₂), 1.88 (m, 2H, 27,28-CH₂, eq.), 2.00 (m, 2H, 18-CH₂), 3.15 (m, 2H, 25, 26-CH₂, ax.), 3.26 (q, J=7.7 Hz, 2H, 22-CH₂), 3.42 (bd, 2H, 25,26-CH₂, eq.), 4.85 ($\frac{1}{2}$ AB, d, J=14.3 Hz, 1H, 24-CH₂), 4.90 ($\frac{1}{2}$ AB, d, J=14.3 Hz, 1H, 24-CH₂), 5.26 ($\frac{1}{2}$ AB, d, J=18.7 Hz, 1H, 5-CH₂), 5.31 ($\frac{1}{2}$ AB, d, J=18.7 Hz, 1H, 5-CH₂), 5.45 ($\frac{1}{2}$ AB, d, J=16.1 Hz, 1H, 17-CH₂), 5.63 ($\frac{1}{2}$ AB, d, J=16.1 Hz, 1H, 17-CH₂), 7.33 (s, 1H, 14-CH), 7.46 (d, J=9.2 Hz, 1H, 11-CH), 7.95 (d, J=9.2 Hz, 1H, 12-CH).

^{13}C NMR δ (D_2O , TSPA); HSQC/HMBC : 7.2 (19-CH₃), 13.3 (23-CH₃), 20.7 (29-CH₂), 22.6 (27,28-CH₂), 26.5 (22-CH₂), 30.7 (18-CH₂), 50.6 (5-CH₂), 53.4 (25,26-CH₂), 53.7 (24-CH₂), 66.0 (17-CH₂), 73.9 (20-C), 98.3 (14-CH), 108.3 (9-C), 118.5 (16C-), 121.3 (11-CH), 127.9 (8-C), 131.0 (6-C), 133.3 (12-CH), 144.7 (7-C), 146.1 (3-C), 146.1 (13-C), 148.1 (2-C), 151.0 (15-C), 157.4 (10-C), 158.3 (16a-C(O)), 174.9 (21-C(O)).

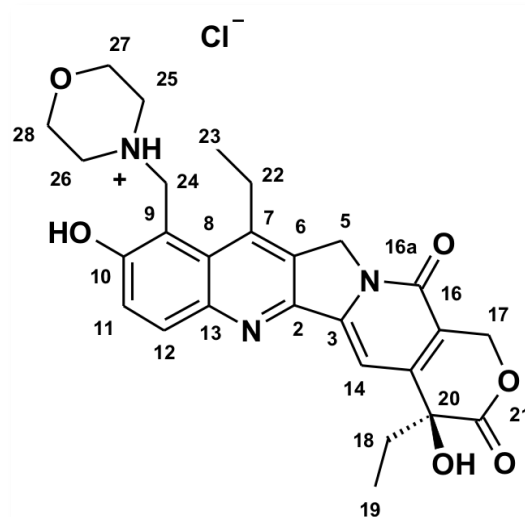
UV (H_2O) nm: 378, 329, 268, 225, 202.

IR (film z CH_3CN) cm^{-1} : 1042, 1056, 1117, 1163, 1232, 1255, 1290, 1350, 1388, 1413, 1454, 1512, 1537, 1605, 1657, 1743, 2877, 2945, 3060, 3408.

Pochodna **BN37A**:

(20 S)-7-etylo-9-N-morfolinometylo-10-hydroksykamptotecyna.

SN38 (7-etylo-10-hydroksykamptotecynę x H_2O) (5.92 mg; 0.0144 mmol) zawieszono w 5.5 ml CH_3CN , a następnie dodano kwas octowy (183 μ l, 3.2 mmol), 37 % wodny roztwór CH_2O (14 μ l; 0.173 mmol), 15 μ l morfoliny (0.173 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze 80 °C. Po upływie 10 godz. rozpuszczalnik odparowano pod próżnią (w 40 °C). Pozostałość przemyto eterem dietylowym (3 x 1 ml). Mieszaninę reakcyjną oczyszczono za pomocą HPLC na



kolumnie RP-C18 LPH (150 mm x 10 mm) stosując układ fazy ciekłej: 20 % CH₃CN/ 80 % wodnego 0.1 % HCOOH z prędkością przepływu 3 ml/min. Przebieg chromatografii monitorowano za pomocą detekcji UV przy długości fali 260 nm. Zebraną frakcję o czas retencji 7.5 min liofilizowano a następnie przekształcono w chlorowodorek rozpuszczając produkt w 3 ml 0.5 % HCl. Po zliofilizowaniu uzyskano czysty produkt (> 98 %) z wydajnością 24 %.

HR-MS (ESI): obliczona dla C₂₇H₃₀N₃O₆, [M+H]⁺: 492.2135, zmierzona: 492.2145.

¹H NMR δ (D₂O, pH=3, TSPA) 500 MHz: 0.98 (t, J=7.34 Hz, 3H, 19-CH₃), 1.49 (t, J=7.7 Hz, 3H, 23-CH₃), 1.99 (m, 2H, 18-CH₂), 3.24 (q, J=7.7 Hz, 2H, 22-CH₂), 3.41 (bs, 4H, 25,26-CH₂), 3.76 (bs, 2H, 27,28-CH₂, ax. lub eq.), 4.05 (bs, 2H, 27,28-CH₂, ax. lub eq.), 4.94 (½ AB, J=14.6 Hz, 1H, 24-CH₂), 5.00 (½ AB, J= 14.6 Hz, 1H, 24-CH₂), 5.27 (½ AB, J=19.1 Hz, 1H, 5-CH₂), 5.31 (½ AB, J=19.1 Hz, 1H, 5-CH₂), 5.44 (½ AB, J=15.9 Hz, 1H, 17-CH₂), 5.62 (½ AB, J=15.9 Hz, 1H, 17-CH₂), 7.33 (s, 1H, 14-CH), 7.45 (d, J=9.2Hz, 1H, 11-CH), 7.96 (d, J=9.2 Hz, 1H, 12-CH).

¹³C NMR δ (D₂O, TSPA); HSQC/HMBC: 7.1 (19-CH₃), 13.2 (23-CH₃), 26.4 (22-CH₂), 30.6 (18-CH₂), 50.7 (5-CH₂), 51.8 (25,26C-H₂), 53.9 (24-CH₂), 63.4 (27,28-CH₂), 66.0 (17-CH₂), 73.6 (20-C), 98.2 (14-CH), 107.2 (9-C), 118.5 (16-C), 121.2 (11-CH), 128.0 (8-C), 131.2 (6-C), 133.5 (12-CH), 142.8 (2 -C), 144.8 (7-C), 145.0 (13-C), 146.1 (3-C), 150.9 (15-C), 157.9 (10-C), 158.3 (16a -C(O)), 175.1 (21- C (O)).

UV (H₂O) nm: 202, 224, 268, 329, 366, 378.

IR (KBr) cm⁻¹: 1038, 1056, 1108, 1162, 1261, 1303, 1383, 1423, 1463, 1513, 1593, 1656, 1744, 2853, 2922, 2958, 3401.

Pochodna **BN74A**:

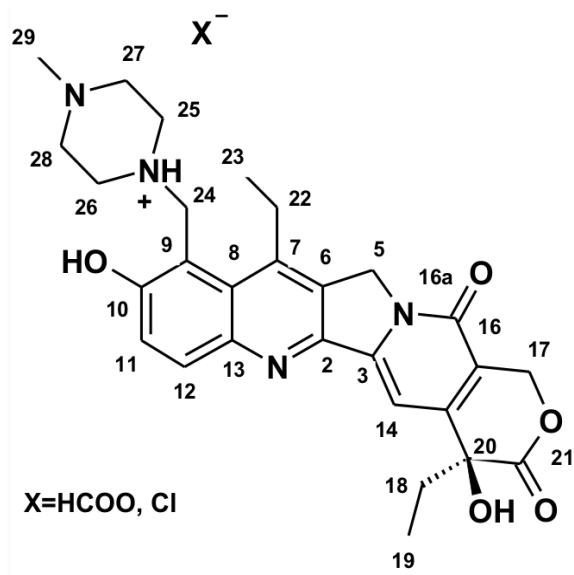
(20 S)-7-etylo-9-[N-(N-metylopiperazyno)]metylo-10-hydroksykamptotecyna.

SN38 (7-etylo-10-hydroksykamptotecynę x H₂O) (3.99 mg, 9.7 x 10⁻³ mmol) zawieszono w 5.1 ml CH₃CN, a następnie dodano kwas octowy (14 µl, 0.234 mmol), 37 % wodny roztwór CH₂O (9.5 µl, 0.117 mmol), metylopiperazynę (13 µl, 0.117 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze 80 °C. Po upływie 6 godz. rozpuszczalnik odparowano pod próżnią (w 40 °C). Następnie pozostałość przemyto eterem dietylowym (3 x 1 ml). Mieszaninę oczyszczono za pomocą HPLC na kolumnie RP-C18 LPH (150 mm x 10 mm) stosując układ fazy ciekłej: 25 % CH₃CN/ 75 % wodnego 0.1 % HCOOH z prędkością przepływu 3 ml/min. Przebieg

chromatografii monitorowano za pomocą detekcji UV przy długości fali 260 nm. Zebraną frakcję (czas retencji 4 min) liofilizowano. Otrzymaną sól kwasu mrówkowego przekształcono w chlorowoderek dodając 3 ml roztworu 0.5 % HCl. Ponownie liofilizowano uzyskując czysty produktu (> 98 %) z wydajnością 24 %.

HR-MS (ESI): obliczona dla $C_{28}H_{33}N_4O_5$, $[M+H]^+$: 505.2451, zmierzona: 505.2457.

1H NMR δ (D_2O , pH=5, TSPA) 500 MHz: 1.00 (t, $J=7.3$ Hz, 3H, 19- CH_3), 1.46 (t, $J=7.7$ Hz, 3H, 23- CH_3), 2.00 (m, 2H, 18- CH_2), 2.73 (s, 3H, 29- CH_3), 3.14 (m, 1H, 22- CH_2), 3.23 (bs, 4 H, 27,28- CH_2), 3.24 (m, 1H, 22- CH_2), 3.43 (bs, 4H, 25,26- CH_2), 4.85 ($\frac{1}{2}$ AB, d, $J=19.0$ Hz, 1H, 5- CH_2), 4.92 ($\frac{1}{2}$ AB, d, $J=19.0$ Hz, 1H, 5- CH_2), 4.94 ($\frac{1}{2}$ AB, d, $J=12.5$ Hz, 1H, 24- CH_2), 4.98 ($\frac{1}{2}$ AB, d, $J=12.5$ Hz, 1H, 24- CH_2), 5.41 ($\frac{1}{2}$ AB, d, $J=16.1$ Hz, 1H, 17- CH_2), 5.55 ($\frac{1}{2}$ AB, d, $J=16.1$ Hz, 1H, 17- CH_2), 7.25 (s, 1H, 14-CH), 7.26 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, 11-CH), 7.60 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, 12-CH).



^{13}C NMR δ (D_2O , TSPA) : 7.2 (19- CH_3), 13.8 (23- CH_3), 24.9 (22- CH_2), 30.7 (18- CH_2), 42.0 (25,26- CH_2), 43.8 (29- CH_3), 50.1 (5- CH_2), 50.7 (27,28- CH_2), 55.2 (24- CH_2), 66.0 (17- CH_2), 73.7 (20-C), 98.1 (14-C), 118.0 (16-C), 121.7 (11-CH), 130.9 (12-CH), 145.9 (7-C), 151.2 (15-C), 174.8 (21-C(O)). 2-C, 3-C, 8-C, 9-C, 10-C-nie przypisano

UV nm: 378, 330, 269, 224.

IR (film z CH_3CN) cm^{-1} : 1040, 1057, 1116, 1165, 1233, 1258, 1282, 1388, 1413, 1458, 1513, 1537, 1592, 1656, 1740, 2940, 2977, 3410.

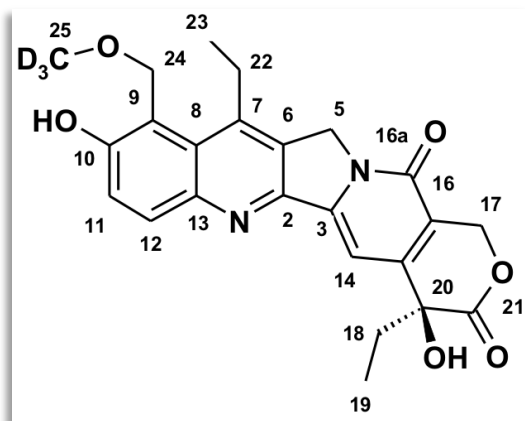
Eterowa pochodna SN38 (24- CH_2 -OCD₃)

(20 S)-7-etylo-9-(trideuterometoksy)metylo-10-hydroksykamptotecyna.

Chlorowoderek 7-etylo-9-[N-(N-metylopiperazyno)]metylo-10-hydroksykamptotecyny (SNB74A) (0.5 mg, 9.25×10^{-4} mmol) rozpuszczono w CD_3OD (0.6 ml). Po 3 dniach reakcji produkt został zidentyfikowany jako eter $C_{24}H_{22}D_3N_2O_6$.

LR-MS (ESI): m/z 440 [M+H]⁺

¹H NMR δ (CD₃OD) 500 MHz: 1.01 (t, J=7.4 Hz, 3H, 19-CH₃), 1.43 (t, J=7.6 Hz, 3H, 22-CH₃), 1.97 (m, 2H, 18-CH₂), 3.42 (q, J=7.6 Hz, 2H, 22-CH₂), 5.01 (s, 2H, 24-CH₂), 5.36 (s, 2H, 5-CH₂), 5.40 (½ AB d, J=16.1 Hz, 1H, 17-CH₂), 5.60 (½ AB, d, J=16.1 Hz, 1H, 17-CH₂), 7.63 (s, 1H, 14-CH), 7.51 (d, J=9.2 Hz, 1H, 11-CH), 8.07 (d, J=9.2 Hz, 1H, 12-CH).



¹³C NMR δ (CD₃OD) : 7.0 (19-CH₃), 14.2 (23-CH₃), 24.8 (22-CH₂), 30.8 (18-CH₂), 50.2 (5-CH₂), 55.9 (25-CD₃), 65.4 (17-CH₂), 64.6 (24-CH₂), 73.0 (20-C), 98.1 (14-CH), 116.0 (9-C), 118.7 (16-C), 122.0 (11-CH), 128.9 (8-C), 130.8 (6-C), 131.4 (12-CH), 145.2 (13-C), 146.3 (3-C), 146.7 (7-C), 147.8 (2-C), 151.4 (15-C), 157.1 (10-C), 173.6 (21-C(O)). 16a -C(O) - nie przypisano.

9.2.2 Oddziaływanie pochodnych SN38 z oktamerem DNA

Badanie oddziaływań wszystkich pochodnych SN 38 z oligomerem DNA prowadzono według ogólnej procedury **1** (eksperymenty w temperaturze pokojowej oraz w 10 °C).

Procedura 1

Oktamer d(GCGATCGC)₂ rozpuszczono w 600-700 μ l buforu 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ w H₂O/D₂O (90/10 % v) o pH=6. Roztwór dodano do soli pochodnych SN38. Stosunek stężenia dupleksu oligomeru DNA (ds DNA) i pochodnych SN38 w roztworze wynosiło, odpowiednio: 1:2 (pH=6).

Oddziaływanie pochodnej SN-NMe₂

Temperatura pokojowa: stężenie dupleksu DNA wynosiło C= 0.31 mM (1.04 mg, 2.17 x 10⁻⁴ mmol), stężenie mrówczanu SN-NMe₂ C=0.62 mM (0.21 mg, 4.34 x 10⁻⁴ mmol). Objętość roztworu buforu V=700 μ l.

Oddziaływanie pochodnej BN67A

Temperatura pokojowa: Stężenie dupleksu DNA wynosiło 0.65 mM (2.0 mg, 4.2 x 10⁻⁴ mmol), stężenie chlorowodoru BN67A C=1.3 mM (0.42 mg, 8.4 x 10⁻⁴ mmol). Objętość roztworu buforu V=650 μ l.

Temperatura 10 °C: stężenie ds DNA wynosiło 0.73 mM (2.28 mg, 9.46×10^{-4}), stężenie chlorowodoru BN67A wynosiło 1.45 mM (0.47 mg, 9.45×10^{-4} mmol). Objętość roztworu buforu V=650 μ l.

Oddziaływanie pochodnej BN49A

Temperatura pokojowa: Stężenie dupleksu DNA wynosiło 0.38 mM (1.1 mg, 2.28×10^{-4} mmol), stężenie chlorowodoru BN49A C=0.76 mM (0.24 mg, 4.56×10^{-4} mmol). Objętość roztworu buforu V=600 μ l.

Temperatura 10 °C: stężenie ds DNA wynosiło 1.25 mM (3.9 mg, 0.81×10^{-3}), stężenie chlorowodoru BN49A wynosiło 2.5 mM (0.83 mg, 1.62×10^{-3} mmol). Objętość roztworu buforu V=650 μ l.

