



WYDZIAŁ CHEMICZNY
KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ,
BIOORGANICZNEJ I BIOTECHNOLOGII

mgr inż. Monika Domińska

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Glikokoniugacja *N*-heterocyklicznych związków biologicznie
aktywnych oraz ocena ich aktywności przeciwnowotworowej**

Przewodnik po monotematycznym cyklu publikacji

Promotor: dr hab. inż. Gabriela Pastuch-Gawołek, prof. PŚ

Gliwice 2023

*Składam serdeczne podziękowania
Pani Promotor dr hab. inż. Gabrieli Pastuch-Gawolek
za opiekę podczas trwania studiów doktoranckich, okazaną życzliwość
oraz za wszelkie wskazówki merytoryczne dotyczące pracy naukowej.*

*Podziękowania kieruję także do Pana prof. dr hab. inż. Wiesława Szei
za przekazaną wiedzę, doświadczenie oraz cenne sugestie.*

*Za wszelką pomoc udzieloną mi podczas realizacji prac badawczych dziękuję
wszystkim, z którymi w trakcie trwania mojego doktoratu przyszło mi współpracować.*

*Szczególne podziękowania składam mojemu Mężowi za cierpliwość i wsparcie,
a także moim Rodzicom za troskę i wiarę we mnie.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH MONOTEMATYCZNY CYKL	4
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ	6
1. CEL I ZAKRES BADAŃ	7
2. WPROWADZENIE DO TEMATYKI BADAWCZEJ	8
2.1. Glikokoniugacja jako strategia poprawy aktywności i selektywności potencjalnych leków	10
2.2. 8-Hydroksychinolina oraz glikokoniugaty pochodne 8-hydroksychinoliny wykazujące aktywność przeciwnowotworową	12
2.3. Metotreksat i jego pochodne w terapiach przeciwnowotworowych	17
2.4. Koncepcja <i>click chemistry</i>	19
3. OMÓWIENIE WYNIKÓW	22
3.1. Glikokoniugacja pochodnych 8-hydroksychinoliny [P.1, P.2, P.3, P.4]	23
3.1.1. Synteza pochodnych cukrowych D-glukozy oraz D-galaktozy	23
3.1.2. Synteza pochodnych 8-hydroksychinoliny	27
3.1.3. Synteza glikokoniugatów pochodnych 8-hydroksychinoliny	28
3.1.4. Ocena aktywności biologicznej glikokoniugatów pochodnych 8-hydroksychinoliny	36
3.2. Potencjalne metabolity glikokoniugatów pochodnych 8-hydroksychinoliny [P.5]	44
3.3. Wykorzystanie nanonośników polimerowych do ukierunkowanego transportu glikokoniugatów [P.5, P.6, P.7]	45
3.4. Glikokoniugacja pochodnej metotreksatu [P.8, P.9, P.10]	48
3.4.1. Synteza pochodnych metotreksatu	48
3.4.2. Ocena aktywności biologicznej glikokoniugatu pochodnej metotreksatu	50
4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	52
5. LITERATURA	56
STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	63
SUMMARY OF THE DOCTORAL DISSERTATION	64
WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO	65
OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI O WKŁADZIE AUTORSKIM	73

ZAŁĄCZNIKI:

Publikacje P.1 - P.10 stanowiące monotematyczny cykl

Płyta CD zawierająca elektroniczną wersję rozprawy doktorskiej oraz publikacji P.1 - P.10 wraz z opublikowanymi materiałami uzupełniającymi

WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH MONOTEMATYCZNY CYKL

Niniejszą rozprawę doktorską stanowi monotematyczny cykl wymienionych poniżej dziesięciu prac naukowych, opublikowanych na łamach czasopism notowanych w bazie *Journal Citation Reports* (lista JCR):

- P.1.** Synthesis of 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates and Preliminary Assay of Their β 1,4-GalT Inhibitory and Anti-Cancer Properties
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawołek, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Kuczak, M. Skonieczna, R. Musioł
Bioorganic Chemistry (2019), *84*, 326-338 (IF₂₀₁₉ = 4,831; 100 pkt MEiN)
- P.2.** 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates: Modifications in the Linker Structure and Their Effect on the Cytotoxicity of the Obtained Compounds
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawołek, A. Pluta, K. Erfurt, A. Domiński, P. Kurcok
Molecules (2019), *24*, 4181 (IF₂₀₁₉ = 3,267; 140 pkt MEiN)
- P.3.** 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates Containing Sulfur at the Sugar Anomeric Position — Synthesis and Preliminary Evaluation of Their Cytotoxicity
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawołek, A. Hadasik, K. Erfurt
Molecules (2020), *25*, 4174 (IF₂₀₂₀ = 4,412; 140 pkt MEiN)
- P.4.** Glycoconjugation of Quinoline Derivatives Using the C-6 Position in Sugars as a Strategy for Improving the Selectivity and Cytotoxicity of Functionalized Compounds
M. Domińska*, G. Pastuch-Gawołek, M. Skonieczna, W. Szeja, A. Domiński, P. Kurcok
Molecules (2022), *27*, 6918 (IF₂₀₂₁ = 4,927; 140 pkt MEiN)
- P.5.** Synthesis and Preliminary Evaluation of the Cytotoxicity of Potential Metabolites of Quinoline Glycoconjugates
M. Domińska*, G. Pastuch-Gawołek*, A. Domiński, P. Kurcok, K. Erfurt
Molecules (2022), *27*, 1040 (IF₂₀₂₁ = 4,927; 140 pkt MEiN)
- P.6.** Biodegradable pH-Responsive Micelles Loaded with 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates for Warburg Effect Based Tumor Targeting
A. Domiński, **M. Krawczyk**, T. Konieczny, M. Kasprów, A. Foryś, G. Pastuch-Gawołek, P. Kurcok*
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (2020), *154*, 317-329 (IF₂₀₂₀ = 5,571; 100 pkt MEiN)
- P.7.** Shell-Sheddable Micelles Based on Poly(ethylene glycol)-hydrazono-poly[R,S]-3-hydroxybutyrate Copolymer Loaded with 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates as a Dual Tumor-Targeting Drug Delivery System
A. Domiński*, **M. Domińska**, M. Skonieczna, G. Pastuch-Gawołek, P. Kurcok*
Pharmaceutics (2022), *14*, 290 (IF₂₀₂₁ = 6,525; 100 pkt MEiN)
- P.8.** Overcoming Hypoxia-Induced Chemoresistance in Cancer Using a Novel Glycoconjugate of Methotrexate
M. Woźniak, G. Pastuch-Gawołek, S. Makuch, J. Wiśniewski, P. Ziółkowski, W. Szeja, **M. Krawczyk***, S. Agrawal*
Pharmaceutics (2021), *14*, 13 (IF₂₀₂₁ = 5,215; 100 pkt MEiN)

P.9. The Effect of a New Glucose-Methotrexate Conjugate on Acute Lymphoblastic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma Cell Lines

M. Woźniak, S. Makuch, G. Pastuch-Gawołek, J. Wiśniewski, W. Szeja, M. Nowak, **M. Krawczyk***, S. Agrawal*

Molecules (2021), 26, 2547 (IF₂₀₂₁ = 4,927; 140 pkt MEiN)

P.10. In Vitro and In Vivo Efficacy of a Novel Glucose-Methotrexate Conjugate in Targeted Cancer Treatment

M. Woźniak, G. Pastuch-Gawołek, S. Makuch, J. Wiśniewski, T. Krenács, P. Hamar, A. Gamian, W. Szeja, D. Szkudlarek, **M. Krawczyk***, S. Agrawal*

International Journal of Molecular Sciences (2021), 22, 1748 (IF₂₀₂₁ = 6,208; 140 pkt MEiN)

Sumaryczny IF wyżej wymienionych prac = 50,810

Sumaryczna liczba punktów MEiN wyżej wymienionych prac = 1240

Wskaźnik Impact Factor (IF) został podany zgodnie z rokiem opublikowania. W przypadku prac opublikowanych w roku 2022 został przyjęty IF z roku 2021.

Punkty Ministra Edukacji i Nauki (MEiN) zostały podane zgodnie z najnowszym wykazem z dn. 21.12.2021 roku.

Treść wyżej wymienionych publikacji P.1 - P.10 znajduje się w załączniku do niniejszej rozprawy. Wersje elektroniczne publikacji wraz z opublikowanymi materiałami uzupełniającymi znajdują się w dołączonej do rozprawy płycie CD.

WKŁAD AUTORSKI DOKTORANTKI:

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; opracowanie procedur i przeprowadzenie syntez chemicznych pochodnych cukrowych, pochodnych chinoliny i metotreksatu oraz glikokoniugatów, a także oczyszczenie otrzymanych związków; wykonanie oraz analiza widm NMR w celu potwierdzenia struktur otrzymanych związków; oznaczenie parametrów fizykochemicznych otrzymanych związków; przeprowadzenie hodowli komórkowych oraz wykonanie testów cytotoksyczności; opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptów publikacji; korespondencja z redakcją czasopism.

Oświadczenia współautorów dotyczące ich szczegółowego wkładu autorskiego w powstanie poszczególnych publikacji znajdują się w dalszej części niniejszej rozprawy.

* autor korespondencyjny

nazwisko rodowe doktorantki: Krawczyk

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

2Me8HQ	8-hydroksychinaldyna (<i>ang. 8-hydroxyquinaldine</i>)
8-HQ	8-hydroksychinolina (<i>ang. 8-hydroxyquinoline</i>)
Ac	grupa acetylowa (acetyl)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (<i>ang. adenosine triphosphate</i>)
β 1,4-GalT	β -1,4-galaktozylotransferaza (<i>ang. β-1,4-galactosyltransferase</i>)
CT-DNA	kwas deoksyrybonukleinowy z grasicy cielęcej (<i>ang. calf thymus DNA</i>)
CuAAC	cykloaddycja azydo-alkinowa katalizowana jonami miedzi(I) (<i>ang. copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>)
DCM	dichlorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMSO	dimetylosulfotlenek
EDG	4,6- <i>O</i> -etylideno- α -D-glukoza (<i>ang. 4,6-O-ethylidene-α-D-glucose</i>)
ESI-MS	spektrometria mas z jonizacją przez elektrorozpylanie (<i>ang. electrospray ionisation mass spectrometry</i>)
eskulina	(6-eskuletynylo) 4'- <i>O</i> - β -D-galaktopiranozylo- β -D-glukopiranozyd
Gal	galaktoza
Glu	glukoza
GLUT	transporter glukozy (<i>ang. glucose transporter</i>)
HCT-116	linia komórkowa raka jelita grubego
HRMS	wysokorozdzielcza spektrometria mas (<i>ang. high-resolution mass spectrometry</i>)
IC ₅₀	stężenie badanej substancji hamujące wzrost populacji o 50% w odniesieniu do warunków kontrolnych (<i>ang. inhibitory concentration</i>)
<i>in vitro</i>	analizy wykonywane w warunkach laboratoryjnych
<i>in vivo</i>	analizy wykonywane w organizmie żywym
<i>i</i> -PrOH	alkohol izopropylowy
MCF-7	linia komórkowa raka piersi
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy
MTX	metotreksat (<i>ang. methotrexate</i>)
NaAsc	askorbinianu sodu (<i>ang. sodium ascorbate</i>)
NHDF-Neo	linia komórkowa prawidłowych ludzkich fibroblastów skóry noworodka
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (<i>ang. nuclear magnetic resonance</i>)
PEG	poli(glikol etylenowy)
PET	pozytonowa tomografia emisyjna (<i>ang. positron emission tomography</i>)
RP-HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (<i>ang. high-performance liquid chromatography reverse phase</i>)
RuAAC	cykloaddycja azydo-alkinowa katalizowana jonami rutenu(II) (<i>ang. ruthenium(II)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>)
THF	tetrahydrofuran
TLC	cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (<i>ang. thin layer chromatography</i>)
UDP	urydyno-5'-difosforan (<i>ang. uridine diphosphate</i>)
UV-VIS	spektroskopia w nadfiolecie i świetle widzialnym (<i>ang. ultraviolet-visible spectroscopy</i>)

1. CEL I ZAKRES BADAŃ

Wraz z postępem nauki możliwe stało się opracowanie nowych farmaceutyków do wykorzystania w leczeniu szerokiej gamy chorób. Jednakże wciąż istnieje ogromne zapotrzebowanie na nowe, skuteczne i selektywne sposoby leczenia chorób nowotworowych, które stanowią jedną z wiodących przyczyn przedwczesnych zgonów ludzi na całym świecie oraz jedno z największych wyzwań współczesnej nauki. Wysoka ogólnoustrojowa toksyczność stosowanych leków oraz rosnąca oporność komórek nowotworowych na znaczną liczbę farmaceutyków coraz bardziej ograniczają możliwość uzyskania pomyślnych wyników stosowanych terapii przeciwnowotworowych. Dlatego konieczne jest poszukiwanie nowych, skutecznych chemioterapeutyków, charakteryzujących się niską toksycznością ogólnoustrojową i wysokim profilem selektywności.

Węglowodany są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, a także stanowią jedną z głównych klas związków naturalnych występujących w organizmach żywych, gdzie pełnią istotne funkcje w wielu procesach, zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych. Rozwój glikobiologii, czyli nauki zajmującej się badaniem struktury i funkcji cukrów oraz ich połączeń, pozwolił odkryć znaczący potencjał terapeutyczny tych związków. Glikokoniugacja, rozumiana jako łączenie cząsteczek cukru z innym związkiem poprzez tworzenie wiązania kowalencyjnego, jest szeroko stosowana przy projektowaniu nowych pochodnych, wspomagających walkę z różnego rodzaju chorobami, w tym z nowotworami. Strategia glikokoniugacji ma na celu poprawę biodostępności, selektywności, a także rozpuszczalności potencjalnych leków w układach biologicznych. Proleki na bazie cukrów wzbudzają duże zainteresowanie w leczeniu nowotworów ze względu na możliwość ich ukierunkowanego dostarczenia do komórek nowotworowych, charakteryzujących się zwiększonym zapotrzebowaniem na glukozę i nadekspresją jej transporterów.

Doniesienia literaturowe wskazują, iż w projektowaniu potencjalnych farmaceutyków szeroko stosowane są związki organiczne zawierające w swojej strukturze fragment *N*-heterocykliczny. Można więc sądzić, iż jego obecność ma istotny wpływ na wywieraną aktywność biologiczną. Wśród takich związków na szczególną uwagę zasługuje cząsteczka 8-hydroksychinoliny, wykazująca szerokie spektrum aktywności biologicznej. Jej potencjał przeciwnowotworowy związany jest ze zdolnością do chelatowania jonów metali dwuwartościowych, niezbędnych do angiogenezy i wzrostu komórek nowotworowych. Z kolei przykładem powszechnie stosowanego leku *N*-heterocyklicznego o dobrze udokumentowanych właściwościach cytostatycznych, jak i przeciwpalnym jest metotreksat.

W oparciu o przesłanki literaturowe za cel badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej obrano syntezę glikokoniugatów związków biologicznie aktywnych zawierających w swojej strukturze fragment *N*-heterocykliczny oraz ocenę aktywności biologicznej otrzymanych połączeń w zakresie ich potencjału przeciwnowotworowego.

W ramach realizacji pracy można wyróżnić zasadnicze etapy obejmujące:

1. syntezę bloków budulcowych pochodnych cukrowych oraz pochodnych 8-hydroksychinoliny i metotreksatu;
2. syntezę glikokoniugatów z wykorzystaniem katalizowanej miedzi(I) reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydo-alkinowej;

3. potwierdzenie struktur zsyntetyzowanych związków za pomocą metod spektroskopowych (NMR i HRMS) oraz wyznaczenie ich właściwości fizykochemicznych;
4. wstępną ocenę aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych połączeń w warunkach *in vitro* wobec modelowych linii komórek nowotworowych oraz komórek zdrowych z wykorzystaniem testu cytotoksyczności MTT;
5. szczegółową ocenę aktywności biologicznej wybranych związków, mającą na celu przybliżenie możliwego mechanizmu ich działania.

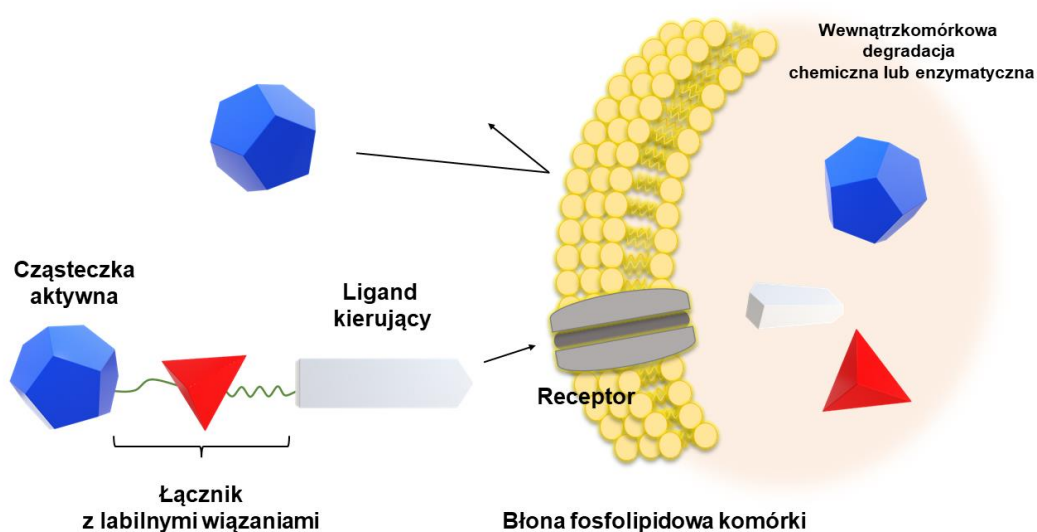
2. WPROWADZENIE DO TEMATYKI BADAWCZEJ

Mianem nowotworów określa się grupę chorób charakteryzujących się mutacjami lub uszkodzeniami w ekspresji genów, co prowadzi do zaburzeń w prawidłowym podziale i różnicowaniu się komórek. W rezultacie, brak homeostazy pomiędzy replikacją a śmiercią komórkową sprzyja niekontrolowanemu namnażaniu populacji nieprawidłowych komórek. Według najnowszego raportu Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC, *ang. International Agency for Research on Cancer*) w 2020 roku odnotowano 19,3 mln nowych przypadków zachorowań na nowotwory na całym świecie i prawie 10 mln zgonów z tego powodu. Liczby te stale rosną, tym samym wyprzedzając choroby sercowo-naczyniowe jako wiodącą przyczynę zgonów ludzi w większości krajów [1]. Istnieje wprawdzie wiele strategii terapeutycznych stosowanych w leczeniu nowotworów, w tym chirurgia, radioterapia i chemioterapia, jednakże w wielu przypadkach nie są one wystraszająco skuteczne. Niska selektywność większości obecnie stosowanych chemioterapeutyków skutkuje gromadzeniem leku w zdrowej tkance, tym samym uszkadzając wszystkie namnażające się komórki, prowadząc do toksyczności ogólnoustrojowej i poważnych efektów ubocznych [2]. Dane te uzasadniają konieczność prowadzenia nowatorskich badań w zakresie racjonalnego projektowania bardziej selektywnych, a więc i bezpieczniejszych leków, wspomagających walkę z różnymi typami nowotworów.

Jedną z możliwości poprawy skuteczności i bezpieczeństwa chemioterapeutyków jest opracowanie ukierunkowanych terapii, które pozwolą na selektywne oddziaływanie leku z komórkami patologicznymi. Koncepcja leków celowanych polega na możliwości dostarczenia środka terapeutycznego precyzyjnie w miejsce zmienione chorobowo, unikając w ten sposób nieswoistego wychwyty przez komórki zdrowe i związanej z tym toksyczności. W takim przypadku, możliwe jest zmniejszenie dawki terapeutycznej leku, by osiągnąć jego wystarczające wewnątrzkomórkowe stężenie, w porównaniu z lekami tradycyjnymi. Zaprojektowane cząsteczki zazwyczaj ukierunkowane są na określone enzymy, białka receptorowe i szlaki sygnałowe, tym samym zakłócając różnorodność procesów komórkowych [3-6].

Wśród celowanych systemów dostarczania substancji aktywnych wyróżnić można nośniki leków obejmujące m.in.: liposomy, micelle, hydrożele, mikrosfery i nanocząstki polimerowe. Ich działanie polega na fizycznym uwięzieniu substancji aktywnych, a następnie ich kontrolowanym uwolnieniu pod wpływem określonych bodźców w miejscu docelowym [7,8]. Inną strategią jest kowalencyjne łączenie środka terapeutycznego z odpowiednim ligandem (np. cukrem, peptydem, witaminą, białkiem lub przeciwciałem) spełniającym rolę transportera. Ukierunkowane dostarczanie w tym przypadku można osiągnąć poprzez celowanie w różne receptory znajdujące się na powierzchni błony chorej komórki, do których powinowactwo wykazuje dołączony ligand kierujący i których ekspresja w przypadku komórek chorych jest znacznie wyższa w porównaniu

z komórkami prawidłowymi. Kryteriami powodzenia tego podejścia są zdolność wiązania ligandu z potencjalnym receptorem, a także brak wcześniejszej degradacji proleku w krążeniu ogólnoustrojowym przed dotarciem do receptora [4-6]. Na strukturę leku celowanego zazwyczaj składa się kilka elementów: ligand kierujący, łącznik i cząsteczka aktywna (Rysunek 1). Każdy z tych fragmentów powinien zostać skrupulatnie zaprojektowany, ponieważ od każdego z nich zależy skuteczność działania całego leku. Ligand kierujący odgrywa kluczową rolę w selektywnym dostarczeniu ładunku terapeutycznego do docelowych komórek, wyrażających nadekspresję specyficznych receptorów. Jego skuteczność jest modulowana przez swoistość wobec komórek nowotworowych w porównaniu z komórkami normalnymi. Łącznik między ligandem a ładunkiem terapeutycznym powinien zostać zaprojektowany tak, by zapewnić cząsteczce stabilność w krążeniu ogólnoustrojowym i być łatwo rozszczepialny po dotarciu do komórek docelowych. Z kolei cząsteczka aktywna jest składnikiem leku odpowiedzialnym za wywieranie określonego efektu farmakologicznego po dotarciu do miejsca docelowego [5,6,9].



Rysunek 1. Koncepcja terapii ukierunkowanych na nowotwór

Innym ważnym czynnikiem, na który należy zwrócić uwagę podczas projektowania proleków do wykorzystania w terapiach ukierunkowanych jest środowisko, w którym rosną komórki nowotworowe. Mikrośrodowisko wspierające przeżycie i rozwój komórek nowotworowych, charakteryzuje się: niskim stężeniem tlenu, zmienionym pH, podwyższonym poziomem reaktywnych form tlenu oraz glutationu, zwiększonym zapotrzebowaniem na niektóre mikroelementy itd. Właściwości te odgrywają zasadniczą rolę w progresji i przerzutach komórek, a także są cenną wskazówką podczas opracowywania nowych terapii celujących w nowotwory [4,10].

Koniugaty sacharydów z cząsteczkami biologicznie aktywnymi wydają się być idealnymi kandydatami na proleki do wykorzystania w terapiach celowanych, co dokładniej zostało omówione w następnych rozdziałach niniejszej rozprawy.

2.1. Glikokoniugacja jako strategia poprawy aktywności i selektywności potencjalnych leków

Podczas projektowania nowych leków bardzo ważne jest zrozumienie i wykorzystanie różnic pomiędzy komórkami nowotworowymi a komórkami prawidłowymi. Jedną z takich różnic jest specyficzny metabolizm glukozy przez komórki nowotworowe. Zaobserwowano, że komórki nowotworowe wykazują zwiększony wychwyty glukozy w porównaniu z komórkami zdrowymi, a także metabolizują ją w specyficzny sposób w celu uzyskania energii potrzebnej do wzmocnienia proliferacji. Obserwacja ta znana jest pod nazwą efektu Warburga i wynika z mitochondrialnych zmian metabolicznych [11]. Polega na tym, że komórki nowotworowe produkują swoją energię poprzez „glikolizę tlenową”, konsekwencją czego jest wytwarzanie dużych ilości mlecza, nawet w obecności tlenu, a jej poziom jest znacznie wyższy niż w normalnych komórkach, dla których głównym źródłem energii jest mitochondrialna fosforylacja oksydacyjna [12]. Może się wydawać, że pod względem produkcji ATP, komórki nowotworowe wykształciły mniej wydajny metabolizm, jednakże stanowiłoby to problem tylko wtedy, gdyby brakowało zasobów. Komórki przystosowały się do zapewnienia sobie wystarczającej ilości składników odżywczych i energii do przeprowadzenia procesów zachodzących podczas cyklu komórkowego, wytwarzając pewne specyficzne dla nich mechanizmy. Tempo metabolizmu glukozy w komórkach nowotworowych jest ogromne, co równoważy niewielki zysk energetyczny względem fosforylacji oksydacyjnej. W rzeczywistości ilość wytwarzanego ATP w danym okresie czasu jest porównywalna, gdy stosuje się dowolną formę metabolizmu glukozy [12,13]. Nasilony proces glikolizy jest więc związany z większym zapotrzebowaniem komórek na glukozę, czemu towarzyszy nadekspresja transporterów GLUT w komórkach nowotworowych. Są to specjalne białka transbłonowe, które pośredniczą w aktywnym transporcie cząsteczek cukrów do wnętrza komórki. Wśród nich GLUT1, kodowany przez gen SLC2A1, jest najlepiej scharakteryzowanym i najczęściej nadekspresjonowanym transporterem w wielu ludzkich komórkach nowotworowych. Może wiązać się z glukozą, galaktozą, mannozą, glukozaminą lub kwasem askorbinowym, a następnie transportować te cząsteczki przez błony komórkowe. Wiele badań wykazało, że wysoki poziom ekspresji GLUT1 jest silnie skorelowany ze złym rokowaniem w wielu chorobach nowotworowych [14-17]. Ta unikalna właściwość jest podstawą technik obrazowania, takich jak pozytonowa tomografia emisyjna (PET), która śledzi radioaktywnie znakowany analog glukozy 2-deoksy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glukozę (¹⁸F-FDG). Jest to szeroko stosowane narzędzie diagnostyczne do wizualizacji tkanek nowotworowych i ich przerzutów ze względu na tendencję komórek nowotworowych do wychwyty glukozy w szybszym tempie niż w przypadku większości normalnych tkanek [18].