Oddziaływania pochodnej BN71A

Temperatura pokojowa: Stężenie dupleksu DNA wynosiło 0.45 mM (1.32 mg, 2.7×10^{-4} mmol), stężenie chlorowodoru BN71A C=0.89 mM (0.28 mg, 5.33×10^{-4} mmol). Objętość roztworu buforu V=600 μ l.

Temperatura 10 °C: stężenie ds DNA wynosiło 0.75 mM (2.34 mg, 4.85×10^{-4}), stężenie chlorowodoru BN71A wynosiło 1.5 mM (0.51 mg, 9.7×10^{-4} mmol). Objętość roztworu buforu V=650 μ l.

Oddziaływania pochodnej BN37A

Temperatura pokojowa: stężenie dupleksu DNA wynosiło C=1.0 mM (3.13 mg, 6.5×10^{-4} mmol), stężenie chlorowodoru BN37A C=1.98 mM (0.64 mg, 1.29×10^{-3} mmol). Objętość roztworu buforu V=650 μ l.

Temperatura 10 °C: stężenie dupleksu DNA wynosiło C=0.44 mM (1.27 mg, 2.64×10^{-4} mmol), stężenie chlorowodoru BN37A C=0.88 mM (0.28 mg, 5.28×10^{-4} mmol). Objętość roztworu buforu V=600 μ l.

Mieszaninę reakcyjną oczyszczano za pomocą HPLC na kolumnie RP-C18 LPH (150 mm x 10 mm) stosując układy fazy ciekłej: wodny roztwór 90 mM TEAA o pH=5.5 (A) oraz CH₃CN (B). Zastosowano gradient: 0-30 min 10 \rightarrow 35 % B, 30 min 35 % B, prędkość przepływu wynosiła 2.6 ml/min. Przebieg chromatografii monitorowano za pomocą detekcji UV przy długości fali 260 nm. Zebraną frakcję o czasie retencji 13 min liofilizowano. Bufor usunięto na kolumnie Sephadex G-10.

Oddziaływanie pochodnej BN74A

Temperatura 10 °C: stężenie ds DNA wynosiło 0.59 mM (1.87 mg, 3.88×10^{-4}), stężenie chlorowodoru BN74A wynosiło 1.19 mM (0.42 mg, 7.77×10^{-4} mmol). Objętość roztworu buforu V=650 μ l.

9.2.3 Alkilowanie 2'-deoksyguanozyny

Addukt **N2-dG**, produkt alkilowania 2'-deoksyguanozyny przez pochodną SN38 (**BN37A**) otrzymano według następujących procedur:

Procedura 2

2'-deoksyguanozynę (dG) x H₂O (0.65 mg, 2.25×10^{-3} mmol) rozpuszczono w 2.25 ml buforu 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ o pH=7 (roztwór buforu w D₂O), następnie dodano chlorowodorek 7-etylo-9-(N-morfolino)metylo-10-kamptotecyny (2.37 mg, 4.5×10^{-3} mmol). Stężenie dG i pochodnej SN38 w roztworze wynosiło odpowiednio 1.0 mM i 2.0 mM (pH=7). Postęp reakcji monitorowano przy pomocy technik ¹H NMR oraz LC-MS. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej, zakończono po upływie 48 godz.. Osad odwirowano i oczyszczano za pomocą HPLC na kolumnie RP-C18 LPH (150 mm x 10 mm) stosując układy fazy ciekłej: wodny roztwór 10 mM CH₃COONH₄ o pH=5.4 (A) oraz CH₃CN (B). Zastosowano gradient: 0-30 min 10 → 35 % B, 30 min 35 % B, prędkość przepływu wynosiła 2.8 ml/min. Przebieg chromatografii monitorowano za pomocą detekcji UV przy długości fali 260 nm. Zebrany produkt reakcji liofilizowano, addukt N2-dG otrzymano z wydajnością 10 %.

Procedura 3

2'-deoksyguanozynę (dG) x H₂O (1.07 mg, 3.76×10^{-3} mmol) rozpuszczono w 3.76 ml D₂O o pH=6, następnie dodano chlorowodorek 7-etylo-9-(N-morfolino)metylo-10-kamptotecyny (3.97 mg, 7.14×10^{-3} mmol). Stężenie dG i pochodnej SN38 w roztworze wynosiło odpowiednio 1.0 mM i 2.0 mM (pH roztworu doprowadzono do pH=6 przy użyciu 5 % roztworu NaOD). Postęp reakcji monitorowano przy pomocy technik ¹H NMR oraz LC-MS. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej i zakończono po upływie 24 godz.. Osad odwirowano i oczyszczano za pomocą HPLC na kolumnie RP-C18 LPH (150 mm x 10 mm) stosując układy fazy ciekłej: wodny roztwór 10 mM CH₃COONH₄ o pH=5.4 (A) oraz CH₃CN (B). Użyto gradientu: 0-30 min 10 → 35 % B, 30 min 35 % B, prędkość przepływu wynosiła 2.8 ml/min. Przebieg chromatografii monitorowano za pomocą detekcji UV przy długości fali

260 nm. Zebrano produkt reakcji i liofilizowano. Addukt N2-dG otrzymano z wydajnością 7 %.

HR-MS (ESI): obliczona dla $C_{33}H_{32}N_7O_9$ $[M-H]^-$: 670.2262, zmierzona 670.2255.

1H NMR δ (DMSO-

d_6) 500 MHz: 0.86 (t,

$J=7.3$ Hz, 3H, 19-

CH_3), 1.40 (t, $J=7.3$

Hz, 3H, 23- CH_3), 1.85

(m, 2H, 18- CH_2),

2.25 (m, 1H, CH-2'),

2.66 (m, 1H, CH-2''),

3.23 (m, 2H, 22- CH_2),

3.52 (m, 1H, CH-5'), 3.59 (m, 1H, CH-5''), 3.83 (m, 1H, CH-4'), 4.39 (m, 1H, CH-3'), 4.91

(bs, 2H, 24- CH_2), 4.91 (bs, 1H, OH-5'), 5.30 (s, 2H, 5- CH_2), 5.31 (s, 1H, OH-3'), 5.40 (s, 2H,

17- CH_2), 6.23 (t, $J=7.1$ Hz, 1H, CH-1'), 6.48 (s, 1H, 20-OH), 6.68 (bs, 1H, NH-2G), 7.23 (s,

1H, 14-CH), 7.58 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, 11-CH), 7.95 (s, 1H, CH-8G), 8.08 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, 12-

CH), 10.23 (s, 1H, 10-OH), 10.77 (bs, 1H, NH-1G).

^{13}C NMR δ (DMSO- d_6) 500 MHz; HSQC/ HMBC : 8.9 (19- CH_3), 15.4 (23- CH_3), 25.5 (22-

CH_2), 30.9 (18- CH_2), 38.2 (24- CH_2), 39.9 (CH $_2$ -2'/2''), 50.6 (5- CH_2), 62.6 (CH $_2$ -5'/5''), 65.8

(17- CH_2), 71.5 (CH-3'), 72.9 (20-C), 83.8 (CH-1'), 88.3 (CH-4'), 96.5 (14-CH), 117.5 (C-

5G), 118.7 (16-C), 120.3 (8-C), 122.2 (11-CH), 131.4 (6-C), 133.2 (12-CH), 136.8 (CH-8G),

144.4 (7-C), 145.8 (13-C), 146.8 (3-C), 150.7 (15-C), 148.9 (2-C), 150.8 (C-4G), 157.1 (10-

C), 157.4 (16a-C(O)), 173.2 (21-C(O)).

UV (DMSO) nm: 271.3, 337.2, 371.2, 389.5, 452.1.

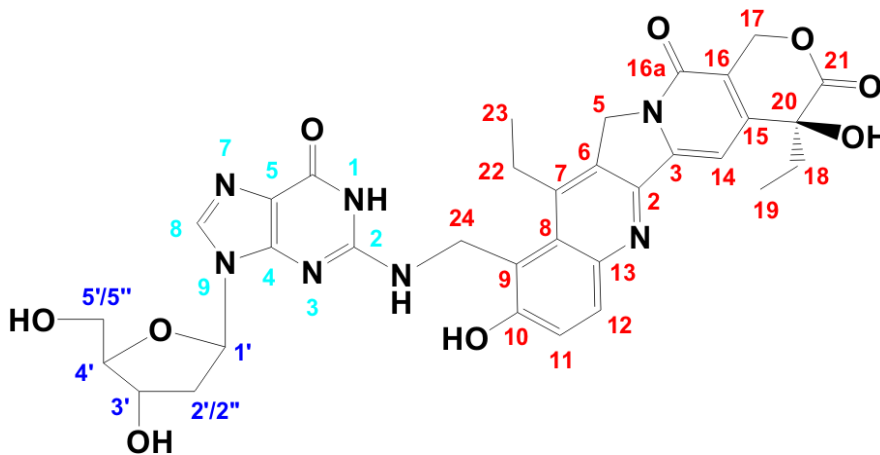
IR (DMSO- d_4 , BaF $_2$, $d=99,8$ μm) cm^{-1} : 991, 939, 964, 1154, 1181, 1295, 1462, 1604, 1663,

1873, 2016, 2159, 2540, 2562, 3232, 3384, 3545.

9.3 Oligomery DNA

Stosowano oligonukleotydy DNA :

- Oktamer: d(5'-GCGATCGC-3') $_2$;



Oczyszczanie oligomerów DNA

Wszystkie oligomery DNA (zakupione w firmie IDT USA, odblokowane i odsolone) oczyszczano techniką chromatografii jonowymiennej na kolumnie HiTrapTM-Q (Pharmacia Biotech), stosowano gradientową elucję roztworami NH₄HCO₃ o stężeniach od 0.1 do 1 M. Oligomery DNA następnie odsalano na kolumnie Sephadex G-10. Paramagnetyczne zanieczyszczenia usuwano stosując Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories).

9.4 Aparatura

Eksperymenty NMR

- Varian INOVA 500 MHz wyposażony w sondę ID, Narodowy Instytut Leków, Warszawa.

Pomiary MS

- LCMS-IT-TOF Shimadzu, spektrometr z pułapką jonową i analizatorem czasu przelotu, Uniwersytet Warszawski, Warszawa;
- HPLC Prominence LC-20A (Shimadzu) sprzężony z spektrometrem masowym 4000 QTrap, Applied Biosystems (pomiary LC/MS), ICHO PAN, Warszawa;
- MALDI Synapt G2-S HDMS (Waters Inc) z jonizacją typu elektrospray i analizatorem typu q-TOF, ICHO PAN, Warszawa;
- Voyager-Elite MALDI, PerSeptive Biosystems, CBMiM PAN, Łódź.

Widma UV

- Varian CARY 1E

Widma IR

- JASCO FT/IR-6200

HPLC

- chromatograf Shimadzu LC-8A sprzężony z detektorem UV Shimadzu SPD -6A, oprogramowanie ChromaX 2007 ver 1.0b;
- chromatograf Knauer 64 sprzężony detektorem UV (Knauer), oprogramowanie LP-chrom, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny, Siedlce.

9.5 Eksperymenty NMR

W celu wykonania widm NMR, próbki rozpuszczano w następujących układach: D₂O, H₂O/D₂O (90/10 % v), w roztworach buforowych 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ w D₂O lub H₂O/D₂O (90/10 % v) o pH równym 6 lub 7, DMSO-*d*₆ oraz CD₃OD-*d*₄. Jako wzorce wewnętrzne stosowano TSPA-*d*₄ (0.0 ppm), DMSO-*d*₆ (2.49 ppm) oraz CD₃OD-*d*₄ (3.31 ppm). Widma rejestrowano w temperaturze 25 °C oraz w 10 °C.

¹H NMR

Widma na spektrometrze Varian 500 MHz rejestrowano przy $\text{sw} = 12$ kHz, wykorzystując technikę dpfgse_water (excitation sculpting)¹¹³ do wygaszenia wody dla roztworów H₂O/D₂O (90/10 % v) oraz standardową metodę presaturacji dla próbek w D₂O.

NOESY

Widma NOESY¹¹⁴ zarejestrowano jako DPGFSE NOESY z tłumieniem wody z użyciem gradientu^{113, 115} i wyeliminowanie artefaktów ZQ podczas mieszania (ZQ artifact suppression during mixing)¹¹⁶, stosowano metodę States-TPPI^{117, 118} (czas mieszania 200 ms).

TOCSY

Widma TOCSY^{119, 120} zarejestrowano jako WGTOCSY z selektywnym impulsem „one-lob sinc” i procedurą ‘flipback’. Czas mieszania wynosił 90 ms z DIPSI-2-spin-lock field 8 kHz.

¹H/¹³C-HSQCAD

Widma ¹H/¹³C-HSQCAD¹²¹ otrzymywano jako “echo-antiecho phase sensitive” ¹H-¹³C HSQC (heteronuclear single quantum coherence, adiabatic version) stosując zwłokę relaksacyjną (ang. *relaxation delay*) $d1 = 1.2$ s oraz stałą sprzężenia $^1J(C,H) = 135$ Hz.

¹H/¹³C-HMBC

Widma ¹H - ¹³C HMBC zarejestrowano z wybranym gradientem przy następujących parametrach: $t_{at} = 0.2$ s, ¹H $pw90^\circ = 7.8$ μ s, ¹³C $pw90^\circ = 11.5$ μ s, $sw = 5$ kHz i 2048 punktów pomiarowych w wymiarze ¹H oraz 25 kHz i 1024 inkrementów w wymiarze ¹³C, $d1 = 1.2$ s. Dane otrzymano w wartościach bezwzględnych, z 64 powtórzeniami na inkrement t_1 . Eksperyment zoptymalizowano na stałą sprzężenia $^nJ(C,H) = 8$ Hz oraz filtr dolnoprzepustowy dla $^1J(C,H) = 140$ Hz. Przed transformacją Fouriera dane zostały liniowo uzupełnione do 2048 punktów, zastosowano też procedurę uzupełniania zerami do 4096 punktów w domenie F₁.

PFGSE

Widma ^1H DOSY otrzymano z wykorzystaniem sekwencji Oneshot¹²² (stimulated echo sequence incorporating bipolar gradients) stosując 64-128 powtórzeń, 16 pustych skanów. Czas dyfuzji (Δ) wynosił 150 ms, całkowity czas trwania gradientu dyfuzji (δ) wynosił 2 ms. Użyto szesnastu wartości gradientu dyfuzji, wzrastających od 1,9 do 50,4 G / cm, gdzie kolejna wartość gradientu była równa kwadratowi poprzedniej wartości gradientu. Pozostałe parametry wynosiły: okno spektralne 8 kHz dla H_2O , 16 K punkty pomiarowe, $d_1=2\text{s}$. Do obróbki danych stosowano program DOSY z pakietu Variana VNMRJ 3.1.

Widma NMR opracowano na programach:

1. oprogramowanie VNMRJ 3.1 Varian
2. Mestre-C 3.3a
3. MestReNova 6.0.4-5850
4. Sparky 3.111

9.6 Eksperymenty MS

MALDI

Widma mas MALDI (jony ujemne) rejestrowano na Voyager-elite (Perseptive Biosystems Inc., Framingham, MA, USA) wyposażonym w laser azotowy (337 nm) o napięciu liniowym 20 kV, z opóźnieniem ekstrakcji. Użyto roztworów kwasu 3-hydroksypikolinowego oraz cytrynianu diamonu (8:1 v / v) jako matrycy. Jeden μl roztworu oligonukleotydu o stężeniu 0,01 OD / μl zmieszano na płytce MALDI z 1 μl roztworu matrycy i pozostawiono do wyschnięcia na powietrzu. Widmo masowe zbierano z co najmniej 100 impulsów lasera i przetwarzano przez oprogramowanie Data Explorer ver. 4 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Technika MALDI –TOF otrzymano masy m/z z dokładnością wyższą niż 0.1 % ($t_j \pm 1$ masa jednostki na 1000 [M 1]⁻).

LC-MS

Pomiar prowadzono przy użyciu HPLC Prominence LC-20 (Shimadzu) sprzężonym ze spektrometrem 4000 QTrap. Stosowano kolumnę 5 μm Eclipse XDB C18, 4.6 x 250 mm (firmy Agilent). Do rozdzielania mieszaniny użyto układów fazy ciekłej: wodny roztwór 10mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ o pH 5.4 (A) oraz CH_3CN (B) z gradientem: 0-30 min 10 \rightarrow 40 % B, 30-35

min 40 % B. Prędkość przepływu wynosiła 1.0 ml/min. Analizę wykonano przy 254 nm oraz 260 nm. Widmo ESI MS rejestrowano w trybie jon dodatni i ujemny w zakresie m/z 100-1000. Parametry źródła określono w sposób następujący: IS 4500 V, 80 V DP, EP 10 V, CUR: 25, GS1 55 GS2 45. Temperatura źródła wynosiła 500 °C.

9.7 Badania biologiczne

Badania biologiczne zostały wykonane przez K. Wiktorską i K. Lubelską w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie (zakład Biologii Komórki, pracownia mikroskopii konfokalnej).

Hodowla komórek

Komórki L1210, CaCo2, HT-29, CRL1790, MCF7, MDA, HL60, A549 hodowane były w zubożonych pożywkach hodowlanych zgodnie z zaleceniami ATCC (Amerykański Bank Komórek). Hodowlę komórek prowadzono w butelkach do hodowli komórek o powierzchni 25 cm². Po osiągnięciu 80 % konfluencji komórki były pasażowane. W tym celu odklejano je od podłoża poprzez inkubację z 0.25 % trypsyną z EDTA w 37 °C, a następnie komórki rozcieńczano pożywką hodowlaną.