Nadekspresja GLUT1 w proliferujących komórkach nowotworowych, w porównaniu z komórkami prawidłowymi i związana z tym wysoka wydajność wychwyty glukozy (lub innego cukru), stała się atrakcyjnym celem do selektywnego dostarczania środków terapeutycznych, uzyskiwanych przez sprzęganie związków biologicznie czynnych z jednostkami cukru. W konsekwencji, proleki na bazie węglowodanów, ingerując w szlak glikolityczny są w stanie akumulować się w tkankach nowotworowych, zmniejszając w ten sposób skutki uboczne terapii. Skuteczność powstałego glikokoniugatu jest determinowana przede wszystkim przez aktywność środka terapeutycznego, podczas gdy fragment cukrowy odgrywa rolę selektywnego transportera. Jednakże, należy mieć na uwadze, że na zdolność GLUT do wiązania i transportu substratu mogą mieć wpływ takie czynniki, jak struktura węglowodanu, pozycja jego podstawienia, rodzaj łączy i właściwości samych aglikonów [19-21].

Pierwszym przykładem leku aktywnie transportowanego przez GLUT jest odkryty w 1995 roku glufosfamid. Jest to koniugat D-glukozy i ifosfamidu – środka alkilującego stosowanego w leczeniu różnych typów nowotworów. Lek ten przeszedł wiele badań klinicznych w leczeniu różnych typów raka i ostatecznie leczenie glufosfamidem okazało się bezpieczniejsze i bardziej selektywne w porównaniu z przypadkami stosowania samego aglikonu [22,23]. Po sukcesie glufosfamid, strategia glikokoniugacji zyskała popularność wśród wielu grup badawczych. Duże zainteresowanie w terapii nowotworów wzbudziły kompleksy platyny. Przykładem jest oksaliplatyna, powszechnie stosowany środek chemioterapeutyczny, głównie w terapii raka jelita grubego. Koniugacja z D-glukozą lub D-galaktozą za pomocą różnych łączników została wprowadzona jako strategia poprawy zdolności leku do celowania w nowotwory i zminimalizowania licznych skutków ubocznych wynikających z jego stosowania. Glikokoniugacja znacznie poprawiła siłę działania przeciwnowotworowego *in vitro* leku macierzystego wobec różnych linii komórek nowotworowych, zwłaszcza MCF-7 (linia komórkowa raka piersi) oraz HT29 (linia komórkowa raka okrężnicy). Badania komórkowe z udziałem inhibitorów GLUT1 – floryzyna oraz kwercetyna, wykazały znaczny spadek cytotoksyczności związków, co potwierdza udział tych transporterów w wychwycie glikokoniugatów. Z kolei dzięki poprawie rozpuszczalności w wodzie, lek może być wydalany w stanie nienaruszonym przez nerki, tym samym zmniejszając toksycność ogólnoustrojową i zwiększając bezpieczeństwo terapii [24,25]. Po tym odkryciu systematycznie zgłaszano syntezę różnych glikokoniugatów zawierających w swoich strukturach kompleksy z Pt(II) lub Pt(IV), a także z innymi metalami, takimi jak Ru(II), Pd(II), Au(III), Au(I), Fe(III), Cu(II), Co(II), Sn(IV). Wyniki badań z ich udziałem ukazują potencjał glikokoniugacji w kierunku selektywnego niszczenia komórek nowotworowych [26-28]. Grupą związków, których aktywność biologiczna jest związana ze zdolnością do koordynowania metali są również tiosemikarbony, znane chelatory żelaza. Połączenie takiego rusztowania z fragmentem węglowodanowym za pomocą łącznika disiarczkowego poskutkowało otrzymaniem cząsteczki o polepszonej selektywności względem komórek raka jelita grubego (Caco-2). Eksperymenty z udziałem znacznika fluorescencyjnego (2-NBDG), stosowanego do monitorowania wychwyty glukozy przez komórki, wykazały że mechanizm działania koniugatu prawdopodobnie opiera się na jego preferencyjnym wychwycie przez komórki nowotworowe z nadekspresją GLUT, a następnie uwolnieniu jednostki zdolnej do chelatacji żelaza [29]. Zaprojektowano również wiele glikokoniugatów opartych na popularnych lekach przeciwnowotworowych, takich jak doksorubicyna [30], paklitaksel [31,32] czy chlorambucyl [33,34]. Pomimo szerokiego zakresu działania tych leków, ich stosowanie wiąże się z wysoką toksycnością ogólnoustrojową, powodującą niepożądane skutki uboczne dla większości pacjentów korzystających z terapii przeciwnowotworowych. Dodatkowo związki te wykazują słabą rozpuszczalność w wodzie. Glikokoniugacja miała na celu przeciwdziałać tym efektom, poprzez umożliwienie ukierunkowanego dostarczenia leków w miejsce nowotworu. Zabieg koniugowania z pochodnymi glukozy poprawił rozpuszczalność i stabilność leków macierzystych, a także wykazał selektywną cytotoksyczność utworzonych glikokoniugatów wobec różnych linii komórek nowotworowych o wysokim poziomie ekspresji GLUT. Stosowne badania wykazały, że translokacja glikokoniugatów do komórek przynajmniej częściowo odbywa się za pomocą transporterów GLUT [30-34]. Wśród glikozyloowanych proleków zaprojektowanych w oparciu o efekt Warburga na uwagę zasługują również pochodne tryptolidu, diterpenoidu wyizolowanego z tradycyjnej chińskiej rośliny leczniczej. Tryptolid wykazuje silne działanie przeciwnowotworowe *in vitro* oraz *in vivo* wobec komórek raka trzustki oraz nerek, jednak jego rozwój kliniczny jest utrudniony przez wysoką toksycność ogólnoustrojową i niską rozpuszczalność w wodzie. Fosforylowana pochodna tryptolidu znajduje się obecnie w fazie

badan klinicznych, co wskazuje na ogromny potencjał przeciwnowotworowy macierzystego związku. Poprzez sprzęganie tryptolidu z glukozą za pomocą różnych łączników, osiągnięto lepszą rozpuszczalność, a także selektywność wobec komórek nowotworowych ze stwierdzoną nadekspresją transporterów glukozy. Testy cytotoksyczności w połączeniu z inhibitorem GLUT1 – WZB117 sugerują, że transport glutryptolidu jest zależny od GLUT1. Badania aktywności przeciwnowotworowej *in vivo* przy użyciu mysiego modelu z rakiem prostaty wykazały, że glukokoniugat tryptolidu hamuje wzrost guza i znacznie przedłuża przeżycie leczonych zwierząt. Przykład ten ukazuje potencjał glikokoniugacji do wykorzystania związków naturalnych [35,36].

Powyższe przykłady prezentują możliwości wykorzystania efektu Warburga w celowanej terapii przeciwnowotworowej. Co ważne, każdorazowo podczas oceny zdolności antyproliferacyjnej związków, zostały przeprowadzone testy z wykorzystaniem różnych inhibitorów GLUT, które potwierdziły, że wychwytywanie komórkowe badanych glikokoniugatów przynajmniej częściowo bazuje na transporterach GLUT. Dokładna ocena rodzaju transportu i wychwytywania glikokoniugatów jest ważną kwestią, której należy poświęcić uwagę podczas badań aktywności glikokoniugatów. Warto podkreślić, że zostały przedstawione tutaj jedynie nieliczne przykłady glikokoniugatów, podczas gdy w literaturze naukowej jest wiele doniesień na temat glikokoniugacji różnych aktywnych cząsteczek. Po wpisaniu hasła „glycoconjugates” w bazie Scopus ukazuje się blisko jedenaście tysięcy pozycji literaturowych, co świadczy o dużym zainteresowaniu tą tematyką badawczą. Liczne glikokoniugaty związków biologicznie aktywnych okazały się obiecującymi cząsteczkami o lepszej rozpuszczalności, zmniejszonej toksyczności ogólnoustrojowej i zwiększonej aktywności w stosunku do związków macierzystych, zarówno podczas rutynowych badań cytotoksyczności *in vitro*, jak i podczas badań laboratoryjnych *in vivo* na modelach zwierzęcych. Niewiele jednak jest doniesień na temat wykorzystania glikokoniugatów w badaniach klinicznych, które potwierdziłyby skuteczność działania tej strategii, co ukazuje, że potencjał glikokoniugacji nie został jeszcze w całości odkryty i zbadany.

2.2. 8-Hydroksychinolina oraz glikokoniugaty pochodne 8-hydroksychinoliny wykazujące aktywność przeciwnowotworową

W ciągu ostatnich lat podjęto liczne próby kontrolowania rozwoju nowotworu. Powszechnie wiadomo, że komórki nowotworowe wykazują zwiększone zapotrzebowanie na jony metali, takie jak Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} . Wśród nich miedź oraz jej kompleksy były intensywnie badane pod kątem zastosowań przeciwnowotworowych, ponieważ dowiedziono, że jej obecność jest istotnym czynnikiem dla szybkiego wzrostu nowotworu, jak i tworzenia przerzutów. Liczne badania kliniczne wykazały, że podwyższone stężenie miedzi w surowicy i w tkankach pacjentów z różnymi typami nowotworów jest bezpośrednio związane z progresją choroby. Obserwacja ta sugeruje, że jony miedzi mogą być jednym z selektywnych celów leczenia nowotworów. Zastosowanie środków chelatujących metale w terapii przeciwnowotworowej pozwala na wyeliminowanie czynnika ważnego dla wzrostu nowotworu i wydaje się być idealną możliwością kontrolowania poziomu miedzi w organizmie [37-41]. Powszechny sukces cisplatyny w leczeniu klinicznym różnego rodzaju nowotworów, zapoczątkował dynamiczny rozwój badań nad syntezą innych leków opartych na metalach jako ważnych środkach terapeutycznych. Do znanych chelatorów miedzi należą tetratiomolibdenian, trientyna i D-penicylamina. Badania kliniczne wykazały, że związki te skutecznie hamują angiogenezę niektórych typów nowotworów. Niemniej jednak są one związane z niepożądanymi skutkami ubocznymi, ponieważ działają wysoce nieselektywnie [39-41]. Pomimo znacznego rozwoju, temat ten nie traci na popularności.

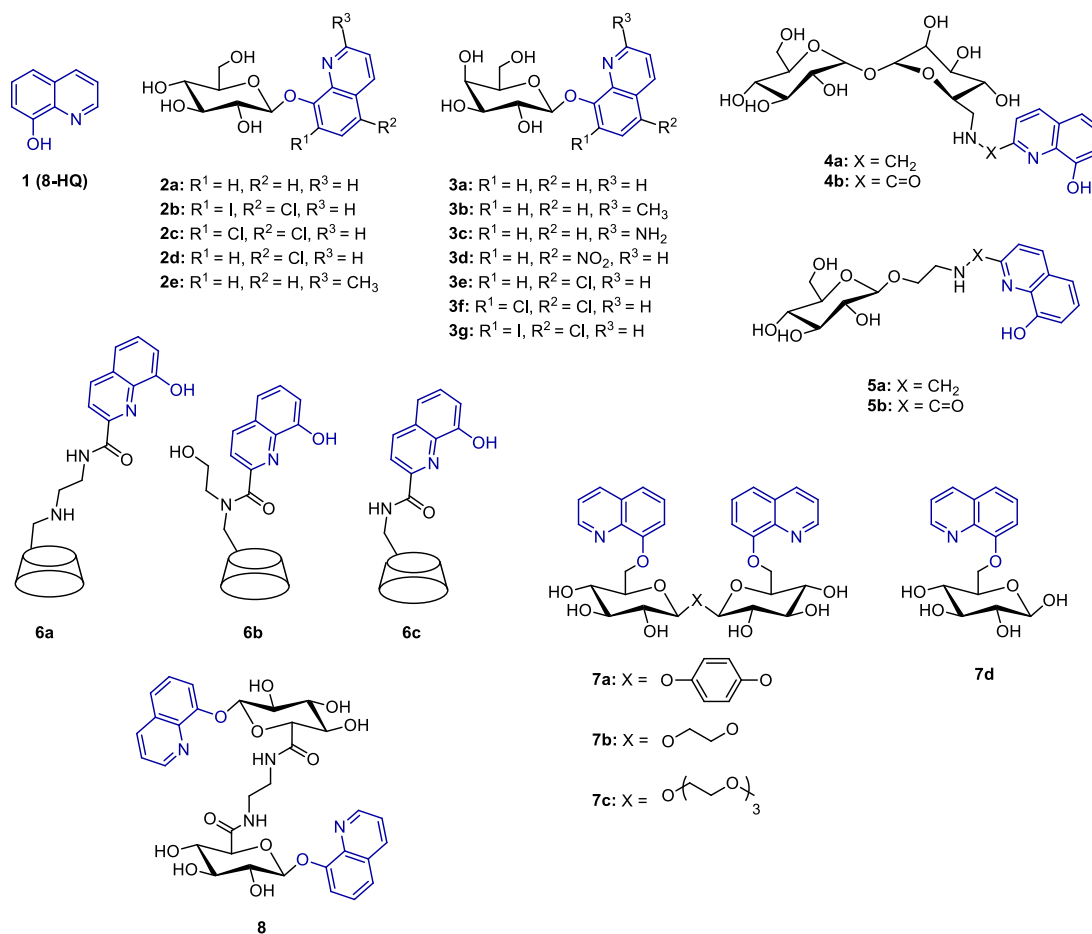
Wśród nowych cząsteczek zgłaszanych do badań nad potencjalną aktywnością przeciwnowotworową, znaczna część z nich oparta jest na układach heterocyklicznych zawierających azot. Ponadto fragmenty *N*-heterocykliczne są powszechnymi elementami strukturalnymi już dostępnych na rynku leków, co plasuje je jako uprzywilejowane i godne uwagi struktury podczas projektowania farmaceutyków [42,43].

Szczególne zainteresowanie wśród związków heterocyklicznych budzą cząsteczki oparte na szkielecie chinoliny. Chinolina i jej pochodne odgrywają istotną rolę w dziedzinie chemii organicznej, nie tylko jako kluczowe jednostki strukturalne wielu naturalnych związków oraz ważnych leków, ale także są użytecznymi blokami budulcowymi dla nowych biologicznie czynnych związków [44-46]. Przykładem łatwej do modyfikacji cząsteczki, znanej z dobrego powinowactwa do kationów różnych metali oraz szerokiego spektrum aktywności biologicznej jest 8-hydroksychinolina (8-HQ) **1** (Rysunek 2). 8-HQ jest heteroaromatycznym związkiem organicznym, charakteryzującym się podwójną strukturą pierścieniową, na którą składa się pirydyna skondensowana z pierścieniem benzenowym podstawionym grupą hydroksylową. Jej szkielet jest uprzywilejowaną strukturą, wykorzystywaną do projektowania związków wykazujących różnorodne działanie terapeutyczne, takich jak: kliochinol, intestopan, nitroksolina lub chlorochinaldol. W literaturze można znaleźć wiele doniesień na temat ich właściwości przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych, przeciwprzywrotniakowych, przeciwneurodegeneracyjnych oraz odkażających i antyseptycznych [47-50]. Ponadto dla związków zawierających w swojej strukturze szkielet 8-HQ, w ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania aktywnością przeciwnowotworową, która wynika ze zdolności do chelatowania jonów miedzi niezbędnych w procesie kercynogenezy. Tworzenie kompleksów z metalami przez 8-HQ zostało szeroko opisane w literaturze i stało się obiecującą strategią terapeutyczną w praktyce klinicznej. Jony metali są koordynowane przez dwa elektronodonorowe miejsca – atom tlenu fragmentu fenolowego oraz atom azotu w pierścieniu pirydynowym. W związku z tym, 8-HQ tworzy chelaty z jonami metali, które następnie zostają usunięte z ustroju, dzięki czemu z organizmu zostaje wyeliminowany czynnik ważny dla wzrostu nowotworu [49-51]. Związki chinolinowe wykazują aktywność antyproliferacyjną w szerokim spektrum różnych nowotworów, ponieważ mogą one ingerować w wiele różnych szlaków sygnałowych i enzymatycznych [44,45]. Ponadto układ chinolinowy ze względu na swoją płaską strukturę może interkalować pomiędzy pary zasad DNA, prowadząc do zmian konformacyjnych i w ostateczności do pęknięć nici DNA i cytotoksyczności [52].

Pochodne 8-HQ wykazują dużą różnorodność działania, jednakże podobnie jak inne preparaty z grupy chelatorów metali, mają jedynie ograniczone zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych. Tradycyjne chelatory nie są specyficzne wobec komórek patologicznych, więc mogą oddziaływać z wszystkimi jonami w ustroju, a także różnymi białkami i enzymami napotkanymi na drodze do komórki nowotworowej. Wynika to z faktu, że jony metali przejściowych są niezbędnymi kofaktorami do prawidłowego przebiegu wielu ważnych procesów komórkowych, w tym istotnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Są one kluczowe dla funkcji niektórych enzymów i biorą udział w wielu reakcjach utleniania-redukcji. W związku z tym, tradycyjne chelatory mogą powodować zaburzenia równowagi jonów metali w zdrowych tkankach, dlatego tak ważne jest utrzymanie ich homeostazy [37-41]. Potencjalne wykorzystanie 8-HQ w terapii licznych chorób utrudnia jej toksyczność oraz słaba biodostępność i wysoka hydrofobowość, dlatego tak istotne jest poszukiwanie nowych sposobów jej derywatywacji.

Jedną z możliwych modyfikacji mających na celu ukierunkowanie chelatorów na nowotwór, jest tworzenie glikokoniugatów. Koniugując pochodne 8-HQ z pochodnymi cukrów, można

skierować je bezpośrednio do komórek nowotworowych, ze względu na wspomniany już wcześniej fakt potwierdzonego zwiększonego zapotrzebowania komórek nowotworowych na glukozę. Obecność cukru może zapobiec niepożądanemu kompleksowaniu jonów metali znajdujących się w zdrowych tkankach, a tym samym działaniu ubocznemu leków. Dopiero po dotarciu do miejsca docelowego i uwolnieniu aktywnych aglikonów, związek będzie zdolny do koordynowania nadmiaru jonów. Tak utworzone proleki charakteryzują się lepszymi parametrami farmakokinetycznymi, właściwościami biologicznymi, a także większą biodostępnością niż związki macierzyste [19,53]. Wykorzystanie połączeń 8-HQ z fragmentami cukrów zostało odnotowane w kilku pracach (Rysunek 2).



Rysunek 2. 8-HQ oraz opisane w literaturze glikokoniugaty pochodne 8-HQ

W literaturze opisano głównie bezpośrednie połączenie cukru z pochodnymi 8-HQ poprzez utworzenie wiązania *O*-glikozydowego. Tematem tym kompleksowo zajął się w latach 2012-2015 zespół G. Vecchio. Zsyntezowano szereg glikozydów pochodnych 8-HQ zawierających jednostkę D-glukozy **2** lub D-galaktozy **3** (Rysunek 2), a następnie oceniono je pod kątem aktywności antyproliferacyjnej względem komórek różnych typów nowotworów, zarówno bez, jak i z dodatkiem jonów Cu^{2+} . Wyniki wykazały, że w większości przypadków średnia aktywność antyproliferacyjna glikokoniugatów bez dodatku jonów Cu^{2+} była niższa w porównaniu z ich związkami macierzystymi. Natomiast po dodaniu do układu jonów Cu^{2+} , obserwowano aktywność glikokoniugatów zbliżoną do wyjściowych pochodnych 8-HQ. Autorzy nie badali dokładnych mechanizmów działania związków, jednakże sugerują, iż funkcje chelatujące niniejszych glikokoniugatów są maskowane poprzez obecność jednostki cukrowej aż do

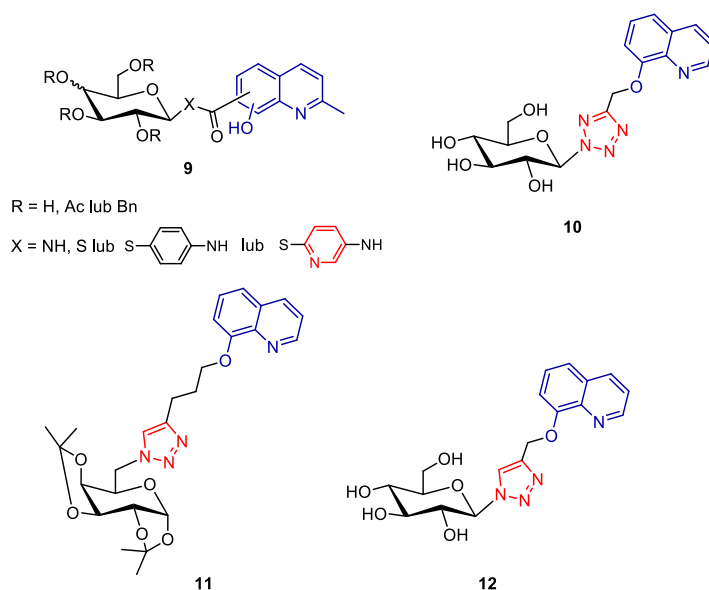
momentu uwolnienia aktywnego aglikonu, zachodzącego wskutek wewnątrzkomórkowej hydrolizy katalizowanej przez specyficzne β -glikozydazy [54-56].

W innej pracy ten sam zespół opisał właściwości biologiczne glikokoniugatów 8-HQ na bazie trehalozy **4** oraz pochodnych D-glukozy **5** (Rysunek 2). W przypadku tych związków, do połączenia cukru z 8-HQ wykorzystano łącznik przyłączony w pozycji C-2 pochodnej chinolinowej, pozostawiając wolną grupę 8-OH. Udowodniono, że glikokoniugaty te mogą tworzyć kompleksy z jonami Cu^{2+} i Zn^{2+} . Jedną z zalet tych pochodnych cukrów jest ich dobra rozpuszczalność w wodzie, która pozwala na badanie ich kompleksów z metalami w warunkach fizjologicznych. Glikokoniugaty nie wykazały aktywności antyproliferacyjnej względem badanych linii komórek nowotworowych (A2780 – rak jajnika, A549 – rak płuca i SHY5Y – nerwiak zarodkowy), co prawdopodobnie jest spowodowane utrudnionym dopasowaniem cząsteczek do transporterów GLUT. Natomiast dla otrzymanych pochodnych trehalozy wykazano wysoką aktywność antyoksydacyjną i antyagregacyjną. Oba czynniki są charakterystycznymi cechami patologicznymi w zaburzeniach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy Huntingtona. Uzyskane wyniki podkreślają potencjał chinolinowych pochodnych trehalozy jako środków terapeutycznych w chorobach neurodegeneracyjnych [57].

Kontynuując rozpoczęty wątek, G. Vecchio z zespołem w 2013 roku przeprowadzili badania nad nową serią glikokoniugatów, w których 8-HQ została związana z β -cyklodekstrynami – cyklicznymi oligosacharydami D-glukozy, poprzez wytworzenie koniugatów kowalencyjnych **6** (Rysunek 2) [58]. W kolejnych latach zespół kontynuował cykl badań syntezując nowe pochodne [59-61]. Takie układy, w porównaniu z wyjściowymi pochodnymi 8-HQ, są mniej toksyczne i lepiej rozpuszczalne w wodzie z uwagi na obecność reszty sacharydowej. Udowodniono, że związki te mogą tworzyć kompleksy z jonami miedzi(II) i cynku(II), a także wykazują wysoką zdolność antyoksydacyjną i antyagregacyjną, zatem mogą mieć spory potencjał jako środki terapeutyczne w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych związanych ze stresem oksydacyjnym, dyshomeostazą metali i agregacją białek, takimi jak choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona. Badania cytotoksyczności tych związków na różnych liniach komórkowych wykazały wysokie wartości IC_{50} świadczące o braku aktywności przeciwnowotworowej. Z drugiej strony, wysokie wartości IC_{50} wskazują, że przy zastosowaniu przeciwutleniającym i w leczeniu przeciwzakrzepowym można zastosować duże dawki leku bez przewidywanej toksyczności względem zdrowych tkanek [58-61].

Inny zespół badawczy udokumentował, że glikokoniugaty chinolinowe **7** mogą pełnić funkcje czynników interkalujących oddziałujących z DNA. Cząsteczki te wyróżniają się obecnością płaskiego układu aromatycznego, umożliwiającego im wsunięcie się pomiędzy sąsiadujące ze sobą pary zasad DNA. Wspomniane glikokoniugaty **7** (Rysunek 2) powstały poprzez sprzężenie 8-HQ z grupą 6-OH D-glukozy oraz symetryczne połączenie dwóch cząsteczek cukru poprzez różne łączniki, takie jak chinol, glikol lub glikol trietylenowy, podstawione w pozycji anomerycznej obu cząsteczek cukru. Przeprowadzone eksperymenty sugerują, że związki te są zdolne do wiązania się z DNA grasicy cielęcej (CT-DNA) poprzez interkalację, a fragment glukozy reguluje to oddziaływanie. Jednakże przedstawione glikokoniugaty oraz ich acetylowane odpowiedniki jedynie w umiarkowanym stopniu wpływały na zahamowanie wzrostu komórek ludzkiego raka piersi MDA-231. Najlepszą aktywność opisano dla pochodnej **7a** z pierścieniem aromatycznym w łączniku [62]. Opracowano także inne bisinterkalatory DNA, w których połączone wiązaniami amidowymi utworzonymi przez etylenodiaminę dwie cząsteczki kwasu glukuronowego poddano glikozylacji z cząsteczkami 8-HQ **8** (Rysunek 2). Eksperymenty dowodzą, że również ta struktura jest w stanie oddziaływać z CT-DNA [63].