W celu zapewnienia optymalnych warunków wzrostu komórki hodowane były w inkubatorze do hodowli komórek w temperaturze 37 °C oraz atmosferze 5 % CO₂.

Badanie cytotoksyczności

Cytotoksyczny wpływ związków na badane linie komórkowe określono za pomocą kolorymetrycznego testu MTT. Test ten oparty jest na zdolności redukcji pomarańczowo-żółtej rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromku 3-(4,5-dimetylotiazyl-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowego, MTT) przez enzymy z klasy dehydrogenaz mitochondrialnych, które wchodzi w skład łańcucha oddechowego. Powstały w wyniku tej reakcji formazan, wytrąca się w komórkach w postaci nierozpuszczalnych w wodzie, fioletowych kryształów. Ponieważ dehydrogenazy mitochondrialne są aktywne tylko w żywych komórkach, ilość formazanu jest miarą ilości żywych komórek w hodowli.¹²³

Test MTT

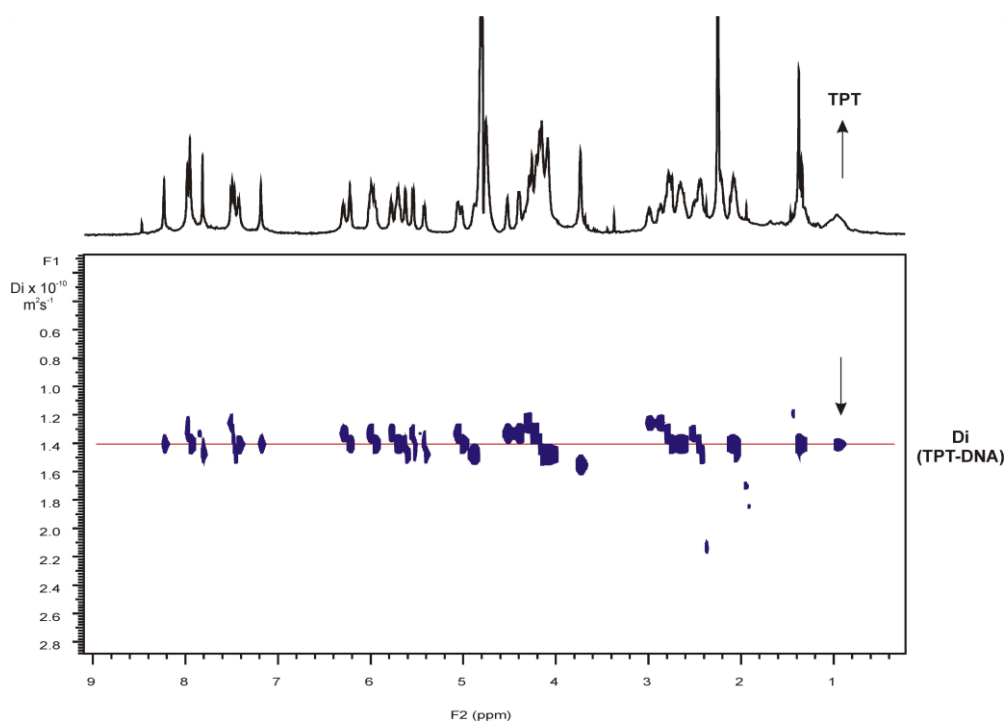
Komórki wysiewano na 96-dołkowe płytki i inkubowano 24 godziny. Po tym czasie do komórek dodawano pożywkę hodowlaną zawierającą związki w szeregu stężeń: od 0.001-50 µM. Komórki inkubowano w szeregu czasowym: 24 godziny, 48 godziny i 72 godziny. Po zakończeniu inkubacji do komórek dodano 50 µl wcześniej przygotowanego roztworu MTT

w stężeniu 5 mg/1ml w PBS, który został rozcieńczony w stosunku 1:20 w PBS. Komórki inkubowano 3 godziny w warunkach hodowli komórek (37 °C, 5 % CO₂). Po zakończeniu inkubacji do każdego dołka dodawano 200 µl alkoholu izopropylowego, w celu rozpuszczenia powstałych kryształów formazanu. Absorbencję formazanu zmierzono w spektrofotometrze płytkowym PowerWave X przy długości fali $\lambda=570$ nm.

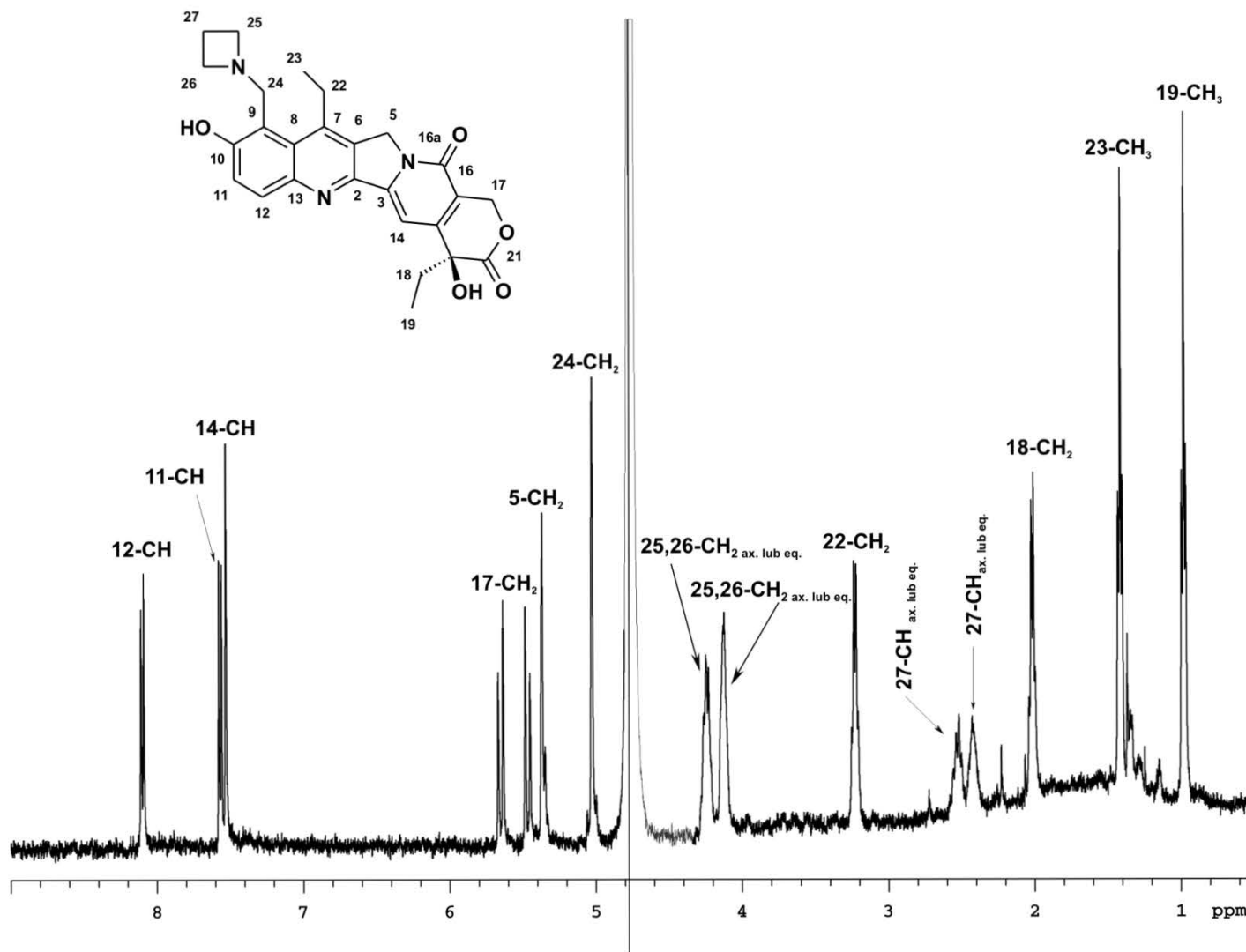
Dla związków SN38, BN37A oraz BN67A wykonano także test CVS.

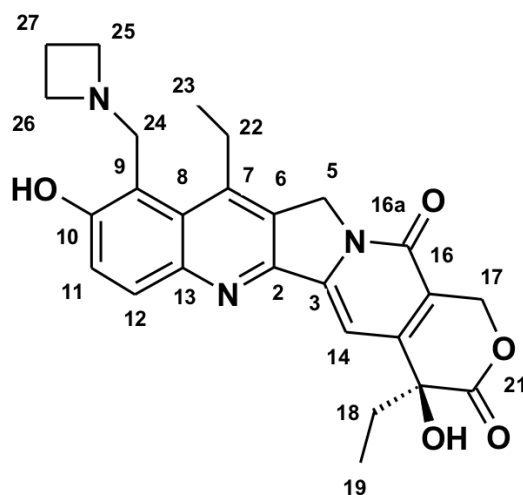
Obliczenia IC₅₀ wykonano na programie GraphPad Prism 5.01.

ZAŁĄCZNIKI



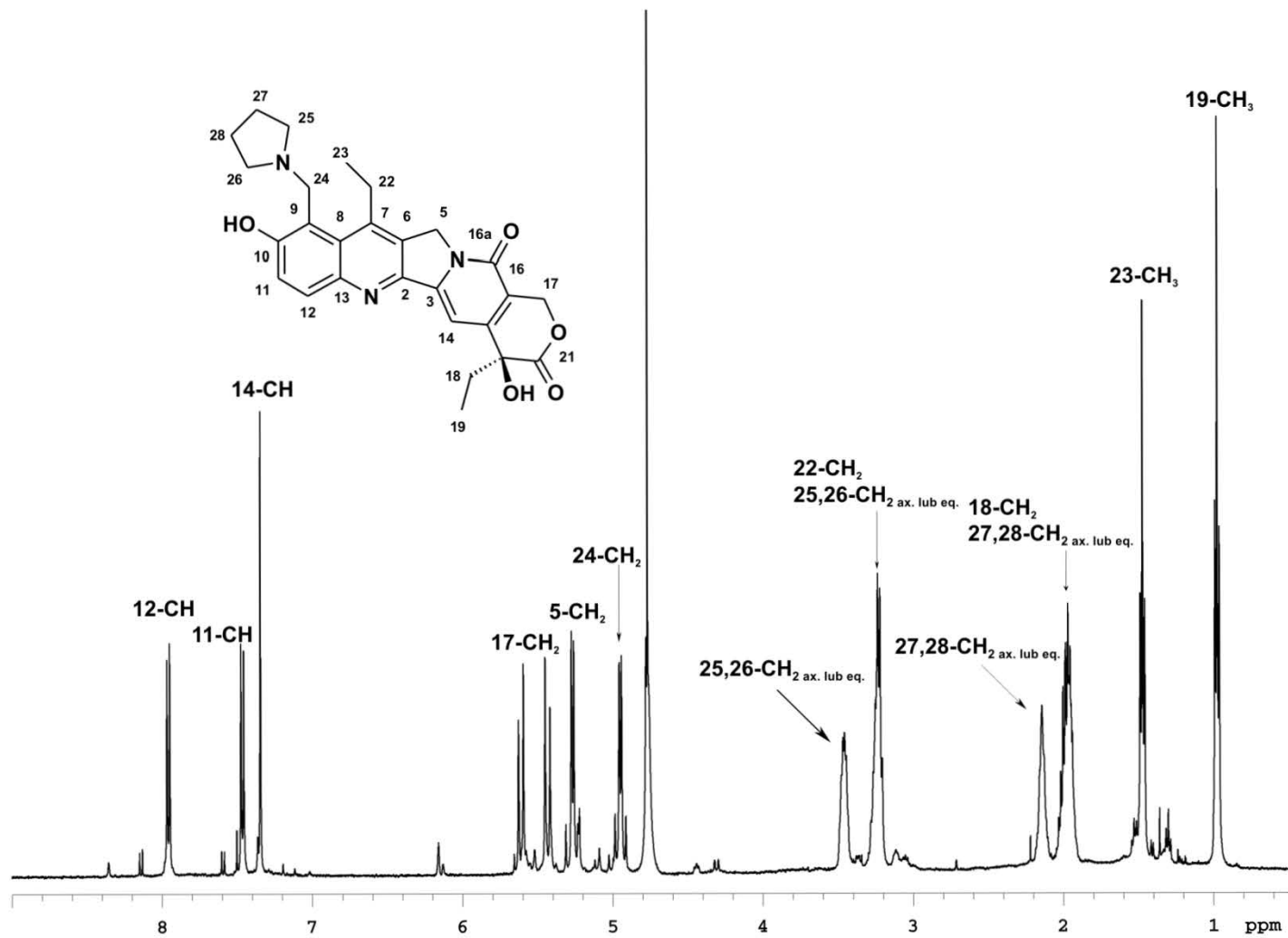
Załącznik 1 Eksperyment PFGSE na próbce otrzymanej po oczyszczeniu mieszaniny reakcyjnej po 20 h naświetlania UV o $\lambda=365$ nm pochodnej TPT z oligomerem DNA. Czerwoną linią oznaczono współczynnik dyfuzji wspólny dla fragmenty pochodnej TPT (grupę metylową zaznaczono strzałką) oraz DNA; $1.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.⁶ (D_2O).

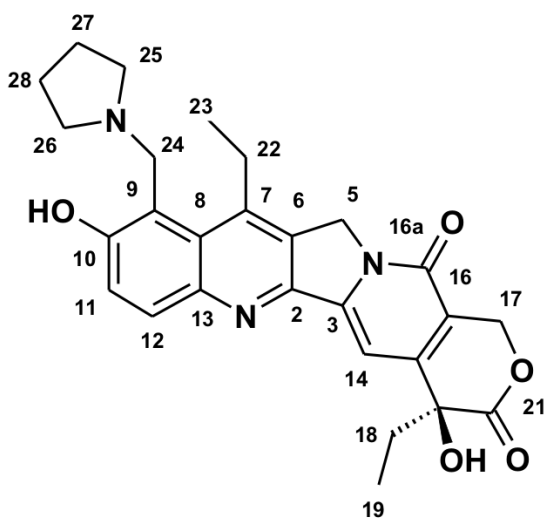




Numer atomu	D ₂ O, pH 4	DMSO-d ₆	CD ₃ OD
2-C	no	149.4	149.5
3-C	no	146.5	146.8
5-CH ₂	5.37; 50.7	5.32; 50.8	5.38; 50.2
6-C	131.3	131.8	131.2
7-C	144.7	143.8	143.6
8-C	127.8	127.9	127.6
9-C	108.9	109.3	109.2
10-C	157.0	158.1	157.7
11-CH	7.57; 121.8	7.63; 121.8	7.58; 121.0
12-CH	8.10; 133.4	8.16; 135.0	8.22; 134.6
13-C	no	145.8	146.0
14-CH	7.53; 98.6	7.23; 96.5	7.61; 97.9
15-C	151.0	150.7	151.5
16-C	118.6	118.85	119.0
16a-C(O)	no	157.3	157.9
17-CH ₂	5.47, 5.65; 66.2	5.41; 65.8	5.40, 5.60; 65.3
18-CH ₂	2.02; 30.6	1.85; 30.7	1.97; 30.7
19-CH ₃	0.98; 7.2	0.86; 8.22	1.01; 6.7
C-20	no	72.8	72.9
21-C(O)	175.1	173.0	173.5
22-CH ₂	3.23; 26.4	3.07; 26.5	3.23; 13.0
23-CH ₃	1.42; 13.3	1.25; 14.4	1.40; 6.7
24-CH ₂	5.01, 5.04; 51.0	4.84, 4.80; 50.6	5.04; 51.0
25, 26-CH ₂ (N) (ax. lub eq.)	4.13; 54.8	4.00; 55.2	4.27; 55.1
25, 26-CH ₂ (N) (ax. lub eq.)	4.25; 54.8	4.27; 55.2	4.27; 55.1
27-CH ₂ (ax. oraz eq.)	2.42, 2.52; no	2.26, 2.33; 17.75	2.50; 16.1