W 2016 roku grupa badawcza G. Pastuch-Gawołek i R. Musioła przeprowadziła badania nad glikokoniugatami, w których kwasy hydroksychinolinokarboksylowe były łączone z fragmentem cukrowym D-glukozy lub D-galaktozy z wykorzystaniem ugrupowania karboksylowego, pozostawiając w uzyskanych glikokoniugatach wolną grupę hydroksylową, kluczową w procesie chelatowania jonów. Do szkieletu dwóch różnych kwasów chinolinowych: 2-metylo-8-hydroksy-7-karboksychinoliny lub 2-metylo-5-hydroksy-6-karboksychinoliny dołączono pochodne 1-aminocukrów, 1-tiocukrów, a także aminoarylo 1-tioglikozydów **9** (Rysunek 3). Połączenia te uzyskano poprzez wiązania amidowe lub tioestrowe, tworzone z wykorzystaniem klasycznych metod kondensacji w obecności powszechnie stosowanych czynników kondensujących. Otrzymane glikokoniugaty przebadano pod kątem aktywności przeciwnowotworowej względem komórek raka jelita grubego (linia HCT-116). Zaobserwowano, że znaczna poprawa aktywności biologicznej następuje w obecności łącznika heteroaromatycznego między cukrem a fragmentem chinoliny. Związki z dodatkowym pierścieniem pirydynowym w łączniku wykazały ponad 100 razy większą cytotoksyczność niż wyjściowe pochodne chinoliny. Przeprowadzono również eksperymenty oceniające możliwy mechanizm działania testowanych związków. Otrzymane glikokoniugaty wykazały zwiększoną aktywność w obecności wysokiego stężenia jonów miedzi(II), przy czym, jak potwierdziły stosowne badania, wiązało się to z generowaniem reaktywnych form tlenu oraz interkalacją DNA. Dalsze badania wykazały, że pomimo obecności podjednostki cukrowej, związki te nie były transportowane przez białka GLUT, a ich działanie nie zależy w sposób bezpośredni od metabolizmu glukozy [64].



Rysunek 3. Opisane w literaturze glikokoniugaty pochodne 8-HQ zawierające w łączniku fragment heteroaromatyczny

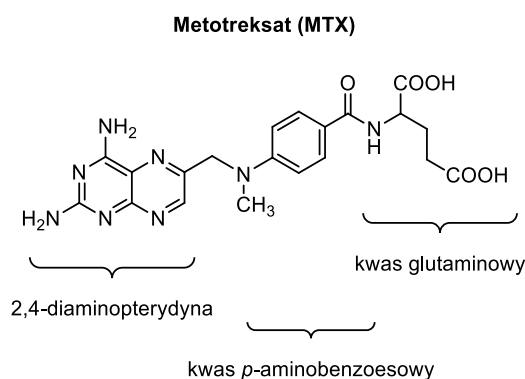
W literaturze stosunkowo niewiele jest doniesień na temat aktywności antyproliferacyjnej glikokoniugatów pochodnych 8-HQ zawierających w strukturze dodatkowy fragment heterocykliczny. W 2010 roku opisano syntezę glikokoniugatu pochodnego 8-HQ zawierającego w swojej strukturze łącznik tetrazolowy i jednostkę D-glukozy **10** (Rysunek 3). Związek ten wykazał wysoką aktywność cytotoksyczną względem komórek raka piersi (MCF-7), porównywalną z aktywnością szeroko stosowanego leku cisplatyny. Ponadto glikokoniugat, dzięki obecności jednostki cukrowej, charakteryzuje się lepszą rozpuszczalnością w wodzie i biodostępnością. Wykazano, że działanie przeciwnowotworowe tej cząsteczki jest związane

z generowaniem reaktywnych form tlenu, których wysoki poziom prowadzi do śmierci komórki [65].

W 2014 roku został opisany glikokoniugat chinolinowy **11**, który otrzymano w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydo-alkinowej pomiędzy 8-*O*-alkinową pochodną chinoliny i pochodną 6-azydo-D-galaktozy (Rysunek 3). W rezultacie zsyntezowano glikokoniugat z fragmentem 1,2,3-triazolowym w łączniku pomiędzy 8-HQ i galaktozą zabezpieczoną grupami izopropylidenowymi. Związek przetestowano *in vitro* pod kątem aktywności antyproliferacyjnej względem różnych typów ludzkich komórek nowotworowych. Pochodna ta wykazała najwyższą cytotoksyczność oraz selektywność wobec komórek raka jajnika (OVCAR-03), przewyższającą aktywność doksorubicyny jako leku odniesienia. Ponadto glikokoniugat był aktywniejszy od innych 1,2,3-triazolowych pochodnych 8-HQ nie zawierających fragmentu cukrowego, otrzymanych i opisanych w ramach tej samej serii badań [66].

W celu otrzymania glikokoniugatu **12** przeprowadzono reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydo-alkinowej pomiędzy propargilową pochodną 8-HQ i azydkiem glikozylowym (Rysunek 3). Autorzy nie badali aktywności przeciwnowotworowej związku, ale wykazali, że obecność dodatkowych wolnych par elektronowych na atomach azotu w utworzonym w reakcji pierścieniu 1,2,3-triazolowym wpływa na poprawę właściwości chelatujących jony metali przez 8-HQ. Ponadto dzięki obecności jednostki cukrowej, związek ten charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie i biodostępnością. Zatem obserwacja ta oraz obecność w strukturze dodatkowego motywu wiążącego jony metali powinna wpłynąć na polepszenie aktywności antyproliferacyjnej takich połączeń [67].

2.3. Metotreksat i jego pochodne w terapiach przeciwnowotworowych



Rysunek 4. Cząsteczka metotreksatu (MTX)

Metotreksat (MTX) jest powszechnie znanym organicznym związkiem chemicznym, wykazującym właściwości zarówno antyproliferacyjne, jak i przeciwzapalne. Na rynek farmaceutyczny został wprowadzony w 1953 roku i od tego czasu jest powszechnie stosowany jako lek cytostatyczny w szerokim zakresie chorób nowotworowych, m. in.: ostrej białaczce szpikowej, ostrej białaczce limfoblastycznej, raku piersi, jajnika, płuca, prostaty, pęcherza moczowego, kostniakomięsaków, nowotworów litych głowy i szyi. W mniejszych dawkach (10-30 mg na tydzień) jest przepisywany w terapii chorób autoimmunologicznych, takich jak łuszczyca czy reumatoidalne zapalenie stawów, jako lek pierwszego wyboru z uwagi na potwierdzoną skuteczność, relatywnie niski koszt terapii oraz zadowalający profil bezpieczeństwa [68-70]. MTX jako antagonistę kwasu foliowego, hamuje aktywność reduktazy

dihydrofolianowej (DHFR), która katalizuje konwersję dihydrofolianu do tetrahydrofolianu, który z kolei niezbędny jest do syntezy zasad azotowych nukleotydów. Skutkuje to zaburzeniem syntezy DNA i RNA, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania podziałów komórkowych i śmierci komórki. W związku z powyższym, celem działania MTX są wszystkie szybko proliferujące komórki. Zatem komórki nowotworowe, szpik kostny, komórki płodu, błona śluzowa jamy ustnej i jelit oraz komórki pęcherza moczowego są najbardziej wrażliwe na działanie metotreksatu. MTX w małych ilościach może być internalizowany do komórek za pomocą białkowych transporterów folianów (RFC1 lub FBP), a w większym stężeniu po wysyceniu transporterów, poprzez bierną dyfuzję [70,71]. Stąd preparat stosowany w dużych dawkach w terapiach onkologicznych, wykazuje bardzo dużą toksyczność ogólnoustrojową. Metotreksat, jako lek działający niespecyficycznie na wszystkie komórki organizmu, może wywoływać silne działania niepożądane, do których należą m. in.: dolegliwości żołądkowo-jelitowe, zapalenie skóry i naczyń krwionośnych, niewydolność nerek i wątroby, choroby płuc, jelit, uszkodzenia szpiku i błon śluzowych. Głównym powodem niepowodzenia terapii z jego wykorzystaniem nie jest więc brak skuteczności, ale poważne skutki uboczne zagrażające życiu pacjenta [69,70]. Z tego powodu pożądane jest opracowanie nowych strategii leczenia, które mogą zapewnić precyzyjne dostarczanie metotreksatu do miejsc docelowych, ograniczając w ten sposób skutki uboczne.

W ostatnich latach opracowano wiele nowych systemów ukierunkowanego dostarczania leków do komórek nowotworowych. Naukowcy wykorzystali różne nośniki polimerowe do transportu i dostarczania MTX. Opisano między innymi tworzenie koniugatów polimerowych z wykorzystaniem poli(glikolu etylenowego) (PEG), dekstranów, kwasu hialuronowego czy albumin surowicy ludzkiej (HSA), a także przyłączenie do MTX ukierunkowanych ligandów na bazie aminokwasów i peptydów. Do transportu MTX wykorzystano również liposomy, micelle, hydrożele, mikrosfery i nanocząstki polimerowe, a nawet nanocząsteczki złota czy nanorurki węglowe. Takie systemy dostarczania zapewniają wewnątrzkomórkową akumulację leku, wydłużone działanie substancji aktywnej w tkance docelowej i zwiększoną cytotoksyczność *in vitro* oraz *in vivo* w stosunku do modeli zwierzęcych. Niemniej jednak potrzebne są dalsze badania uzupełniające, zanim zaproponowane strategie leczenia będą mogły zostać zastosowane w badaniach klinicznych [70,72,73].

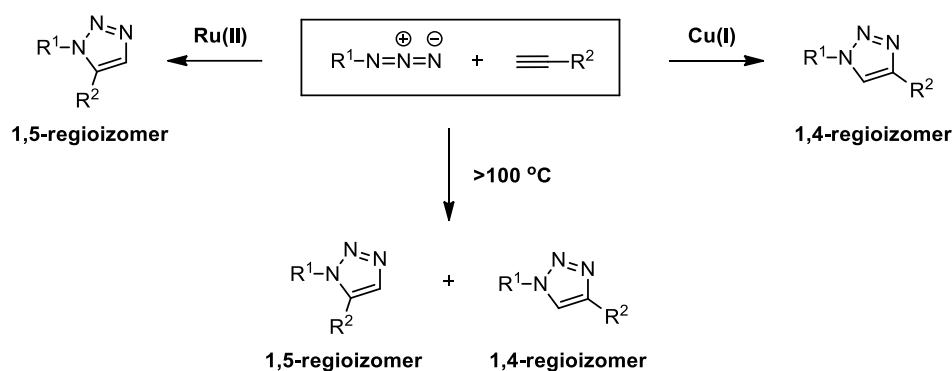
W literaturze do tej pory nie ma wielu doniesień na temat modyfikacji cząsteczki MTX za pomocą monosacharydów. W 2001 roku opisano syntezę koniugatów, w których grupy karboksylowe cząsteczki MTX połączono z pozycją anomeryczną D-glukozy poprzez łączniki zbudowane z lipoaminokwasów i omówiono ich wstępną cytotoksyczność wobec linii komórkowej białaczki limfoblastycznej (CCRF-CEM). Aktywność cytotoksyczna koniugatów *in vitro* okazała się gorsza w stosunku do koniugatów MTX-lipoaminokwasu bez przyłączonej jednostki cukrowej. Autorzy nie zdecydowali się na prowadzenie dalszych badań, przypisując brak cytotoksyczności utrudnionej zdolności nowych pochodnych do oddziaływania z błonami biologicznymi, co może wynikać z zawady przestrzennej spowodowanej dużą objętością cząsteczki [74]. Ostatnie doniesienia na temat glikokoniugacji MTX pochodzą sprzed ponad dwóch dekad, więc warto uzupełnić tę lukę, gdyż przewiduje się, że połączenie fragmentu metotreksatu z jednostką cukrową powinno poprawić biodostępność związku i ograniczyć liczne skutki uboczne związane z jego stosowaniem.

2.4. Koncepcja *click chemistry*

Termin *click chemistry* do syntezy organicznej został wprowadzony przez amerykańskiego chemika prof. Sharpless'a, dwukrotnego laureata Nagrody Nobla w latach 2001 i 2022. Nagroda przyznana za wkład w rozwój chemii *click*, podkreśla szczególne znaczenie tego podejścia i uznanie środowiska naukowego na całym świecie. Strategia ta opisuje szybki i wydajny sposób otrzymywania nowych związków o użytecznych właściwościach. Nie jest to konkretna reakcja, lecz proces wytwarzania produktów wzorowany na zjawiskach zachodzących w przyrodzie. Proces ten charakteryzują: prostota wykonania, wysoka wydajność, stereo- i regiospecyficzność, łagodne warunki prowadzenia reakcji, brak szkodliwych produktów ubocznych oraz łatwość w oczyszczaniu produktu [75]. Do reakcji spełniających kryteria chemii *click* można zaliczyć:

- reakcje cykloaddycji (np. cykloaddycja Huisgena lub cykloaddycja Dielsa-Aldera);
- reakcje nukleofilowego otwarcia pierścienia (np. azyrydyny lub epoksydy);
- reakcje addycji do wiązań podwójnych C=C (np. dihydroksylacja, epoksydacja lub reakcja Michaela);
- określone reakcje związków karbonylowych (np. synteza moczników, oksymów, amidów lub aromatycznych heterocykli) [75,76].