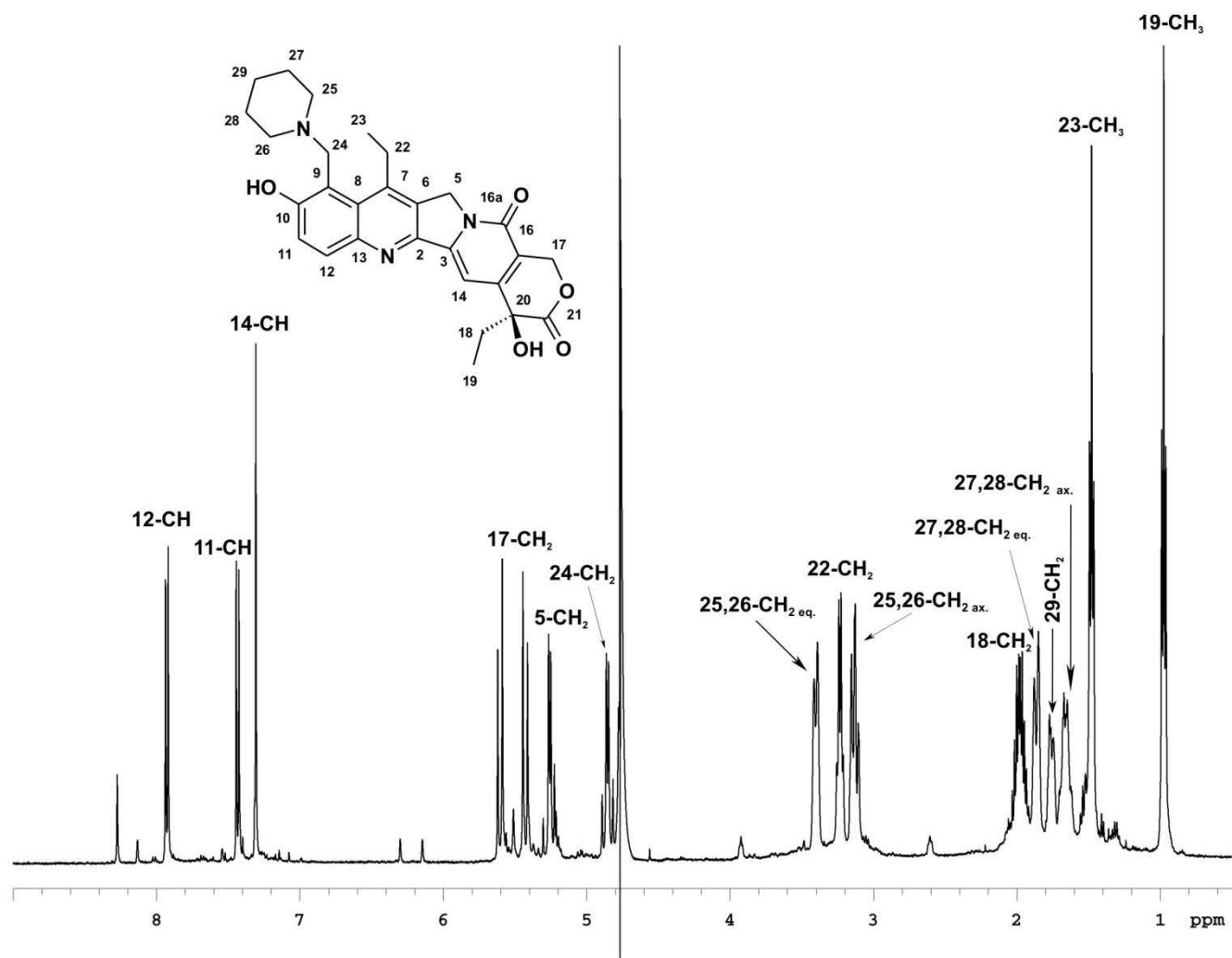
Załącznik 2 Widmo ¹H NMR w wodzie oraz przesunięcia chemiczne ¹H i ¹³C (ppm) dla chlorowodorku pochodnej BN67A w D₂O, DMSO oraz CD₃OD.

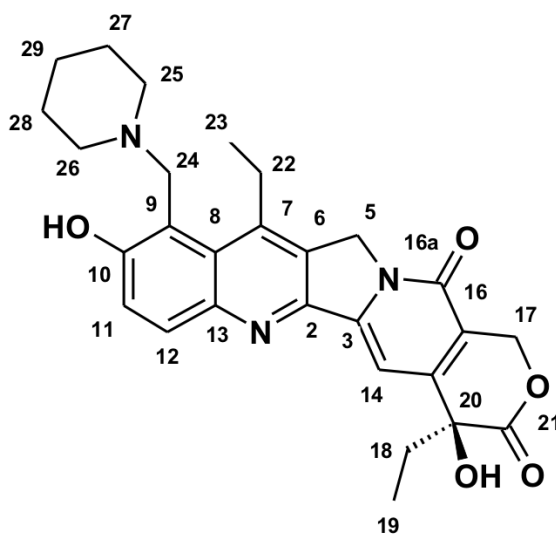




Numer atomu	D ₂ O, pH 3	DMSO-d ₆	CD ₃ OD
2-C	148.1	149.2	149.2
3-C	146.1	146.6	146.5
5-CH ₂	5.24, 5.29; 50.6	5.32; 50.8	5.38; 50.2
6-C	131.0	131.8	131.4
7-C	144.6	144.3	143.8
8-C	127.6	127.8	127.4
9-C	109.5	109.5	109.4
10-C	156.8	158.0	157.8
11-CH	7.48; 121.3	7.66; 121.9	7.61; 121.2
12-CH	7.97; 133.2	8.18; 135.2	8.24; 134.7
13-C	144.8	145.7	145.9
14-CH	7.35; 98.3	7.24; 96.5	7.61; 97.9
15-C	151.0	150.7	151.4
16-C	118.4	119.0	118.9
16a-C(O)	158.2	157.3	158.3
17-CH ₂	5.43, 5.61; 66.0	5.41; 65.7	5.39, 5.60; 65.3
18-CH ₂	1.98; 30.6	1.85; 30.7	1.97; 30.7
19-CH ₃	0.98; 7.1	0.86; 8.4	1.01; 6.7
C-20	73.7	72.8	73.0
21-C(O)	174.9	173.1	173.5
22-CH ₂	3.22; 26.5	3.15; 26.7	3.28; 26.3
23-CH ₃	1.47; 13.2	1.24; 14.4	1.37; 13.0
24-CH ₂	4.93, 4.97; 51.3	4.81, 4.84; 50.1	5.04; 50.8
25,26-CH ₂ (N) (ax. lub eq.)	3.24; 54.5	3.29; 53.8	3.38; 53.8
25,26-CH ₂ (N) (ax. lub eq.)	3.46; 54.5	3.40; 53.8	3.52; 53.8
27,28-CH ₂ (ax. lub eq.)	1.96; 22.5	1.86; 22.9	2.02; 22.6
27,28-CH ₂ (ax. lub eq.)	2.12; 22.5	2.04; 22.9	2.21; 22.6

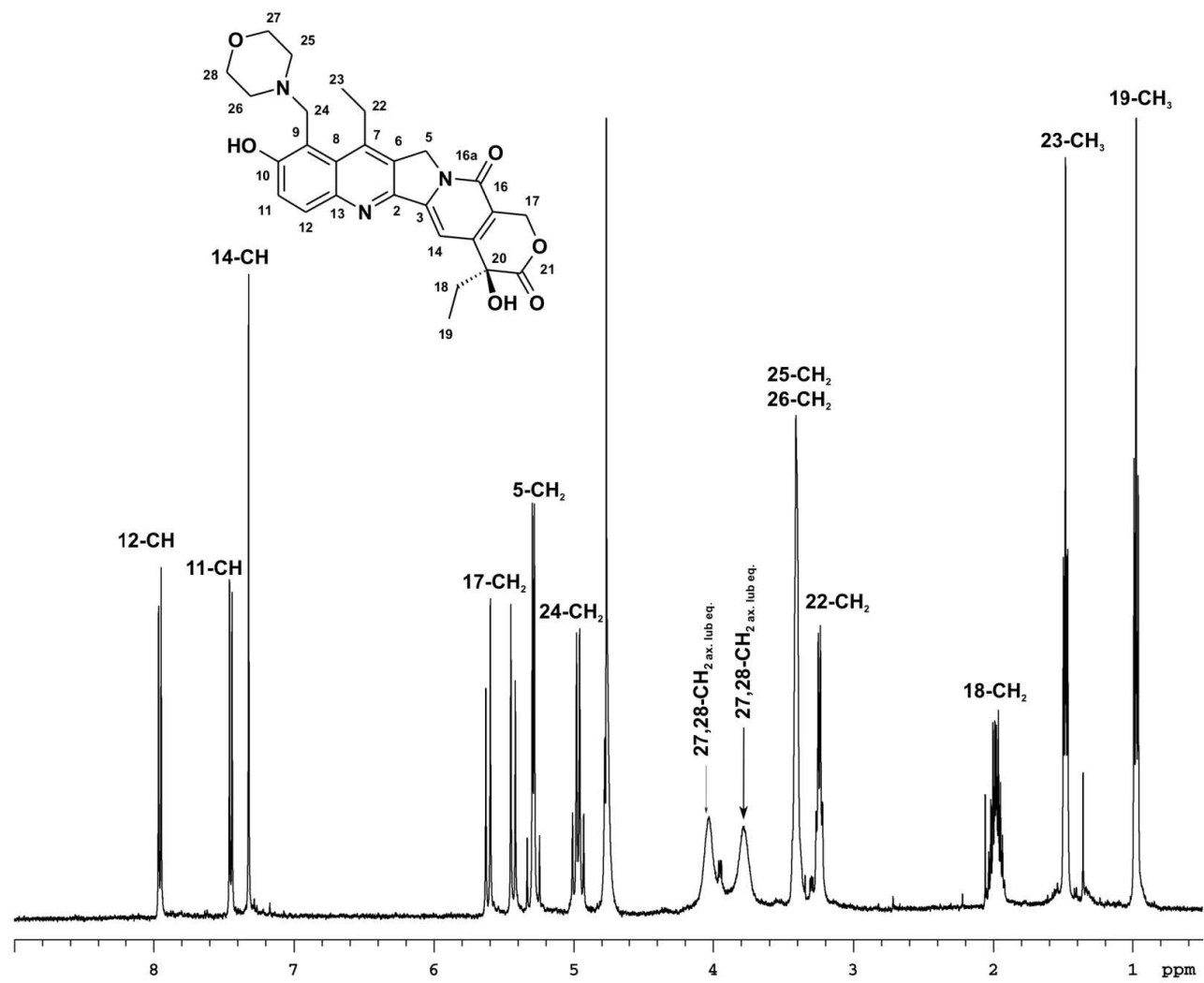
Załącznik 3 Widmo ¹H NMR w wodzie oraz przesunięcia chemiczne ¹H i ¹³C (ppm) dla chlorowodoru pochodnej BN49A w D₂O, DMSO oraz CD₃OD.

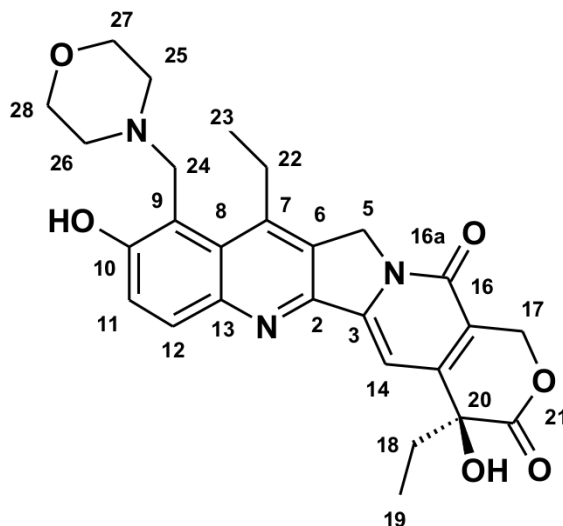




Numer atomu	D ₂ O, pH 4	DMSO-d ₆	CD ₃ OD
2-C	148.1	149.2	149.0
3-C	146.1	146.6	146.4
5-CH ₂	5.26, 5.31; 50.6	5.32; 50.8	5.38; 50.2
6-C	131.0	131.8	131.1
7-C	144.7	144.1	144.2
8-C	127.9	128.0	127.6
9-C	108.3	108.5	107.6
10-C	157.4	158.7	158.4
11-CH	7.46; 121.3	7.68; 121.9	7.61; 121.1
12-CH	7.95; 133.3	8.19; 135.4	8.26; 134.8
13-C	146.1	146.2	145.8
14-CH	7.33 ; 98.3	7.24; 96.5	7.62; 97.8
15-C	151.0	150.8	151.4
16-C	118.5	119.1	118.8
16a-C(O)	158.3	157.4	157.9
17-CH ₂	5.45, 5.63; 66.0	5.42; 65.8	5.40, 5.60; 65.4
18-CH ₂	2.00; 30.7	1.85; 30.7	1.97; 30.7
19-CH ₃	1.00; 7.2	8.2	1.01; 6.7
C-20	73.9	72.9	72.9
21-C(O)	174.9	173.0	173.5
22-CH ₂	3.26; 26.5	3.19; 30.71	3.28; 26.3
23-CH ₃	1.50; 13.3	1.27; 14.4	1.35; 12.9
24-CH ₂	4.85, 4.90; 53.7	4.74, 4.70; 52.8	4.95; 53.6
25,26-CH ₂ (ax.)	3.15; 53.4	3.20; 53.0	3.25; 53.2
25,26-CH ₂ (eq.)	3.42; 53.4	3.32; 53.0	3.48; 53.2
27,28-CH ₂ (ax.)	1.69; 22.6	1.70; 22.8	1.76; 22.6
27,28-CH ₂ (eq.)	1.88; 22.6	1.75; 22.8	1.93; 22.6
29-CH ₂	1.77; 20.7	1.64; 22.6	1.81, 1.58; 21.2

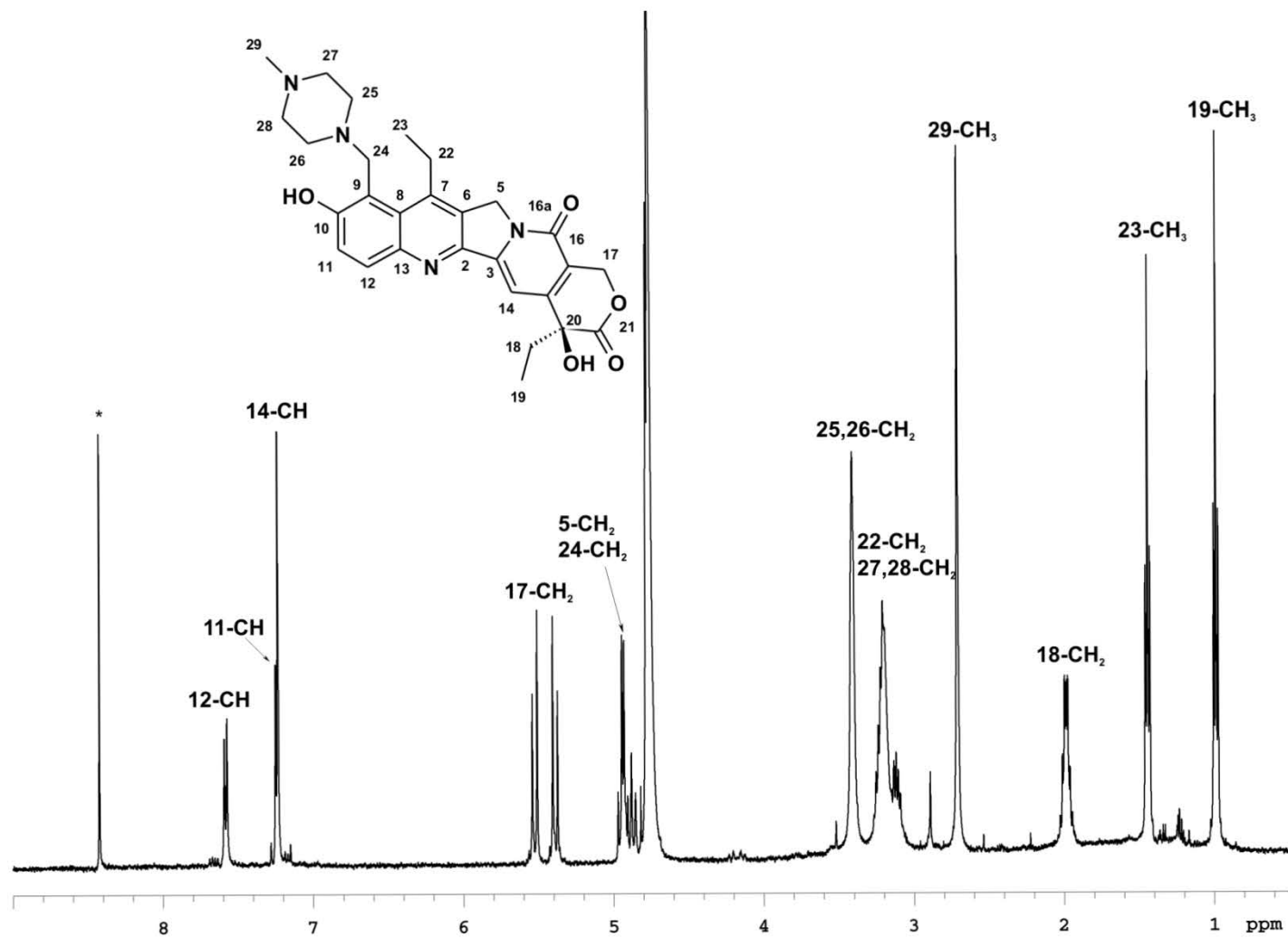
Załącznik 4 Widmo ¹H NMR w wodzie oraz przesunięcia chemiczne ¹H i ¹³C (ppm) dla chlorowodoru pochodnej BN71A w D₂O, DMSO oraz CD₃OD.