Najpopularniejszy przykład transformacji typu *click chemistry* stanowi 1,3-dipolarna cykloaddycja azydo-alkinowa (Schemat 1). Została ona opisana w 1963 roku przez Huisgena i do tej pory jest stosowana jako podstawowa droga syntezy 1,2,3-triazoli. Reakcja ta zachodzi pomiędzy różnorodnie podstawionymi terminalnymi alkinami i azydkami organicznymi, umożliwiając tworzenie szerokiego zakresu strukturalnie zróżnicowanych cząsteczek heterocyklicznych, a co najważniejsze spełnia kryteria postawione reakcjom *click* [77,78].



Schemat 1. Schemat reakcji otrzymywania dipodstawionych 1,2,3-triazoli w następstwie 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydo-alkinowej prowadzonej w różnych warunkach

Początkowo reakcja cykloaddycji Huisgena nie cieszyła się dużą popularnością w syntezie organicznej. Konieczna do jej zajścia była wysoka temperatura ($>100\text{ }^\circ\text{C}$), która sprzyjała powstawaniu mieszaniny regioizomerów. Problem ten został rozwiązany gdy wykazano, że zastosowanie katalizy jonami miedzi(I), nie tylko przyspiesza proces, bez konieczności podwyższania temperatury reakcji, ale także rozwiązuje problem powstawania mieszaniny regioizomerów. Pod wpływem katalizatora w reakcji powstaje jedynie lub w znacznym nadmiarze 1,4-regioizomer. Od tego czasu katalizowana miedzią 1,3-dipolarna cykloaddycja azydo-alkinowa (CuAAC, *ang. copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*) stała się użytecznym narzędziem w syntezie związków biologicznie czynnych [77-79].

Reakcja CuAAC zachodzi w temperaturze pokojowej, w szerokim zakresie pH, może być przeprowadzona w różnych rozpuszczalnikach, jednak najefektywniej przebiega w wodno-alkoholowym środowisku, co jest bardzo przydatne w przemianach biochemicznych. Oprócz tego, do reakcji można stosować dużą różnorodność katalizatorów miedziowych, np. CuBr, CuI, CuCl, Cu₂O jako bezpośrednie źródło jonów Cu(I), jednakże ważne jest by takie reakcje prowadzić bez dostępu tlenu, by nie generować ubocznych produktów utleniania, które wpływają niekorzystnie na tworzenie pierścienia triazolowego. Reakcje przebiegają znacznie wydajniej przy użyciu CuSO₄ w obecności środka redukującego, np. askorbinianu sodu (NaAsc), który redukuje Cu(II) do pożądanej formy Cu(I), a także ogranicza ilość tlenu [77-79]. Zaspakajając potrzebę selektywnego i równie szybkiego dostępu do 1,5-dipodstawionych regioizomerów 1,2,3-triazoli, opracowano wariant 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydo-alkinowej katalizowanej jonami rutenu(II) (RuAAC, *ang. ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*) [80].

Pierścień 1,2,3-triazolowy stanowi idealny łącznik w biokoniugacji, ze względu na korzystne parametry fizykochemiczne:

- A) 1,2,3-triazole są wysoce stabilne w typowych warunkach fizjologicznych. Dzięki temu możliwe jest dostarczenie substancji aktywnej do miejsca docelowego, bez wcześniejszej degradacji w układzie krwionośnym [77];
- B) pod względem właściwości elektronowych 1,2,3-triazol jest bioizosterem ugrupowania amidowego, ale jednocześnie jest bardziej stabilny wobec hydrolizy kwasowej i zasadowej, a także w warunkach utleniających i redukujących [77];
- C) układ jest wystarczająco sztywny, co pozwala uniknąć interakcji wewnętrznych między dwoma połączonymi jednostkami [77];
- D) możliwość tworzenia wiązań wodorowych przez 1,2,3-triazole ułatwia ich łączenie się z celami molekularnymi i poprawia rozpuszczalność macierzystego szkieletu w układach biologicznych, umożliwiając w ten sposób podawanie *in vivo* [77];
- E) obecność wolnych par elektronowych na atomach azotu pierścienia 1,2,3-triazolowego, umożliwia koordynowanie jonów metali, co ma istotne znaczenie w przypadku projektowania leków ukierunkowanych na ten cel. Właściwości chelatujące pochodnych 1,2,3-triazoli zostały dogłębnie zbadane i opisane [81];
- F) pierścień 1,2,3-triazolowy, ze względu na właściwości słabo zasadowe, powinien zwiększać stężenie proleku w lekko kwaśnym mikrośrodowisku komórek rakowych, wynikającym z nadmiernej glikolizy w komórkach nowotworowych (efekt Warburga). W przypadku zdrowych komórek takie kwaśne środowisko nie istnieje, co może stanowić zabezpieczenie przed niepożądanymi działaniami ubocznymi otrzymanych związków. Natomiast po protonowaniu utworzony kation, z uwagi na delokalizację ładunku, nie powinien stwarzać bariery blokującej wnikanie proleku do komórki nowotworowej [77].

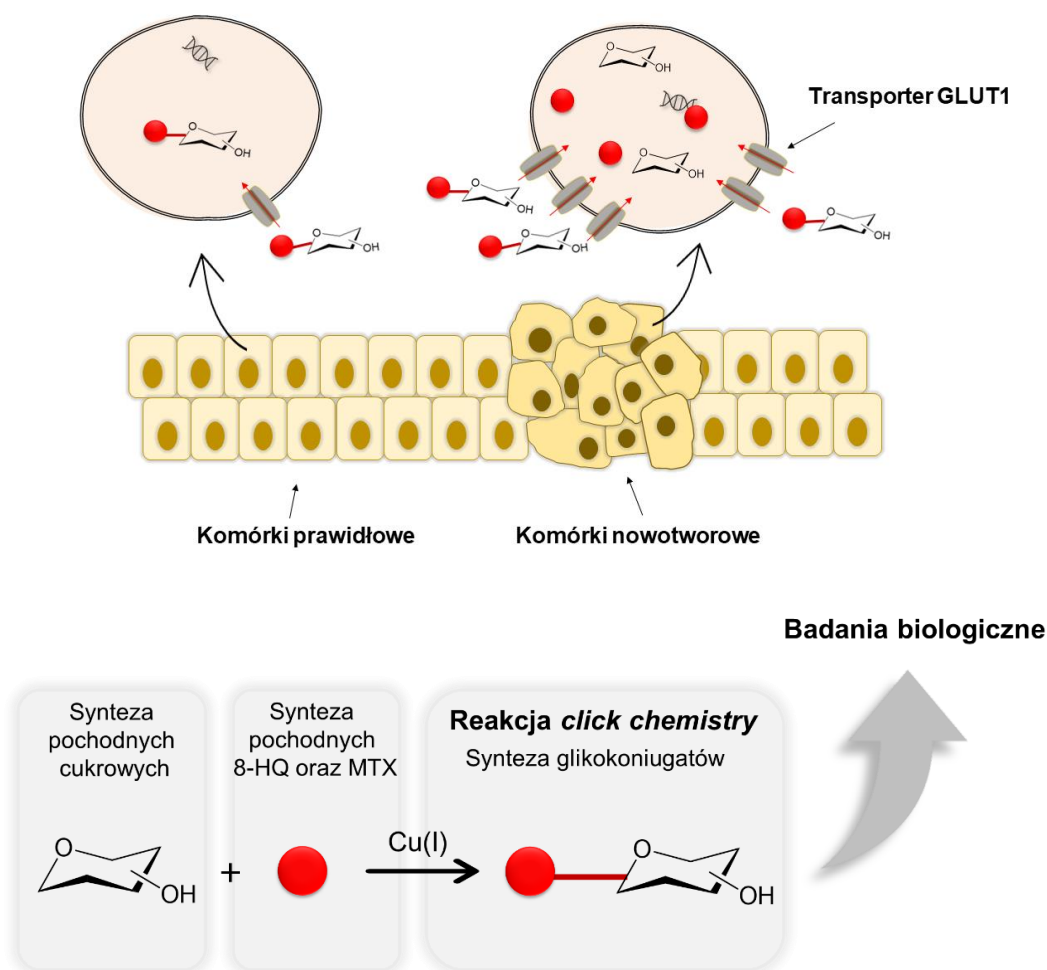
Podejście *click chemistry* wzbudziło ogromne zainteresowanie wśród wielu grup badawczych i stało się popularną strategią generowania szerokiej gamy związków o potencjale biologicznym. Reakcje oparte na tej strategii znajdują wszechstronne zastosowanie w różnych dziedzinach nauki, np. inżynierii materiałowej, chemii polimerów, chemii supramolekularnej, chemii organicznej, agrochemii, organokatalizie, biologii molekularnej i wielu innych. Przede wszystkim CuAAC ma duże znaczenie w chemii medycznej, jako narzędzie w projektowaniu nowych związków biologicznie aktywnych. Dzięki temu podejściu możliwe jest stworzenie w szybki i prosty sposób bibliotek związków przeznaczonych do przesiewowych badań biologicznych. W ostatnich latach opracowano liczne pochodne oparte na 1,2,3-triazolach, które wykazały szerokie spektrum aktywności. W różnych pracach przeglądowych szeroko omówiono

ich właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwzapalne, przeciwgrzybicze, przeciwgruźlicze, a także cytotoksyczne względem wielu linii komórek nowotworowych [76-78, 82-86]. W kontekście niniejszej pracy doktorskiej, nie można pominąć potencjału strategii *click chemistry* w syntezie glikokoniugatów. Szeroko omówiono zastosowanie reakcji CuAAC w opracowywaniu wartościowych cząsteczek na bazie węglowodanów. W wyniku tej reakcji dogodnie skonstruowano warte uwagi glikopolimery, glikolipidy, glikopeptydy, glikooligonukleotydy, glikodendrymery itp. Duża ilość glikokoniugatów pochodnych 1,2,3-triazoli, w warunkach doświadczalnych na poziomie *in vitro*, została zidentyfikowana jako selektywne inhibitory różnych enzymów oraz szlaków metabolicznych, a także wykazała szeroki zakres bioaktywności, w tym działanie przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe [87-89].

Niestety, większość opisanych badań nad pochodnymi 1,2,3-triazoli poprzestaje na zaraportowaniu ich aktywności *in vitro* lub *in vivo* względem modeli zwierzęcych w zakresie badań podstawowych (laboratoryjnych), co wskazuje potrzebę dalszych prac w celu ustalenia ich potencjału leczniczego w badaniach klinicznych. Pomimo różnorodności struktur i szerokiego spektrum aktywności, zaledwie kilka leków zawierających w strukturze fragment 1,2,3-triazolu jest dostępnych obecnie na rynku farmaceutycznym. Wśród najbardziej znanych przykładów znajduje się tazobaktam, antybiotyk β -laktamowy oraz cefatryzyna, antybiotyk z grupy cefalosporyn [83]. Przykładem potencjalnego leku, który przechodzi badania kliniczne pod kątem leczenia różnych nowotworów u ludzi jest karboksamidotriazol, inhibitor napływu wapnia [90]. Kolejnym przykładem jest Savolitininib, inhibitor receptora kinazy tyrozynowej (c-Met), który w 2021 roku został warunkowo zatwierdzony w Chinach do leczenia gruczolakoraka, raka płuc, żołądka i jelita grubego [91].

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jak wynika z powyższego wprowadzenia, tworzenie glikokoniugatów związków biologicznie aktywnych stanowi obiecującą strategię w projektowaniu leków przeciwnowotworowych. Obecność jednostki cukrowej wpływa na poprawę rozpuszczalności związków w środowisku biologicznym, a także poprawia selektywność cząsteczki poprzez ukierunkowanie na transportery błonowe GLUT, nadekspresjonowane w komórkach nowotworowych. Ponadto na podstawie doniesień literaturowych można stwierdzić, że istotne znaczenie dla aktywności biologicznej ma obecność w strukturze potencjalnego leku fragmentu heteroaromatycznego, umożliwiającego chelatowanie jonów metali, których poziom w środowisku nowotworowym jest podwyższony. Można założyć, że dostarczony do komórki nowotworowej prolek uwolni aktywną cząsteczkę wskutek degradacji enzymatycznej przez obecne tam glikozydazy lub też degradacji chemicznej z powodu kwaśnego środowiska, wynikającego z nadmiernej glikolizy. Zjawiska te nie są w tak dużym stopniu zauważalne w przypadku komórek zdrowych, co może korzystnie wpłynąć na bezpieczeństwo terapii. Koncepcja ta w uproszczeniu została przedstawiona na Rysunku 5.



Rysunek 5. Poglądowe przedstawienie wykorzystania efektu Warburga i związanej z tym nadekspresji transporterów GLUT1 do celowania w komórki nowotworowe za pomocą glikokoniugatów związków biologicznie aktywnych

Struktura zaprojektowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej glikokoniugatów składa się z trzech podstawowych elementów budulcowych: jednostki cukrowej, związku biologicznie aktywnego (8-HQ lub MTX) oraz pierścienia 1,2,3-triazolowego, połączonych za pomocą różnego rodzaju łączników. W zakresie części syntetycznej pracy, w pierwszym etapie otrzymałam bloki budulcowe, które połączyłam w różnych konfiguracjach, z wykorzystaniem innowacyjnej koncepcji *click chemistry*. W rezultacie zsyntezowałam, a następnie scharakteryzowałam szeroką gamę nieopisanych dotąd glikokoniugatów pochodnych chinoliny oraz metotreksatu, zawierających w strukturze łącznika pierścień 1,2,3-triazolowy. Jedną z istotnych strategii poprawy skuteczności terapeutycznej leków przeciwnowotworowych jest synteza nowych pochodnych o zmodyfikowanej strukturze. A zatem dla oceny aktywności oraz przeprowadzenia kompleksowych i wiarygodnych badań kluczowe jest stworzenie różnorodnej biblioteki związków. Duża ilość modyfikacji strukturalnych w jednostkach budulcowych wykorzystywanych do syntezy glikokoniugatów oraz połączenie ich w różnych konfiguracjach pozwoli na określenie podstawowych zależności pomiędzy budową chemiczną tej grupy związków, a ich aktywnością biologiczną. Umożliwi to zidentyfikowanie tych konkretnych elementów strukturalnych, które są odpowiedzialne za wykazywanie aktywności biologicznej, co może przyczynić się do bardziej racjonalnego projektowania nowych leków w przyszłości.

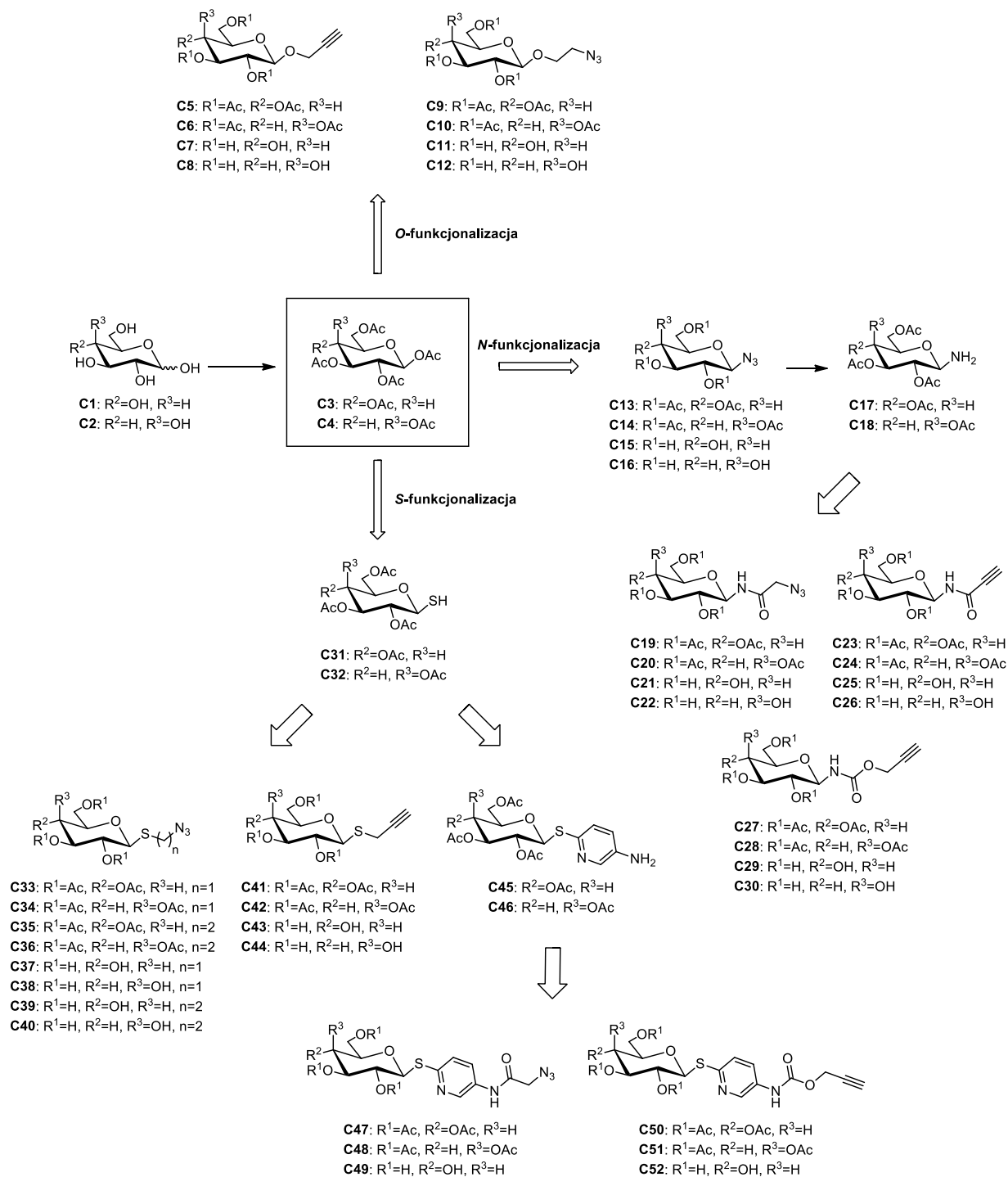
Etap badań biologicznych polegał na przeprowadzeniu w środowisku *in vitro* przesiewowych testów, w celu określenia zdolności wszystkich otrzymanych związków do hamowania proliferacji wybranych linii komórek nowotworowych. Dla najaktywniejszych pochodnych zostały przeprowadzone dodatkowe eksperymenty mające na celu ustalenie prawdopodobnego mechanizmu ich działania. Ponadto aktywne pochodne zostały przetestowane pod kątem użyteczności w ukierunkowanej na raka terapii z udziałem nanonośników polimerowych, w których były one enkapsulowane.

3.1. Glikokoniugacja pochodnych 8-hydroksychinoliny [P.1, P.2, P.3, P.4]

Cykl badań składających się na niniejszą rozprawę doktorską rozpoczęłam od przeprowadzenia kompleksowych eksperymentów dotyczących glikokoniugacji pochodnych 8-hydroksychinoliny.

3.1.1. Synteza pochodnych cukrowych D-glukozy oraz D-galaktozy

Pierwszym etapem części syntetycznej było przygotowanie pochodnych cukrowych, stanowiących elementy budulcowe do syntezy zaprojektowanych glikokoniugatów (Schemat 2). W tym celu konieczne było otrzymanie cząsteczek zawierających w terminalnej pozycji grupę alkynylową lub ugrupowanie azydkowe, czyli grup chemicznych zaangażowanych w reakcję CuAAC. Do syntezy pochodnych cukrowych wykorzystałam przede wszystkim D-glukozę oraz D-galaktozę. Wybór podjednostek cukrowych był podyktowany częstością ich występowania oraz znaczeniem dla metabolizmu komórki. Białka transportujące glukozę i galaktozę (GLUT1) ulegają nadekspresji w przypadku większości komórek nowotworowych [14-17]. Do funkcjonalizacji wykorzystywałam głównie pozycję anomeryczną cukru, w której atomem połączonym bezpośrednio z pozycją C-1 cukru był tlen, azot lub siarka, a we wszystkich pochodnych utrzymana była konfiguracja β anomerycznego atomu węgla, ponieważ taka orientacja jest preferowana dla wiązania z transporterami GLUT1 [92]. Ponadto przeprowadziłam również funkcjonalizację pozycji C-6 jednostki cukrowej. W tym przypadku jako materiał wyjściowy wykorzystałam dodatkowo kwas D-glukuronowy i trehalozę (Schemat 3).



Schemat 2. *O*-, *N*-, oraz *S*-funkcjonalizacja pozycji anomerycznej pochodnych cukrowych

W celu zapewnienia selektywnej funkcjonalizacji pochodnych cukrowych, zazwyczaj wymagane jest przeprowadzenie wieloetapowej, skrupulatnie zaplanowanej syntezy z wykorzystaniem grup ochronnych. Mają one na celu zabezpieczenie grup funkcyjnych cukrów nie biorących udziału w danym etapie syntezy i tym samym wyeliminowanie niepożądanych reakcji, prowadzących zwykle do otrzymania trudnej do rozdzielania mieszaniny produktów ubocznych. W związku z tym, podczas funkcjonalizacji jednostek cukrowych, na wstępie przeprowadziłam klasyczną reakcję acetylowania wolnej D-glukozy **C1** oraz D-galaktozy **C2** (Schemat 2). *O*-Acetylowanie prowadziłam w obecności octanu sodu, z wykorzystaniem

bezwodnika octowego pełniącego funkcję zarówno czynnika acetylującego, jak i rozpuszczalnika. Zastosowanie takich warunków reakcji prowadzi do otrzymania produktu z przewagą anomeru β , co potwierdziłam na podstawie dużej wartości stałej sprzężenia dla protonów przy węglach C-1 i C-2, obliczonej na podstawie analizy widm ^1H NMR produktów. Dodatkowo obecność zabezpieczeń acetylowych potwierdziłam na podstawie widocznych na widmie ^1H NMR pięciu singletów pochodzących od grup metylowych ugrupowań acetylowych. Produkty reakcji, czyli 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetylo- β -D-glikopiranozydy **C3** i **C4** wykorzystałam jako substraty do kolejnych syntez.

Synteza O-sfunkcjonalizowanych pochodnych cukrowych

Substraty, w których ugrupowanie alkinyłowe lub azydkowe zostało wprowadzone poprzez utworzenie wiązania *O*-glikozydowego, otrzymałam w reakcji podstawienia grupy w pozycji C-1 per-*O*-acetylowanej D-glukozy lub D-galaktozy przez alkohol propargilowy lub 2-bromoetanol w obecności kwasu Lewisa jako katalizatora [93,94]. Pochodne azydkowe w tej reakcji, jak i podczas kolejnych analogicznych syntez, otrzymałam poprzez podstawienie atomu halogenu azydkiem sodu (NaN_3) w DMF. Potwierdzeniem wymiany bromu na ugrupowanie azydkowe było pojawienie się pików na widmie ^{13}C NMR pochodzącego od węgla CH_2N_3 z charakterystycznym przesunięciem przy około 50 ppm. Dokładne omówienie syntezy *O*-glikozydów **C5-C12** znajduje się w publikacji **P.2** (Scheme 3; związki **21-30**).

Acetylowe grupy ochronne znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie pozycji anomerycznej w cząsteczce donora są jednym z czynników wpływających na stereoselektywność tworzenia wiązania glikozydowego. Po odejściu grupy odchodzącej, powstaje karbokation stabilizowany przez wolną parę elektronową atomu tlenu karbonyłowego grupy acetylowej w pozycji C-2. Reakcja substytucji w tej sytuacji przebiega więc z utworzeniem pośrednich jonów acyloksoniowych, dlatego ze względów sterycznych, atak nukleofilowy na anomeryczny atom węgla następuje od strony przeciwnej pierścienia. W związku z tym, obecność acetylowej grupy sąsiadującej w pozycji C-2 cukru zapewniła utworzenie produktów o konfiguracji β , a zależność ta odnosi się również do kolejnych syntez.

Synteza N-sfunkcjonalizowanych pochodnych cukrowych

Najprostszymi pochodnymi cukrowymi, które można zastosować w reakcji CuAAC są azydki glikozyłowe **C13-C16** [95]. Dodatkowo stanowią one doskonały materiał wyjściowy do dalszych syntez, na przykład w celu otrzymania pochodnych zawierających wiązanie amidowe lub karbaminianowe w aglikonie. Aby tego dokonać, wprowadzone wcześniej w anomeryczną pozycję cukru ugrupowanie azydkowe poddałam ciśnieniowej redukcji wodorem w aparacie Parra, z użyciem w roli katalizatora wodorotlenku palladu osadzonego na węglu aktywnym, otrzymując 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- β -D-glikopiranozyloaminy **C17** oraz **C18** [64]. Następnym krokiem do otrzymania pochodnych *N*-sfunkcjonalizowanych **C19-C30** przedstawionych na Schemacie 2 była reakcja 1-aminocukrów z chlorkiem chloroacetylu, kwasem propiolowym lub chloromrówczanem propargilu [96,97]. Szczegółowe omówienie warunków reakcji otrzymywania *N*-sfunkcjonalizowanych pochodnych cukrowych znajduje się w publikacji **P.2** (Scheme 2 and 4; związki **17-20**, **31-44**).