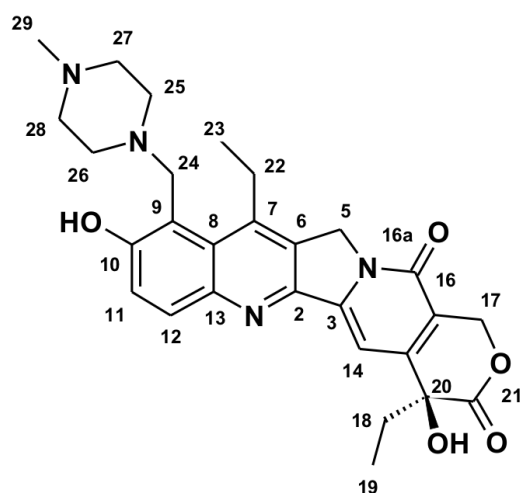


Numer atomu	D ₂ O, pH 3	DMSO-d ₆	CD ₃ OD
2-C	148.2	149.3	149.1
3-C	146.1	146.5	146.5
5-CH ₂	5.31, 5.27; 50.7	5.37; 51.0	5.39; 50.3
6-C	131.2	no	127.5
7-C	144.8	144.1	143.8
8-C	128.0	128.0	127.7
9-C	107.2	107.5	106.9
10-C	157.9	158.6	158.5
11-CH	7.45; 121.2	7.71; no	7.61; 121.0
12-CH	7.96; 133.5	8.24; no	8.27; 135.3
13-C	145.0	145.9	146.0
14-CH	7.33; 98.2	7.29; no	7.61, 98.0
15-C	150.9	150.5	151.5
16-C	118.5	119.0	118.8
16a-C(O)	158.3	157.3	157.9
17-CH ₂	5.44, 5.62; 66.0	5.46; 65.8	5.40, 5.60; 65.6
18-CH ₂	1.99; 30.6	1.89; 30.7	1.97; 30.9
19-CH ₃	7.06	0.90; 8.34	1.01; 6.7
C-20	73.6	72.8	72.9
21-C(O)	175.1	172.9	173.4
22-CH ₂	3.24; 26.4	3.20; 27.0	3.30; 26.4
23-CH ₃	1.49; 13.2	1.27; 14.4	1.36; 12.9
24-CH ₂	5.00, 4.94; 53.9	4.86/4.80; no	5.03; 53.7
25,26-CH ₂ (N)	3.41; 51.8	no	3.46; 52.0
27,28-CH ₂ (O) (ax.lub eq.)	3.75; 63.4	no	3.77; 63.4
27,28-CH ₂ (O) (ax. lub eq.)	4.05; 63.4	no	4.02; 63.4

Załącznik 5 Widmo ¹H NMR w wodzie oraz przesunięcia chemiczne ¹H i ¹³C (ppm) dla chlorowodoru pochodnej BN37A w D₂O, DMSO oraz CD₃OD.



*- sygnał pochodzący od kwasu mrówkowego.



Numer atomu	D ₂ O, pH 5	DMSO-d ₆
2-C	no	148.0
3-C	no	146.4
5-CH ₂	4.92, 4.85; 50.1	5.3; 49.8
6-C	no	130.5
7-C	145.9	144.6
8-C	no	128.6
9-C	no	114.6
10-C	no	157.1
11-CH	7.26; 121.7	7.48; 121.7
12-CH	7.60; 130.9	8.00; 131.6
13-C	no	145.6
14-CH	7.25; 98.1	7.22; 95.5
15-C	151.2	150.0
16-C	118.0	117.9
16a-C(O)	no	156.8
17-CH ₂	5.55, 5.41; 66.0	5.41; 65.1
18-CH ₂	2.00; 30.7	1.86; 30.0
19-CH ₃	1.00; 7.2	0.87; 7.6
C-20	73.7	72.3
21-C(O)	174.8	172.5
22-CH ₂	3.14, 3.24; 4.9	3.36; 24.5
23-CH ₃	1.46; 13.8	1.34; 14.8
24-CH ₂	4.98, 4.94 ; 55.2	4.01; 52.7
25,26-CH ₂ (N)	3.43; 42.0	2.51; 51.6
27,28-CH ₂ (N)	3.23; 50.7	2.51; 54.7
29-CH ₃ (N)	2.73; 43.8	2.13; 45.5

Załącznik 6 Widmo ¹H NMR w wodzie oraz przesunięcia chemiczne ¹H i ¹³C (ppm) dla pochodnej BN74A w D₂O (mrówczan BN74A), DMSO (chlorowodorek BN74A).

	NH	NH ₂ '/NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	na	7.89	–	5.91	2.54	2.74	4.85	4.24	3.76
C2	–	6.46/8.40	7.36	5.35	5.66	2.04	2.40	na	4.19	4.13
G3	12.72	na	7.91	–	5.66	2.73	2.83	5.03	4.37	na
A4	–	na	8.19	7.78	6.26	2.63	2.95	5.02	4.49	4.29
T5	13.53	6.77/8.41	7.15	1.34	5.92	2.05	2.46	na	4.26	4.17
C6	–	-	7.44	5.59	5.73	2.05	2.42	4.86	4.15	4.06
G7	12.97	na	7.91	–	5.93	2.62	2.74	4.99	4.37	na
C8	–	na	7.44	5.45	6.15	2.20	2.20	4.53	4.07	na

Załącznik 7 Przesunięcia ¹H NMR (ppm) oligomeru d(GCGATCGC)₂ w temp. pok., 0.31 mM, pH=6, w buforze H₂O/ 10 % D₂O 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ w obecności 2 równoważników pochodnej SN-NMe₂.

	NH	NH ₂ '	NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	-	-	0.09	-	0.08	0.07	0.05	0.01	-	-0.02
C2	–	0.04	0.01	0.04	0.05	0.02	0.01	0.02	-	-	-
G3	0.04	-	-	0.02	-	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02	-
A4	–	-	-	0.02	0.02	0.02	0.01	0.04	0.01	0.01	-0.01
T5	0.03	-	-	0.02	0.02	0.01	0.02	0.03	-	-0.05	0.00
C6	–	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.00	0.02	0.01	0.00	-
G7	0.09	-	-	0.02	-	0.04	0.01	0.00	0.01	0.00	-
C8	–	-	-	0.02	0.07	0.05	0.00	0.00	-0.02	0.00	-

Załącznik 8 Różnice przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta(\text{oktamer}) - \delta(\text{oktamer/SN-NMe}_2)$ w temperaturze pokojowej.

	NH	NH ₂ '	NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	na	na	7.84	–	5.84	2.50	2.71	4.84	4.25	3.76
C2	–	6.49	8.39	7.35	5.30	5.60	2.04	2.39	na	4.22	na
G3	12.73	na	na	7.91	–	5.68	2.74	2.84	5.04	4.38	na
A4	–	na	na	8.21	7.76	6.25	2.64	2.97	5.02	4.50	4.26
T5	13.60	-	-	7.15	1.32	5.92	2.05	2.47	na	4.19	na
C6	–	6.83	8.41	7.43	5.56	5.73	2.04	2.42	4.86	4.16	na
G7	12.96	na	na	7.91	–	5.92	2.62	2.74	4.99	4.37	na
C8	–	6.703	8.15	7.41	5.38	6.11	2.20	2.20	4.54	4.06	na

Załącznik 9 Przesunięcia ¹H NMR (ppm) oligomeru d(GCGATCGC)₂ w 10 °C, 0.44 mM, pH=6, w buforze H₂O/ 10 % D₂O 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ w obecności 2 równoważników pochodnej BN37A.

	NH	NH ₂ '/NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	na	7.89	–	5.93	2.55	2.74	4.86	4.24	3.75
C2	–	6.46/8.41	7.38	5.36	5.67	2.05	2.41	na	4.19	4.13
G3	12.73	na	7.91	–	5.68	2.74	2.84	5.04	4.38	na
A4	–	na	8.20	7.79	6.26	2.64	2.96	5.03	4.49	4.27
T5	13.54	-	7.15	1.35	5.92	2.05	2.46	na	4.20	4.18
C6	–	6.78/8.42	7.45	5.60	5.74	2.06	2.42	4.87	4.16	na
G7	12.97	na	7.91	–	5.95	2.63	2.74	5.00	4.37	na
C8	–	6.70	7.44	5.46	6.16	2.19	2.19	4.53	4.07	na

Załącznik 10 Przesunięcia ¹H NMR (ppm) oligomeru d(GCGATCGC)₂ w temp. pok., 0.39 mM, pH=6, w buforze H₂O/ 10 % D₂O 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ w obecności 2 równoważników pochodnej BN49A.

	NH	NH ₂ '	NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	-	-	0.09	-	0.06	0.06	0.05	0.00	0.01	-0.02
C2	–	0.06	0.04	0.02	0.04	0.01	0.00	0.01	-	-	-
G3	0.04	-	-	0.02	-	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	-
A4	–	-	-	0.01	0.01	0.02	0.00	0.03	0.00	0.01	0.01
T5	0.02	-	-	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	-	0.01	-0.01
C6	–	0.02	0.06	0.00	0.02	0.02	-0.01	0.01	0.00	-0.01	0.00
G7	0.09	-	-	0.02	-	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	-
C8	–	0.04	-	0.02	0.06	0.04	0.01	0.01	-0.02	0.00	-

Załącznik 11 Różnice przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta(\text{oktamer}) - \delta(\text{oktamer}/\text{BN49A})$ w temperaturze pokojowej.

	NH	NH ₂ '	NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	na	na	7.86	–	5.86	2.51	2.71	4.85	4.24	3.77
C2	–	6.49	8.40	7.36	5.31	5.61	2.05	2.40	4.87	4.18	4.13
G3	12.74	na	na	7.92	–	5.67	2.74	2.83	5.04	4.38	4.05
A4	–	na	na	8.21	7.76	6.25	2.64	2.97	5.02	4.50	4.28
T5	13.60	-	-	7.16	1.33	5.92	2.05	2.47	4.86	4.19	4.18
C6	–	6.83	8.41	7.44	5.56	5.72	2.05	2.42	4.86	4.17	4.07
G7	12.96	na	na	7.91	–	5.92	2.63	2.74	4.99	4.37	na
C8	–	6.73	8.15	7.42	5.39	6.13	2.21	2.21	4.54	4.07	na

Załącznik 12 Przesunięcia ¹H NMR (ppm) oligomeru d(GCGATCGC)₂ w 10 °C, 1.25 mM, pH=6, w buforze H₂O/ 10 % D₂O 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ w obecności 2 równoważników pochodnej BN49A.

	NH	NH ₂ '	NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	-	-	0.14	-	0.13	0.12	0.08	0.03	0.01	-0.04
C2	-	0.10	0.11	0.06	0.09	0.05	0.04	0.03	-	-	-
G3	0.06	-	-	0.03	-	0.04	0.03	0.03	0.02	0.02	-
A4	-	-	-	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.00
T5	0.04	-	-	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	-	-	-0.01
C6	-	0.06	0.07	0.03	0.04	0.04	0.02	0.02	0.01	0.02	-
G7	0.13	-	-	0.03	-	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	-
C8	-	0.08	0.15	0.06	0.10	0.07	-0.02	-0.02	-0.02	0.00	-

Załącznik 13 Różnice przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta(\text{oktamer}) - \delta(\text{oktamer}/\text{BN49A})$ w 10 °C.

	NH	NH ₂ '	NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	na	na	7.85	-	5.86	2.50	2.71	4.85	4.25	3.78
C2	-	6.49	8.39	7.35	5.31	5.61	2.05	2.40	na	na	na
G3	12.73	na	na	7.92	-	5.67	2.74	2.84	5.04	4.38	na
A4	-	na	na	8.21	7.76	6.25	2.64	2.97	5.02	4.50	4.26
T5	13.60	-	-	7.15	1.32	5.92	2.05	2.47	na	4.30	4.17
C6	-	6.83	8.41	7.44	5.56	5.73	2.05	2.42	4.87	4.19	na
G7	12.96	na	na	7.91	-	5.92	2.63	2.74	4.99	4.37	4.08
C8	-	6.73	8.13	7.43	5.40	6.12	2.20	2.20	4.54	4.07	na

Załącznik 14 Przesunięcia ¹H NMR (ppm) oligomeru d(GCGATCGC)₂ w 10 °C, 0.73 mM, pH=6, w buforze H₂O/ 10 % D₂O 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ w obecności 2 równoważników pochodnej BN67A.

	NH	NH ₂ '	NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	-	-	-	0.14	-	0.14	0.13	0.08	0.02	0.01	-0.05
C2	-	0.10	0.12	0.07	0.09	0.04	0.04	0.03	-	-	-
G3	0.05	-	-	0.04	-	0.04	0.03	0.03	0.02	0.02	-
A4	-	-	-	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
T5	0.03	-	-	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	-	-	0.01
C6	-	0.06	0.07	0.02	0.04	0.04	0.01	0.02	0.01	0.00	-
G7	0.10	-	-	0.03	-	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	-
C8	-	0.08	0.16	0.05	0.09	0.08	-0.01	-0.01	-0.02	0.00	-

Załącznik 15 Różnice przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta(\text{oktamer}) - \delta(\text{oktamer}/\text{BN67A})$ w 10 °C.

	NH	NH ₂ '/NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	na	7.92	–	5.94	2.56	2.76	4.85	4.25	3.75
C2	–	6.48/8.43	7.38	5.37	5.67	2.05	2.41	na	na	na
G3	12.74	na	7.91	–	5.68	2.74	2.84	5.04	4.38	na
A4	–	na	8.20	7.79	6.27	2.64	2.96	5.02	4.50	4.29
T5	13.54	-	7.15	1.35	5.93	2.06	2.47	na	4.20	4.18
C6	–	6.78/8.42	7.45	5.60	5.75	2.06	2.42	4.86	4.16	na
G7	13.00	na	7.92	–	5.94	2.63	2.75	4.99	4.37	4.08
C8	–	6.71/8.17	7.45	5.48	6.17	2.20	2.20	4.52	4.07	na

Załącznik 16 Przesunięcia ¹H NMR (ppm) oligomeru d(GCGATCGC)₂ w temp. pok., 0.45 mM, pH=6, w buforze H₂O/ 10 % D₂O 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ w obecności 2 równoważników pochodnej BN71A.

	NH	NH ₂ '	NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	-	-	0.06	-	0.05	0.05	0.04	0.01	0.01	-0.02
C2	–	0.04	0.02	0.02	0.03	0.01	0.00	0.01	-	-	-
G3	0.03	-	-	0.02	-	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	-
A4	–	-	-	0.01	0.01	0.01	0.00	0.03	0.01	0.00	-0.01
T5	0.02	-	-	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	-	0.01	-0.01
C6	–	0.02	0.06	0.00	0.01	0.01	-0.01	0.01	0.01	-0.01	0.00
G7	0.06	-	-	0.01	-	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	-
C8	–	0.03	-	0.01	0.04	0.03	0.00	0.00	-0.01	0.00	-

Załącznik 17 Różnice przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta(\text{oktamer}) - \delta(\text{oktamer}/\text{BN71A})$ w temperaturze pokojowej.

	NH	NH ₂ '	NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	na	na	7.88	–	5.90	2.54	2.73	4.86	4.25	3.77
C2	–	6.52	8.42	7.37	5.33	5.61	2.06	2.40	na	4.19	na
G3	12.75	na	na	7.92	–	5.68	2.74	2.84	5.04	4.39	na
A4	–	na	na	8.22	7.77	6.26	2.65	2.97	5.02	4.51	4.27
T5	13.61	-	-	7.16	1.33	5.92	2.05	2.47	na	4.20	4.17
C6	–	6.85	8.42	7.44	5.57	5.74	2.05	2.43	4.87	4.17	4.06
G7	12.99	na	na	7.92	–	5.93	2.63	2.74	4.99	4.38	na
C8	–	6.75	8.19	7.43	5.42	6.13	2.20	2.20	4.54	4.07	na

Załącznik 18 Przesunięcia ¹H NMR (ppm) oligomeru d(GCGATCGC)₂ w 10 °C. 0.75 mM, pH=6, w buforze H₂O/ 10 % D₂O 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ w obecności 2 równoważników pochodnej BN71A.

	NH	NH ₂ '	NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	-	-	-	0.11	-	0.09	0.09	0.06	0.02	0.01	-0.04
C2	-	0.08	0.09	0.04	0.07	0.04	0.03	0.02	na	-	-
G3	0.05	-	-	0.03	-	0.03	0.02	0.02	0.01	0.02	-
A4	-	-	-	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
T5	0.03	-	-	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	-	-	0.00
C6	-	0.05	0.05	0.02	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	-
G7	0.10	-	-	0.02	-	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	-
C8	-	-	0.11	0.04	0.07	0.07	-0.01	-0.01	-0.02	0.00	-

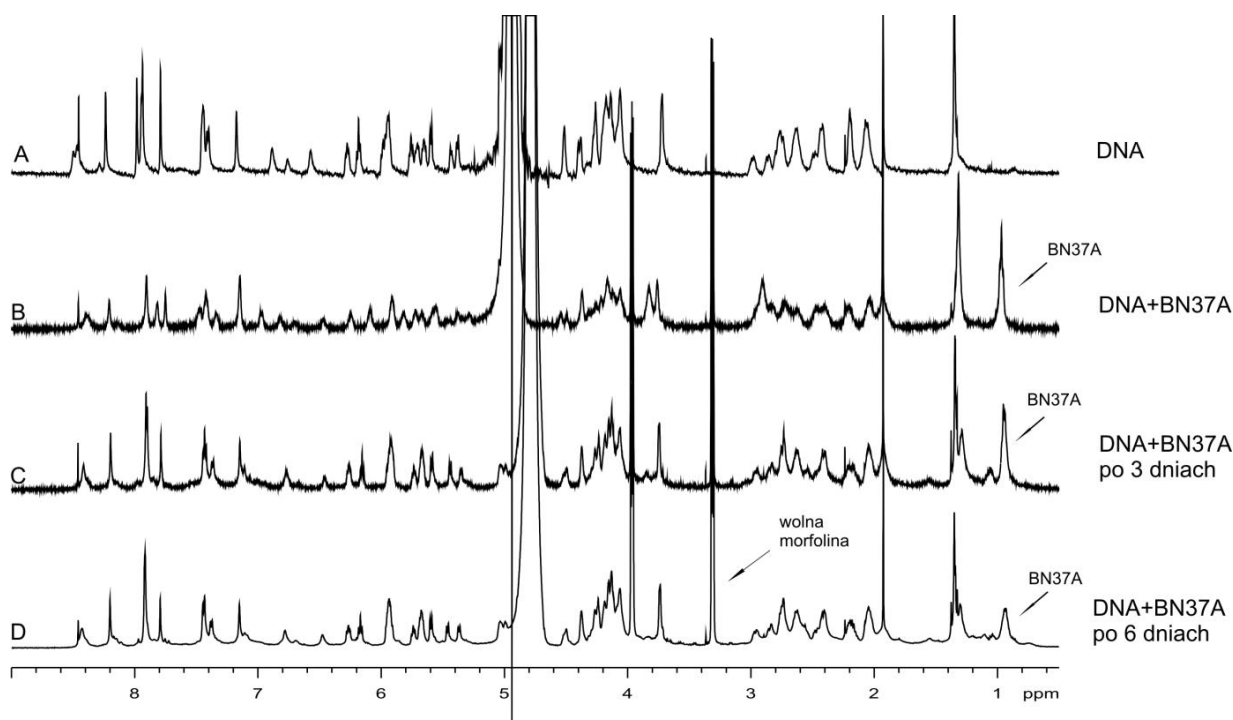
Załącznik 19 Różnice przesunięć chemicznych $\Delta\delta = \delta(\text{oktamer}) - \delta(\text{oktamer}/\text{BN71A})$ w 10 °C.

	NH	NH ₂ '	NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	na	na	7.89	-	5.89	2.54	2.73	4.85	4.24	3.75
C2	-	6.52	8.43	7.37	5.33	5.61	2.05	2.40	na	4.18	4.13
G3	12.75	na	na	7.92	-	5.69	2.74	2.84	5.05	4.39	4.06
A4	-	na	na	8.22	7.77	6.26	2.65	2.97	5.03	4.51	4.27
T5	13.61	-	-	7.16	1.33	5.93	2.06	2.47	na	4.19	4.17
C6	-	6.85	8.43	7.44	5.57	5.74	2.05	2.43	4.87	na	na
G7	12.99	na	na	7.92	-	5.92	2.63	2.74	4.99	4.37	na
C8	-	6.74	8.19	7.44	5.43	6.13	2.20	2.20	4.54	4.07	na

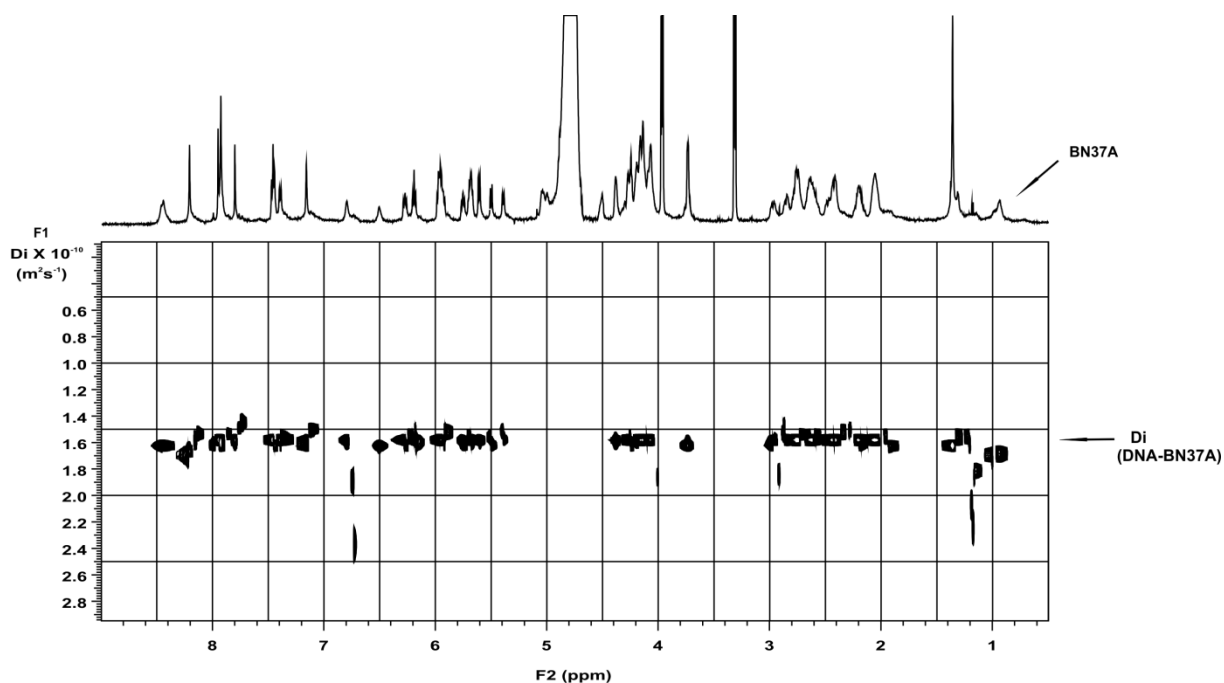
Załącznik 20 Przesunięcia ¹H NMR (ppm) oligomeru d(GCGATCGC)₂ w 10 °C, 0.59 mM, pH=6, w buforze H₂O/ 10 % D₂O 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ w obecności 2 równoważników pochodnej BN74A.

	NH	NH ₂ '	NH ₂ ''	H8/H6	H2/H5/Me	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'
G1	na	-	-	0.11	-	0.10	0.09	0.06	0.02	0.01	-0.03
C2	-	0.08	0.08	0.04	0.06	0.05	0.04	0.03	-	-	-
G3	0.05	-	-	0.03	-	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	-
A4	-	-	-	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
T5	0.03	-	-	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	-	-	0.00
C6	-	0.04	0.05	0.02	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	-	-
G7	0.10	-	-	0.03	-	0.03	0.01	0.02	0.01	0.01	-
C8	-	0.07	0.10	0.04	0.06	0.07	-0.01	-0.01	-0.02	0.00	-

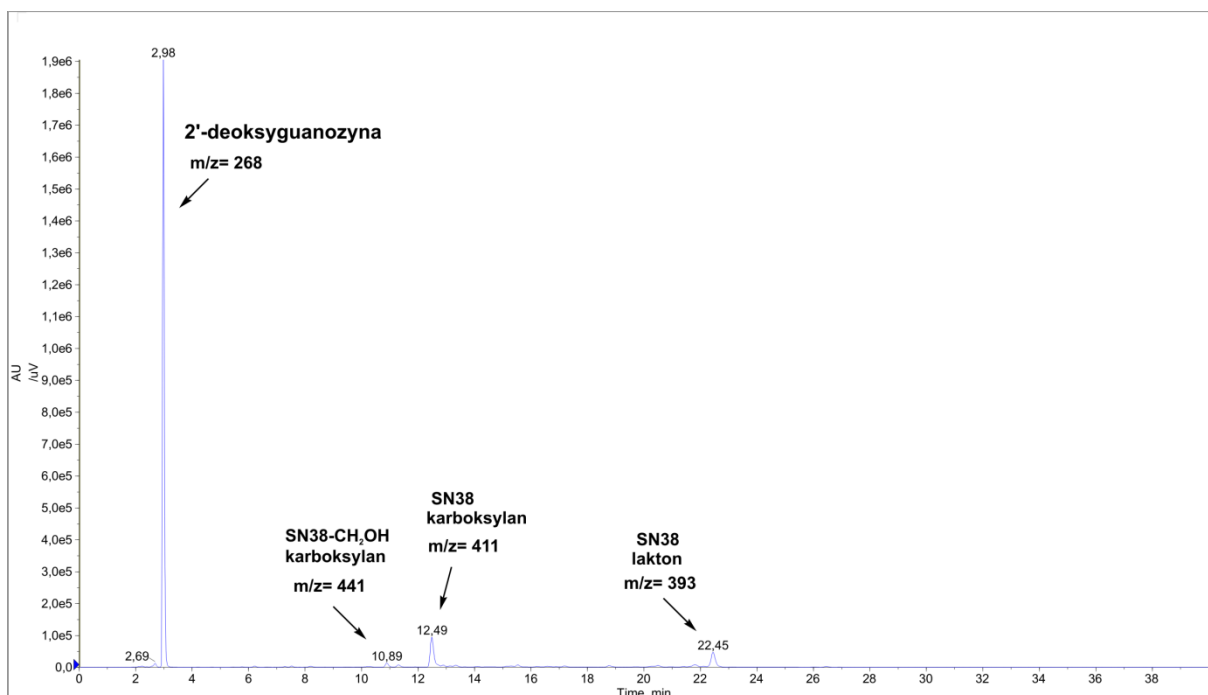
Załącznik 21 Różnice przesunięć chemicznych $\Delta\delta = d(\text{oktamer}) - \delta(\text{oktamer}/\text{BN74A})$ w 10 °C.



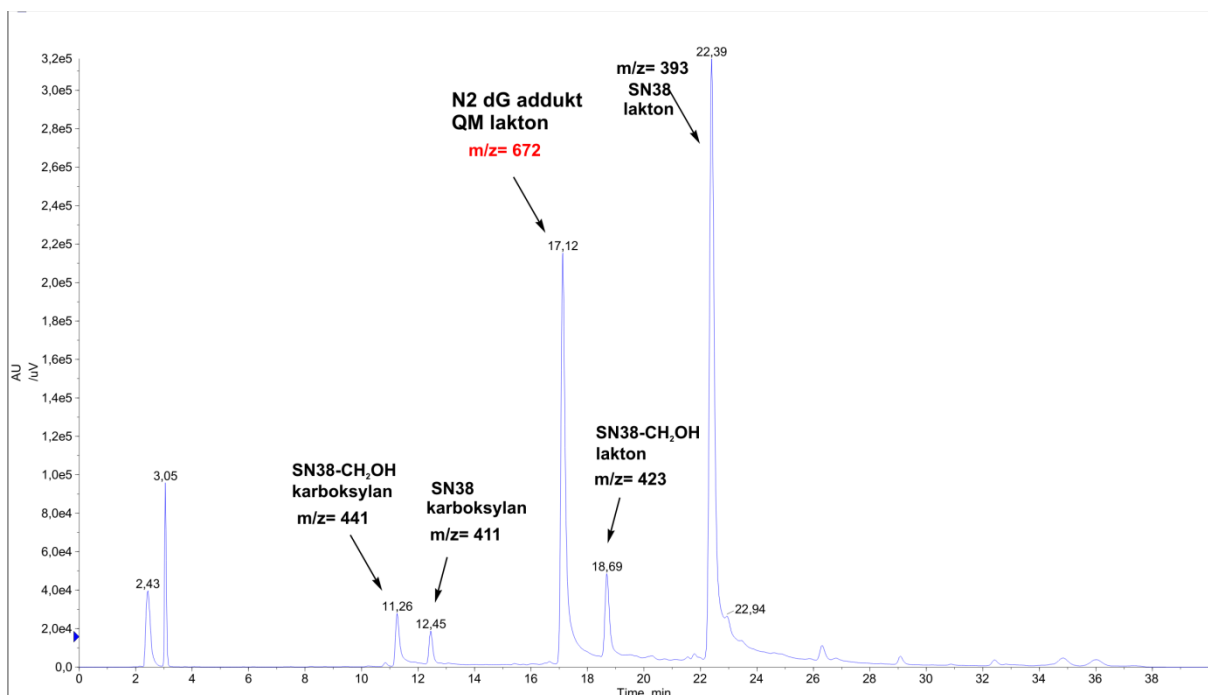
Załącznik 22 Monitorowanie ¹H NMR reakcji BN37 (C=0.88 mM) z d(GCGATCGC)₂ (C=0.44 mM) w buforze 25mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ o pH=6 (10 % D₂O) w temp. 10 °C: A- DNA; B-DNA po dodaniu BN37A; C-tak jak B po 3 dniach;D-tak jak B po 6 dniach. Na widmie D zaznaczono sygnał od protonów wolnej morfoliny który pokrywa się ze wspólnymi sygnałami na widmie C i D.



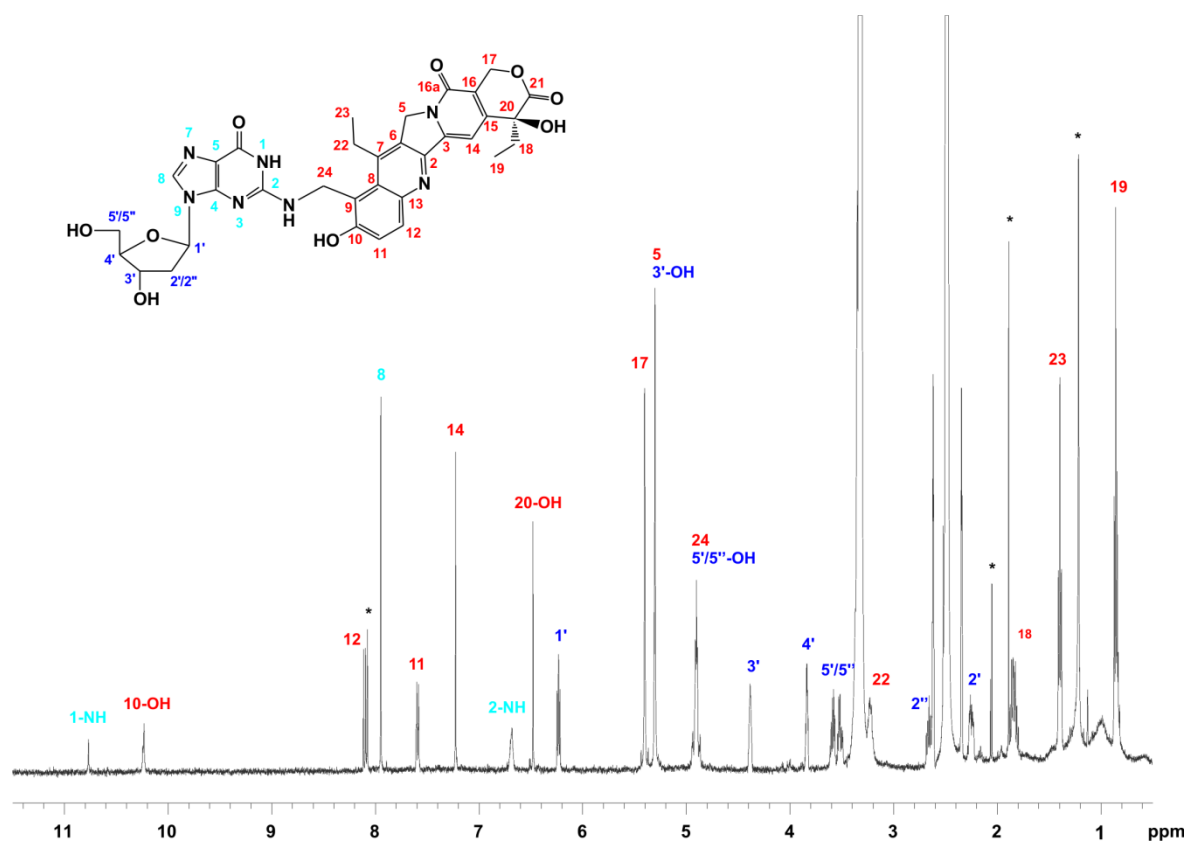
Załącznik 23. Eksperyment PFGSE wykonany po 7 dniach reakcji BN37A (C=1.98 mM) z d(GCGATCGC)₂ w (C=1.0 mM) w buforze 25 mM NaCl/ 25 mM K₃PO₄ o pH=6 (10 % D₂O) w temp.pokojowej. Strzałka wskazuje współczynniki dyfuzji wspólny dla DNA i pochodnej BN37A, Di, 1.6 x 10⁻¹⁰ m²/s.



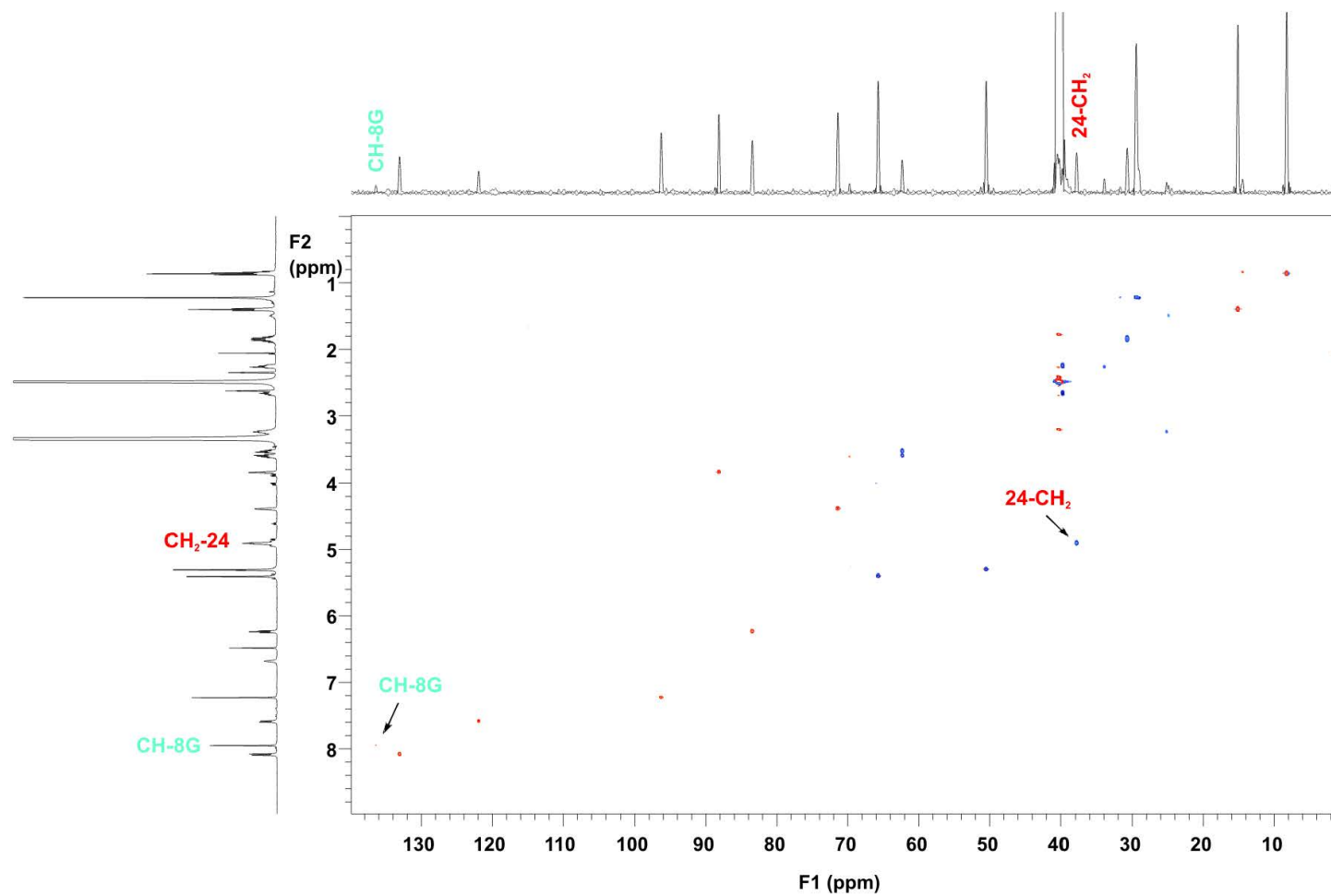
Załącznik 24 Chromatogram LC/MS roztworu po 24 godz. reakcji 2'-deoksyguanozyny z pochodną BN37A. Reakcja prowadzona w D₂O o pH=6.



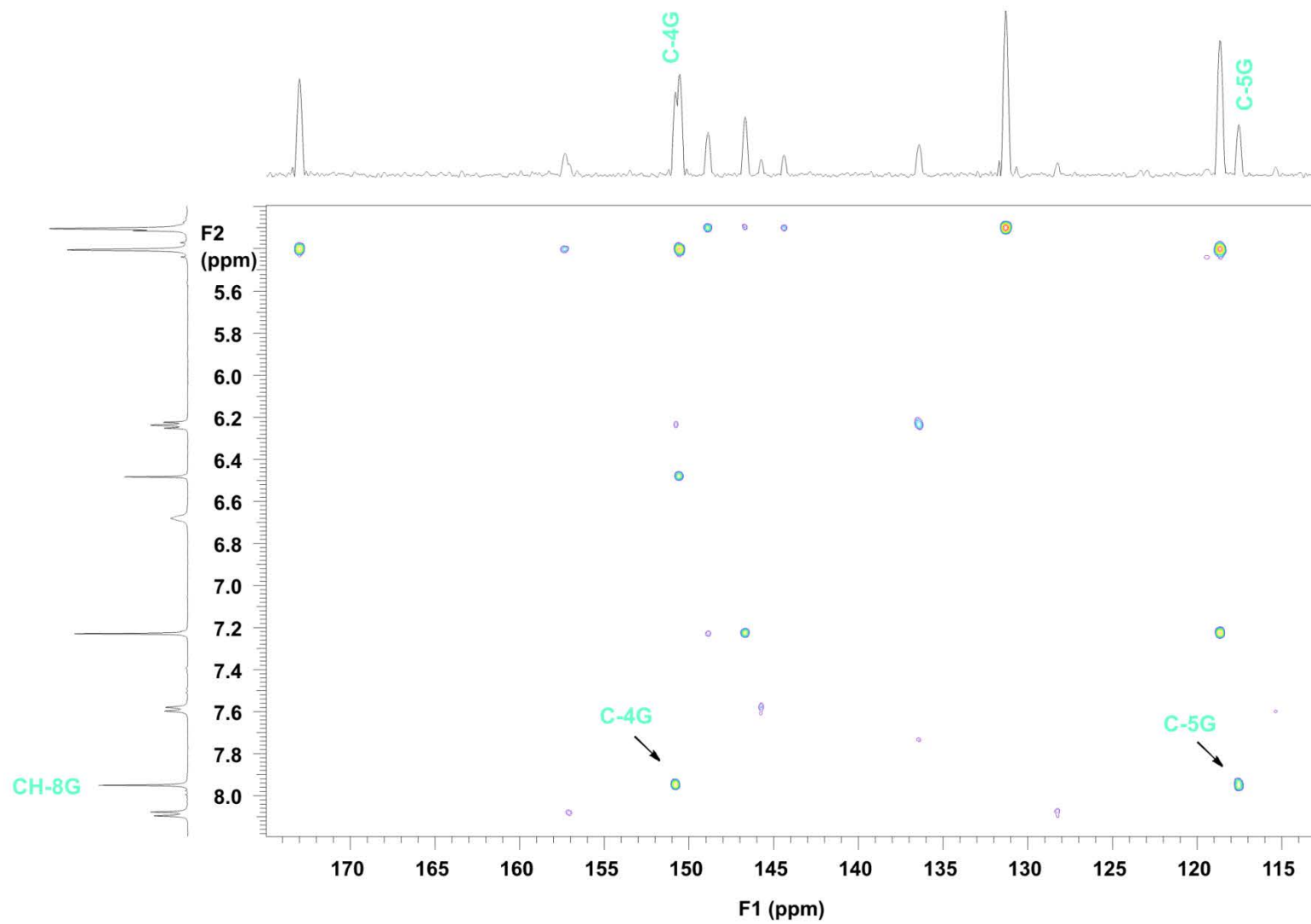
Załącznik 25 Chromatogram LC/MS wytrąconego osadu po 24 godz. reakcji 2'-deoksyguanozyny z pochodną BN37A. Reakcja prowadzona w D₂O o pH=6.



Załącznik 26 Widmo ^1H NMR adduktu N2 dG wykonane w DMSO-d_6 . Addukt otrzymany w reakcji 2'-deoksyguanozyny z BN37A prowadzonej w D_2O o $\text{pH}=6$. *- oznacza zanieczyszczenia pochodzące od 2'-deoksyguanozyny.



Załącznik 27 Fragment widma HSQC na próbce z Rysunku 7.16. Strzałki wskazują sygnały korelacyjne dla CH-8G oraz 24-CH₂.



Załącznik 28 Fragment widma HMBC na próbce z Rysunku 7.16. Strzałki wskazują korelacyjne protonu CH-8G do atomów węgla C-4G i C-5G.

Wykaz publikacji i wystąpień konferencyjnych

Publikacje:

1. *Pochodne kamptotecyny, sposób syntezy i ich zastosowanie*; Zgłoszenie patentowe polskie, 25.10.2012 Nr P. 401345; L. Kozerski, R. Kawęcki, B. Naumczuk, K. Hyz, W. Bocian, E. Bednarek, J. Sitkowski, K. Wiktorska, K. Lubelska.
2. *Derivatives of camptothecin, a method of producing them and their use*; Zgłoszenia patentowego (faza międzynarodowa), 25.10.2013 Nr. PCT/IB2013/059668, Publikacja PCT 1 May 2014 no. WO 2014/064654 A1; L. Kozerski, R. Kawęcki, B. Naumczuk, K. Hyz, W. Bocian, E. Bednarek, J. Sitkowski, K. Wiktorska, K. Lubelska.
3. *Derivatives of camptothecin, a method of producing them and their use*; Zgłoszenie patentowe w fazie krajowej USA, 31.03.2015; L. Kozerski, R. Kawęcki, B. Naumczuk, K. Hyz, W. Bocian, E. Bednarek, J. Sitkowski, K. Wiktorska, K. Lubelska
4. *Derivatives of camptothecin, a method of producing them and their use*; Zgłoszenie patentowe w fazie regionalnej europejskiej (walidacja w Anglii, Francji, Niemczech i Szwajcarii), 25.05.2015; No. 13824167.4-1462 L. Kozerski, R. Kawęcki, B. Naumczuk, K. Hyz, W. Bocian, E. Bednarek, J. Sitkowski, K. Wiktorska, K. Lubelska.
5. B. Naumczuk, K. Hyz, R. Kawęcki, W. Bocian, E. Bednarek, J. Sitkowski, E. Wielgus, L. Kozerski;. DOSY NMR and MALDI-TOF evidence of covalent binding the DNA duplex by trimethylammonium salts of topotecan upon near UV irradiation; *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2015**, *53*, 565-571.
6. B. Naumczuk, K. Wiktorska, R. Kawęcki, K. Lubelska, W. Bocian, E. Bednarek, J. Sitkowski, Z. Chilmończyk, L. Kozerski; *In vitro* anticancer activity of New SN38 derivatives; praca przygotowana, może być wysłana po przyjęciu zgłoszeń patentowych w fazie krajowej USA i fazie regionalnej europejskiej.

Wystąpienia konferencyjne:

1. EUROMAR Magnetic Resonance Conference, 21-25 sierpnia 2011, Frankfurt, Niemcy (sesja plakatowa: Chemistry and DNA-complexes of topoisomerase I inhibitors)
2. VIII MULTIDYSCYPLINARNA KONFERENCJA NAUKI O LEKU, 30 maja - 1 czerwca 2012, Hotel Ossa & Spa koło Rawy Mazowieckiej (sesja plakatowa: Molecular complexes of topo I and II inhibitors from camptothecins and flavonoid

- families with DNA oligomers. Search for sequence specific binding. Verification of biological assays on atom coordinates level.)
3. XXVth ICMRB, 19-24 sierpnia 2012, Lyon, Francja (sesja posterowa: Molecular complexes of topo I and II inhibitors from camptothecins and flavonoid families with DNA oligomers. Search for sequence specific binding. Verification of biological assays on atom coordinates level.)
 4. 56. Zjazd PTChemu, 16-20 września 2013, Siedlce (komunikat: Chemia i spektroskopia inhibitorów Topo I alkilujących DNA)
 5. IX Multidyscyplinarnej Konferencji Nauki o Leku 12-14 Maja 2014, Korytnica k. Szydłowa (sesja posterowa: New camptothecin derivatives alkylating DNA oligomers :the synthesis, physicochemical data and application as topo I inhibitors, dyplom wyróżnienia w konkursie na najlepszy poster)
 6. EUROMAR, 29 czerwca-3 lipca 2014, Zurych, Szwajcaria (sesja posterowa: New camptothecin derivatives alkylating DNA oligomers :the synthesis, physicochemical data and application as topo I inhibitors)
 7. VIIIth Symposium: Nuclear Magnetic Resonance In Chemistry, Physics and Biological Sciences, 24-26 września 2014, Warszawa (komunikat ustny i sesja posterowa: NMR Monitoring of DNA alkylation by camptothecin derivatives.)

Jestem również realizatorką grantu NCN no. 2012/07/B/ST4/00566.

LITERATURA

1. Finkel, T.; Serrano, M.; Blasco, M. A. The common biology of cancer and ageing. *Nature* **2007**, *448*, 767-74.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
3. Singh, Y.; Palombo, M.; Sinko, P. J. Recent trends in targeted anticancer prodrug and conjugate design. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1802-26.
4. Pommier, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 789-802.
5. Bocian, W.; Kawecki, R.; Bednarek, E.; Sitkowski, J.; Williamson, M. P.; Hansen, P. E.; Kozerski, L. Binding of topotecan to a nicked DNA oligomer in solution. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2788-2794.
6. Naumczuk, B.; Hyz, K.; Kawęcki, R.; Bocian, W.; Bednarek, E.; Sitkowski, J.; Wielgus, E.; Kozerski, L. DOSY NMR and MALDI-TOF evidence of covalent Winding the DNA duplex by trimethylammonium salts of topotecan upon near UV irradiation. *Magn. Reson. Chem.* **2015**, *53*, 565-571.
7. Silverman, R. B. *The organic chemistry of drug design and drug action*. Second Edition ed.; Elsevier Academic Press: 2004.
8. Wang, A. H.; Ughetto, G.; Quigley, G. J.; Rich, A. Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2-Å resolution. *Biochemistry* **1987**, *26*, 1152-63.
9. Feigon, J.; Denny, W. A.; Leupin, W.; Kearns, D. R. Interactions of antitumor drugs with natural DNA: ¹H NMR study of binding mode and kinetics. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 450-65.
10. Lerman, L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 18-30.
11. Pritchard, N. J.; Blake, A.; Peacocke, A. R. Modified intercalation model for the interaction of amino acridines and DNA. *Nature* **1966**, *212*, 1360-1.
12. Tse, W. C.; Boger, D. L. Sequence-selective DNA recognition: natural products and nature's lessons. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1607-17.
13. Delbarre, A.; Delepierre, M.; Garbay, C.; Igolen, J.; Le Pecq, J. B.; Roques, B. P. Geometry of the antitumor drug ditercalinium bisintercalated into d(CpGpCpG)₂ by ¹H NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 2155-9.
14. Delbarre, A.; Delepierre, M.; Langlois d'Estaintot, B.; Igolen, J.; Roques, B. P. Bisintercalation of ditercalinium into a d[CpGpCpG]₂ minihelix: structure and dynamics aspects--a 400-MHz ¹H-NMR study. *Biopolymers* **1987**, *26*, 1001-33.
15. Hamilton, P. L.; Arya, D. P. Natural product DNA major groove binders. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 134-43.
16. Cai, X.; Gray, P. J., Jr.; Von Hoff, D. D. DNA minor groove binders: back in the groove. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 437-50.
17. Nelson, S. M.; Ferguson, L. R.; Denny, W. A. Non-covalent ligand/DNA interactions: minor groove binding agents. *Mutat. Res.* **2007**, *623*, 24-40.
18. Neidle, S. DNA minor-groove recognition by small molecules. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 291-309.
19. Dervan, P. B. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2215-35.
20. Balcome, S.; Park, S.; Quirk Dorr, D. R.; Hafner, L.; Phillips, L.; Tretyakova, N. Adenine-containing DNA-DNA cross-links of antitumor nitrogen mustards. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 950-62.

21. Sangeetha Gowda, K. R.; Blessy Baby Mathew; Sudhamani, C. N.; Bhojya Naik, H. S. Mechanism of DNA Binding and Cleavage. *Biomedicine and Biotechnology* **2014**, *2*, 1-9.
22. Pizarro, A. M.; Sadler, P. J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie* **2009**, *91*, 1198-211.
23. Sugiura, Y.; Shiraki, T.; Konishi, M.; Oki, T. DNA intercalation and cleavage of an antitumor antibiotic dynemicin that contains anthracycline and enediyne cores. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 3831-5.
24. Staker, B. L.; Hjerrild, K.; Feese, M. D.; Behnke, C. A.; Burgin, A. B., Jr.; Stewart, L. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 15387-92.
25. Forterre, P.; Gribaldo, S.; Gadelle, D.; Serre, M.-C. Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* **2007**, *89*, 427-46.
26. Wang, J. C. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 635-92.
27. Stewart, L.; Redinbo, M. R.; Qiu, X.; Hol, W. G.; Champoux, J. J. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science* **1998**, *279*, 1534-41.
28. Ulukan, H.; Swaan, P. W. Camptothecins: a review of their chemotherapeutic potential. *Drugs* **2002**, *62*, 2039-57.
29. Bailly, C.; Lansiaux, A.; Dassonneville, L.; Demarquay, D.; Coulomb, H.; Huchet, M.; Lavergne, O.; Bigg, D. C. Homocamptothecin, an E-ring-modified camptothecin analogue, generates new topoisomerase I-mediated DNA breaks. *Biochemistry* **1999**, *38*, 15556-63.
30. Bocian, W.; Kawecki, R.; Bednarek, E.; Sitkowski, J.; Pietrzyk, A.; Williamson, M. P.; Hansen, P. E.; Kozerski, L. Multiple binding modes of the camptothecin family to DNA oligomers. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5776-87.
31. Hyz, K.; Kawecki, R.; Bednarek, E.; Bocian, W.; Sitkowski, J.; Kozerski, L. Topotecan dynamics, tautomerism and reactivity--1H/13C NMR and ESI MS study. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 575-84.
32. Thomas, C. J.; Rahier, N. J.; Hecht, S. M. Camptothecin: current perspectives. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1585-604.
33. Garcia-Carbonero, R.; Supko, J. G. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 641-61.
34. Jaxel, C.; Kohn, K. W.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Pommier, Y. Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 1465-9.
35. Pommier, Y.; Pourquier, P.; Fan, Y.; Strumberg, D. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1400*, 83-105.
36. Staker, B. L.; Feese, M. D.; Cushman, M.; Pommier, Y.; Zembower, D.; Stewart, L.; Burgin, A. B. Structures of three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2336-45.
37. Mazzini, S.; Bellucci, M. C.; Dallavalle, S.; Fraternali, F.; Mondelli, R. Mode of binding of camptothecins to double helix oligonucleotides. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 505-13.
38. Kawato, Y.; Aonuma, M.; Hirota, Y.; Kuga, H.; Sato, K. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 4187-91.
39. Xu, Y.; Villalona-Calero, M. A. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann. Oncol.: ESMO* **2002**, *13*, 1841-51.
40. Potmesil, M. Camptothecins: from bench research to hospital wards. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1431-1439.

41. Laco, G. S.; Collins, J. R.; Luke, B. T.; Kroth, H.; Sayer, J. M.; Jerina, D. M.; Pommier, Y. Human topoisomerase I inhibition: docking camptothecin and derivatives into a structure-based active site model. *Biochemistry* **2002**, *41*, 1428-1435.
42. Li, Q.-Y.; Zu, Y.-G.; Shi, R.-Z.; Yao, L.-P. Review camptothecin: current perspectives. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2021-2039.
43. Gilman, A.; Philips, F. S. The biological actions and therapeutic applications of the B-chloroethyl amines and sulfides. *Science* **1946**, *103*, 409-15.
44. Bauer, G. B.; Povirk, L. F. Specificity and kinetics of interstrand and intrastrand bifunctional alkylation by nitrogen mustards at a G-G-C sequence. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 1211-8.
45. Noll, D. M.; Mason, T. M.; Miller, P. S. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 277-301.
46. Persmark, M.; Guengerich, F. P. Spectroscopic and thermodynamic characterization of the interaction of N7-guanyl thioether derivatives of d(TGCTG*CAAG) with potential complements. *Biochemistry* **1994**, *33*, 14368.
47. Oida, T.; Humphreys, W. G.; Guengerich, F. P. Preparation and characterization of oligonucleotides containing S-[2-(N7-guanyl)ethyl]glutathione. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10513-22.
48. Michaelson-Richie, E. D.; Ming, X.; Codreanu, S. G.; Loeber, R. L.; Liebler, D. C.; Campbell, C.; Tretyakova, N. Y. Mechlorethamine-induced DNA-protein cross-linking in human fibrosarcoma (HT1080) cells. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 2785-96.
49. Rajski, S. R.; Williams, R. M. DNA cross-linking agents as antitumor drugs. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2723-2796.
50. Rink, S. M.; Hopkins, P. B. A mechlorethamine-induced DNA interstrand cross-link bends duplex DNA. *Biochemistry* **1995**, *34*, 1439-45.
51. Tomasz, M.; Palom, Y. The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacol. Ther.* **1997**, *76*, 73-87.
52. Tomasz, M. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 575-9.
53. Norman, D.; Live, D.; Sastry, M.; Lipman, R.; Hingerty, B. E.; Tomasz, M.; Broyde, S.; Patel, D. J. NMR and computational characterization of mitomycin cross-linked to adjacent deoxyguanosines in the minor groove of the d(T-A-C-G-T-A).d(T-A-C-G-T-A) duplex. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2861-75.
54. Suresh Kumar, G.; Musser, S. M.; Cummings, J.; Tomasz, M. 2,7-Diaminomitosene, a Monofunctional Mitomycin C Derivative, Alkylates DNA in the Major Groove. Structure and Base-Sequence Specificity of the DNA Adduct and Mechanism of the Alkylation. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9209-9217.
55. Wolkenberg, S. E.; Boger, D. L. Mechanisms of in situ activation for DNA-targeting antitumor agents. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2477-95.
56. Iyer, V. N.; Szybalski, W. Mitomycins and porfiromycin: Chemical mechanism of activation and cross-linking of DNA. *Science* **1964**, *145*, 55-8.
57. Suresh Kumar, G.; Lipman, R.; Cummings, J.; Tomasz, M. Mitomycin C-DNA adducts generated by DT-diaphorase. Revised mechanism of the enzymatic reductive activation of mitomycin C. *Biochemistry* **1997**, *36*, 14128-36.
58. Sastry, M.; Fiala, R.; Lipman, R.; Tomasz, M.; Patel, D. J. Solution structure of the monoalkylated mitomycin C-DNA complex. *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 338-59.
59. Pizarro, A. M.; Sadler, P. J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie* **2009**, *91*, 1198-1211.

60. Eastman, A. Characterization of the adducts produced in DNA by cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II). *Biochemistry* **1983**, *22*, 3927-3933.
61. Brabec, V.; Kasparkova, J. Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug Resist. Updates* **2002**, *5*, 147-161.
62. Ohndorf, U. M.; Rould, M. A.; He, Q.; Pabo, C. O.; Lippard, S. J. Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature* **1999**, *399*, 708-712.
63. Gelasco, A.; Lippard, S. J. NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry* **1998**, *37*, 9230-9239.
64. Kartalou, M.; Essigmann, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res.* **2001**, *478*, 23-43.
65. Burger, R. M. Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1153-1169.
66. Loeb, K. E.; Zaleski, J. M.; Westre, T. E.; Guajardo, R. J.; Mascharak, P. K.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Solomon, E. I. Spectroscopic Definition of the Geometric and Electronic Structure of the Non-Heme Iron Active Site in Iron(II) Bleomycin: Correlation with Oxygen Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4545-4561.
67. Stubbe, J.; Kozarich, J.; Wu, W.; Vanderwall, D. Bleomycins: A structural model for specificity, binding, and double strand cleavage. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 322-330.
68. Chen, J.; Stubbe, J. Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 175-81.
69. Hoehn, S. T.; Junker, H. D.; Bunt, R. C.; Turner, C. J.; Stubbe, J. Solution structure of Co(III)-bleomycin-OOH bound to a phosphoglycolate lesion containing oligonucleotide: implications for bleomycin-induced double-strand DNA cleavage. *Biochemistry* **2001**, *40*, 5894-905.
70. Hecht, S. M. Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 158-68.
71. Keck, M. V.; Manderville, R. A.; Hecht, S. M. Chemical and structural characterization of the interaction of bleomycin A2 with d(CGCGAATTCGCG)₂. efficient, double-strand DNA cleavage accessible without structural reorganization. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8690-700.
72. Wu, W.; Vanderwall, D. E.; Turner, C. J.; Kozarich, J. W.; Stubbe, J. Solution Structure of Co Bleomycin A2 Green Complexed with d(CCAGGCCTGG). *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1281-1294.
73. Vanderwall, D. E.; Lui, S. M.; Wu, W.; Turner, C. J.; Kozarich, J. W.; Stubbe, J. A model of the structure of HOO-Co.bleomycin bound to d(CCAGTACTGG): recognition at the d(GpT) site and implications for double-stranded DNA cleavage. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 373-87.
74. Umezawa, H.; Maeda, K.; Takeuchi, T.; Okami, Y. New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot.* **1966**, *19*, 200-9.
75. Willis, N. J.; Bray, C. D. ortho-Quinone methides in natural product synthesis. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 9160-9173.
76. Amouri, H.; Besace, Y.; Le Bras, J. General Synthesis, First Crystal Structure, and Reactivity of Stable o-Quinone Methide Complexes of Cp*Ir. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6171-6172.
77. Singh, M. S.; Nagaraju, A.; Anand, N.; Chowdhury, S. ortho-Quinone methide (o-QM): a highly reactive, ephemeral and versatile intermediate in organic synthesis. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 55924-55959.

78. Modica, E.; Zanaletti, R.; Freccero, M.; Mella, M. Alkylation of amino acids and glutathione in water by o-quinone methide. Reactivity and selectivity. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 41-52.
79. Richter, S. N.; Maggi, S.; Mels, S. C.; Palumbo, M.; Freccero, M. Binol quinone methides as bisalkylating and DNA cross-linking agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13973-9.
80. Basarić, N.; Mlinarić-Majerski, K.; Kralj, M. Quinone Methides: Photochemical Generation and its Application in Biomedicine. *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18*, 3-18.
81. Kuang, Y.; Balakrishnan, K.; Gandhi, V.; Peng, X. Hydrogen peroxide inducible DNA cross-linking agents: targeted anticancer prodrugs. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19278-81.
82. Di Antonio, M.; Doria, F.; Mella, M.; Merli, D.; Profumo, A.; Freccero, M. Novel naphthalene diimides as activatable precursors of bisalkylating agents, by reduction and base catalysis. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8354-60.
83. Cao, S.; Peng, X. Exploiting Endogenous Cellular Process to Generate Quinone Methides In Vivo. *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18*, 70-85.
84. Weinert, E. E.; Frankenfield, K. N.; Rokita, S. E. Time-dependent evolution of adducts formed between deoxynucleosides and a model quinone methide. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1364-70.
85. Veldhuyzen, W. F.; Lam, Y. F.; Rokita, S. E. 2'-Deoxyguanosine reacts with a model quinone methide at multiple sites. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1345-51.
86. Veldhuyzen, W. F.; Shalloo, A. J.; Jones, R. A.; Rokita, S. E. Thermodynamic versus kinetic products of DNA alkylation as modeled by reaction of deoxyadenosine. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11126-32.
87. Freccero, M.; Gandolfi, R.; Sarzi-Amade, M. Selectivity of purine alkylation by a quinone methide. Kinetic or thermodynamic control? *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6411-23.
88. Weinert, E. E.; Dondi, R.; Colloredo-Melz, S.; Frankenfield, K. N.; Mitchell, C. H.; Freccero, M.; Rokita, S. E. Substituents on quinone methides strongly modulate formation and stability of their nucleophilic adducts. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11940-7.
89. Warpehoski, M. A.; Harper, D. E.; Mitchell, M. A.; Monroe, T. J. Reversibility of the covalent reaction of CC-1065 and analogues with DNA. *Biochemistry* **1992**, *31*, 2502-8.
90. Zewail-Foote, M.; Hurley, L. H. Differential rates of reversibility of ecteinascidin 743-DNA covalent adducts from different sequences lead to migration to favored bonding sites. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6485-95.
91. Asai, A.; Nagamura, S.; Saito, H.; Takahashi, I.; Nakano, H. The reversible DNA-alkylating activity of duocarmycin and its analogues. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 88-93.
92. Lee, S.; Seaman, F. C.; Sun, D.; Xiong, H.; Kelly, R. C.; Hurley, L. H. Replacement of the Bizelesin Ureadiyl Linkage by a Guanidinium Moiety Retards Translocation from Monoalkylation to Cross-Linking Sites on DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3434-3442.
93. Seaman, F. C.; Chu, J.; Hurley, L. Cross-Linkage by "Intact" Bizelesin and Bisalkylation by the "Separated Halves" of the Bizelesin Dimer: Contrasting Drug Manipulation of DNA Conformation (5'-TAATTA-3') Directs Alkylation toward Different Adenine Targets. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5383-5395.
94. Cao, S.; Wang, Y.; Peng, X. The leaving group strongly affects H₂O₂-induced DNA cross-linking by arylboronates. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 501-8.
95. Cao, S.; Wang, Y.; Peng, X. ROS-inducible DNA cross-linking agent as a new anticancer prodrug building block. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 3850-4.
96. Doria, F.; Richter, S. N.; Nadai, M.; Colloredo-Mels, S.; Mella, M.; Palumbo, M.; Freccero, M. BINOL-amino acid conjugates as triggerable carriers of DNA-targeted potent photocytotoxic agents. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6570-9.

97. Zhou, Q.; Qu, Y.; Mangrum, J. B.; Wang, X. DNA alkylation with N-methylquinolinium quinone methide to N2-dG adducts resulting in extensive stops in primer extension with DNA polymerases and subsequent suppression of GFP expression in A549 cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 402-11.
98. Veldhuyzen, W. F.; Pande, P.; Rokita, S. E. A transient product of DNA alkylation can be stabilized by binding localization. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14005-13.
99. Wang, H.; Rokita, S. E. Dynamic cross-linking is retained in duplex DNA after multiple exchange of strands. *Angew. Chem. Int. Ed. (English)* **2010**, *49*, 5957-60.
100. Wang, H.; Wahi, M. S.; Rokita, S. E. Immortalizing a Transient Electrophile for DNA Cross-Linking. *Angew. Chem. Int. Ed. (English)* **2008**, *47*, 1291-1293.
101. Fakhari, F.; Rokita, S. E. A walk along DNA using bipedal migration of a dynamic and covalent crosslinker. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5591.
102. Brulikova, L.; Hlavac, J.; Hradil, P. DNA interstrand cross-linking agents and their chemotherapeutic potential. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 364-85.
103. Zhou, Q.; Rokita, S. E. A general strategy for target-promoted alkylation in biological systems. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 15452-7.
104. Rossiter, C. S.; Modica, E.; Kumar, D.; Rokita, S. E. Few constraints limit the design of quinone methide-oligonucleotide self-adducts for directing DNA alkylation. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1476-8.
105. Liu, Y.; Rokita, S. E. Inducible alkylation of DNA by a quinone methide-peptide nucleic acid conjugate. *Biochemistry* **2012**, *51*, 1020-1027.
106. Jonsson, E.; Dhar, S.; Jonsson, B.; Nygren, P.; Graf, W.; Larsson, R. Differential activity of topotecan, irinotecan and SN-38 in fresh human tumour cells but not in cell lines. *Eur. J. Cancer* **2000**, *36*, 2120-7.
107. Puri, S. C.; Handa, G.; Dhar, K. L.; Suri, O. P.; Qazi, G. N. Process for preparing topotecan from 10-hydroxy-20(S) camptothecin. *US 6660861 B1* **2003**.
108. Kozerski, L.; Kawęcki, R.; Naumczuk, B.; Hyz, K.; Bocian, W.; Bednarek, E.; Sitkowski, J.; Wiktorska, K.; Lubelska, K. Derivatives of camptothecin, a method of producing them and their use. *WO 2014/064654 A1* **2014**.
109. Srinivas, N. R. Lack of stability of topotecan in heart tissue homogenates: is it an analytical dilemma or a real phenomenon? *Biomed. Chromatogr.* **2009**, *23*, 447-9.
110. Tramontini, M. Advances in the Chemistry of Mannich Bases. *Synthesis* **1973**, 703-775.
111. Baell, J. B.; Holloway, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2719-40.
112. Hyz, K.; Kawęcki, R.; Bednarek, E.; Bocian, W.; Sitkowski, J.; Kozerski, L. Topotecan dynamics, tautomerism and reactivity--1H/13C NMR and ESI MS study. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 575-84.
113. Hwang, T. L.; Shaka, A. J. Water Suppression that works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Waveforms and Pulsed Field Gradients. *J. Magn. Reson. Ser A* **1995**, *112*, 275-279.
114. Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. Investigation of Exchange Processes by 2-Dimensional NMR-Spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546-4553.
115. Dalvit, C. Efficient multiple-solvent suppression for the study of the interactions of organic solvents with biomolecules. *J. Biomol.NMR* **1998**, *11*, 437-444.
116. Thrippleton, M. J.; Keeler, J. Elimination of Zero-Quantum Interference in Two-Dimensional NMR Spectra. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3938-3941.
117. Bodenhausen, G.; Kogler, H.; Ernst, R. R. Selection of coherence-transfer pathways in NMR pulse experiments. *J. Magn. Reson.* **1984**, *58*, 370-388.

118. States, D. J.; Haberkorn, R. A.; Ruben, D. J. A two-dimensional nuclear overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants. *J. Magn. Reson.* **1982**, *48*, 286-292.
119. Braunschweiler, L.; Ernst, R. R. Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521-528.
120. Griesinger, C.; Otting, G.; Wüthrich, K.; Ernst, R. R. Clean TOCSY for proton spin system identification in macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7870-7872.
121. Summers, M. F.; Marzilli, L. G.; Bax, A. Complete proton and carbon-13 assignments of coenzyme B12 through the use of new two-dimensional NMR experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4285-4294.
122. Pelta, M. D.; Morris, G. A.; Stchedroff, M. J.; Hammond, S. J. A one-shot sequence for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, S147-S152.
123. Denizot, F.; Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **1986**, *89*, 271-7.



B. Org. 376/16

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.376/16



9000000192746