Synteza S-sfunkcjonalizowanych pochodnych cukrowych

Kolejna modyfikacja strukturalna części cukrowej polegała na wprowadzeniu atomu siarki w pozycję anomeryczną, a następnie jej funkcjonalizacji odpowiednimi grupami chemicznymi biorącymi udział w reakcji CuAAC. Eksperymenty rozpoczęłam od przygotowania 2,3,4,6-tetra-

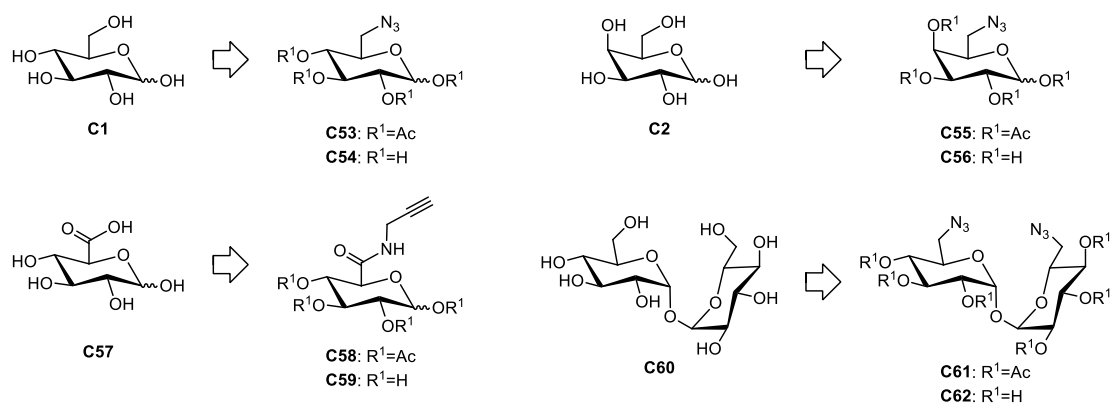
O-acetylo-1-tio- β -D-glikopiranoz **C31** i **C32** [98], które posłużyły jako substraty do kolejnych syntez. W rezultacie otrzymałam 1-tioglikozydy z dołączonym do siarki łańcuchem alkilowym **C33-C44**, jak i pochodne zawierające w części aglikonowej dodatkowy fragment alkiloarylowy **C45-C52** (Schemat 2) [99-101]. Szczegółowy przebieg ich otrzymywania wraz z analizą spektroskopową nowych, nieopisanych dotąd w literaturze pochodnych znajduje się w publikacji **P.3** (Scheme 1-3; związki **7-38**).

Usuwanie acetylowych grup ochronnych

Kończącym etapem w syntezie pochodnych cukrowych było usunięcie wprowadzonych na początku acetylowych zabezpieczeń grup hydroksylowych. Reakcje odbezpieczania prowadziłam każdorazowo zgodnie ze standardową procedurą Zempléna, w środowisku zasadowym, z wykorzystaniem katalitycznych ilości roztworu metanolanu sodu w metanolu [102]. Deprotekcję prowadziłam do momentu całkowitego zaniku substratu, co kontrolowałam za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Do neutralizacji mieszaniny poreakcyjnej zastosowałam kwaśną żywicę jonowymienną Amberlyst-15, po czym mieszaninę przesączałam, otrzymując związki **C7-C8**, **C11-C12**, **C15-C16**, **C21-C22**, **C25-C26**, **C29-C30**, **C37-C40**, **C43-C44**, **C49**, **C52** z wysokimi wydajnościami, wystarczająco czyste do wykorzystania jako substraty w syntezie odbezpieczonych glikokoniugatów. Potwierdzeniem oczekiwanej struktury produktów był brak sygnałów pochodzących od grup acetylowych zarówno na widmach ^1H NMR jak i ^{13}C NMR.

Synteza pochodnych cukrowych sfunkcjonalizowanych w pozycji C-6

Odrębną grupą substratów cukrowych, które zaplanowałam otrzymać w ramach niniejszej pracy doktorskiej były pochodne, do funkcjonalizacji których wykorzystałam pozycję 6-OH jednostki cukrowej (Schemat 3). Modyfikacje w obrębie pozycji C-6 prowadziłam z wykorzystaniem D-glukozy **C1**, D-galaktozy **C2**, kwasu D-glukuronowego **C57** oraz trehalozy **C60**. Podobnie jak poprzednio, wieloetapowe syntezы wymagały selektywnego zabezpieczenia pozostałych grup hydroksylowych nie biorących udziału w danej reakcji, dzięki czemu można było ograniczyć powstawanie trudnej do rozdzielania mieszaniny produktów ubocznych.



Schemat 3. Funkcjonalizacja pozycji C-6 pochodnych cukrowych

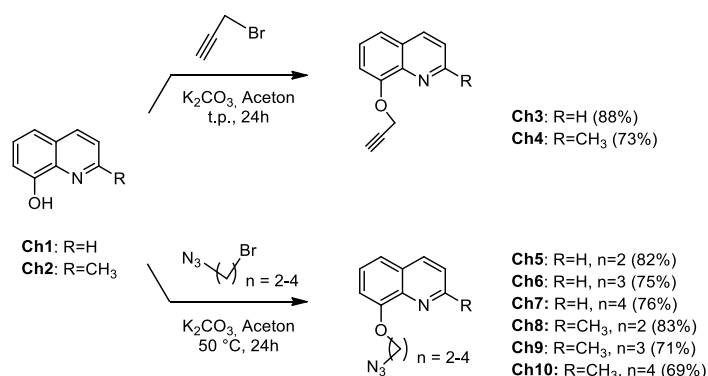
Synteza 6-azydo-6-deoksy-D-glukopiranozy **C54** wymagała przeprowadzenia największej ilości etapów (Scheme 1 – publikacja **P.4**). Poszczególne grupy hydroksylowe D-glukozy musiały zostać w różnej kolejności kilkakrotnie selektywnie zabezpieczone i odbezpieczone w celu przyłączenia grupy azydkowej wyłącznie w pozycję C-6 cukru. W związku z tym, na początku

grupę hydroksylową przy pierwszorzędownym atomie węgla w pozycji C-6 D-glukozy selektywnie zabezpieczyłam rozbudowaną przestrzennie grupą trifenylo-metylową (trytylową), a na pozostałe drugorzędowe grupy hydroksylowe wprowadziłam ochronę acetylową. Kolejno zabezpieczenie trytylowe usunęłam, wprowadziłam łatwo odchodzącą grupę *p*-toluenosulfonylową (tosylową), by w kolejnym etapie zastąpić ją pożądanym ugrupowaniem azydkowym. Na koniec usunęłam acetylowe zabezpieczenia grup hydroksylowych [102-104]. Zaplanowane modyfikacje znacznie łatwiej było zrealizować dla pochodnych D-galaktozy (Scheme 2 – publikacja **P.4**). Ze względu na ułożenie przestrzenne grup hydroksylowych w pozycjach C-1 i C-2 oraz C-3 i C-4, można łatwo i w jednym etapie zabezpieczyć je grupami izopropylidenu, poprzez wykorzystanie acetonu zarówno w roli reagenta, jak i rozpuszczalnika. Zabieg ten umożliwił selektywne podstawienie grupy hydroksylowej w pozycji C-6, początkowo przez grupę tosylową, a następnie zastąpienie jej grupą azydkową. Ostatni etap obejmował usunięcie grup izopropylidenu w środowisku kwaśnym w celu otrzymania docelowego produktu **C56** oraz ewentualne wprowadzenie zabezpieczeń acetylowych by otrzymać związek **C55** [104,105]. W cząsteczce kwasu glukuronowego **C57** pozycja C-6 jest utleniona do grupy karboksylowej, dzięki czemu w prosty sposób możliwe jest otrzymanie pochodnych cukrowych **C58** i **C59** zawierających w strukturze wiązanie amidowe (Scheme 3 – publikacja **P.4**). Udało mi się to zrealizować poprzez przyłączenie propargiloaminy do acetylowanej pochodnej cukru [106]. Trehaloza to disacharyd złożony z dwóch cząsteczek D-glukozy połączonych wiązaniem α,α -1,1'-*O*-glikozydowym. Z tego powodu dość łatwo jest zmodyfikować pozycję C-6 w tej cząsteczce (Scheme 4 – publikacja **P.4**). Synteza 6,6'-diazido-6,6'-dideoxy-D-trehalozy **C62** polegała na wprowadzeniu atomów halogenu w pozycje C-6, by w następnym kroku od razu podstawić je grupami azydkowymi lub wcześniej wprowadzić jeszcze zabezpieczenia acetylowe na grupy hydroksylowe [107,108].

Struktury wszystkich produktów potwierdziłam poprzez analizy ^1H NMR oraz ^{13}C NMR. W wyniku większości reakcji zaobserwowałam powstawanie produktów w postaci mieszaniny anomerów α i β . Dokładne procedury syntetyczne oraz ich omówienie, a także analiza fizykochemiczna i spektralna wszystkich produktów przedstawione są w publikacji **P.4** (związki **2-23**).

3.1.2. Synteza pochodnych 8-hydroksychinoliny

Drugim elementem budulcowym niezbędnym do syntezy zaplanowanych w niniejszej pracy doktorskiej glikokoniugatów były pochodne 8-hydroksychinoliny, sfunkcjonalizowane w pozycji 8-OH ugrupowaniami propargilowymi lub azydoalkilowymi, które biorą udział w reakcji CuAAC. Zastosowane modyfikacje dostępnych handlowo 8-hydroksychinoliny (8-HQ) **Ch1** oraz 8-hydroksychinaldiny (2Me8HQ) **Ch2** zostały przedstawione na Schemacie 4. Odpowiednie pochodne otrzymałam poprzez substytucję nukleofilową bromu przez atom tlenu chinoliny w reakcji prowadzonej w środowisku zasadowym, zgodnie z wcześniej opublikowaną procedurą [109]. Jako reagent do syntezy propargilowych pochodnych chinoliny **Ch3** i **Ch4**, w których podstawiany był brom, wykorzystywałam dostępny handlowo bromek propargilu. Z kolei do otrzymania związków **Ch5-Ch10**, w roli donorów pożądanego ugrupowania zastosowałam 1-azydo-2-bromoetan, 1-azydo-3-bromopropan lub 1-azydo-4-bromobutan, które uzyskałam wcześniej w wyniku traktowania odpowiedniego dibromoalkanu azydkiem sodu w DMF [110]. Wszystkie produkty po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej otrzymałam z dobrymi wydajnościami. Dokładne procedury syntetyczne oraz ich omówienie znajduje się w publikacji **P.2** (związki **3-10**).



Schemat 4. Schemat reakcji otrzymywania pochodnych 8-hydroksychinoliny i 8-hydroksychinaldyny

3.1.3. Synteza glikokoniugatów pochodnych 8-hydroksychinoliny

Mając do dyspozycji bloki budulcowe, przystąpiłam do syntezy glikokoniugatów. Należy podkreślić, iż każda seria glikokoniugatów została otrzymana zarówno w formie z odbezpieczonymi, jak i zabezpieczonymi grupami hydroksylowymi we fragmencie cukrowym. Jednym z założeń niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie mechanizmu transportu glikokoniugatów przez błony komórkowe. Glikokoniugaty mogą być aktywnie transportowane przez białka błonowe GLUT, ale nie można wykluczyć transportu biernego, jak w przypadku większości ksenobiotyków. Acetylowe grupy zabezpieczające w części cukrowej zwiększają lipofilowość glikokoniugatów i dzięki temu wzrasta ich przepuszczalność przez błony biologiczne, w przeciwieństwie do hydrofilowych związków z wolnymi grupami hydroksylowymi, dla których błona jest całkowicie nieprzepuszczalna, a które zostały zaprojektowane jako substraty do wiązania z GLUT. Porównanie działania tych dwóch grup glikokoniugatów pozwoli w pewnym stopniu na określenie czy dany związek wnika do komórki za pomocą transportu biernego (dyfuzja związku lipofilowego przez błony biologiczne), czy transportu aktywnego (przez dopasowanie do transporterów GLUT).

Struktury wszystkich glikokoniugatów pochodnych 8-HQ otrzymanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały przedstawione w Tabeli 1.

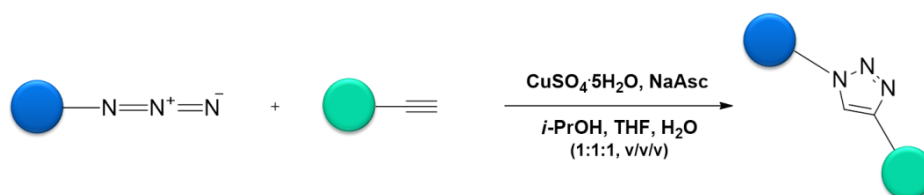
Zsyntezowane w pierwszej kolejności glikokoniugaty **G1-G8** zbudowane są z D-glukozy lub D-galaktozy połączonych wiązaniem *O*-glikozydowym bezpośrednio z 8-HQ lub 2Me8HQ. W celu otrzymania glikozydów chinolinowych zastosowałam różne warianty glikozylacji fenoli opisane w literaturze (Scheme 4 – publikacja **P.1**), wprowadzając do nich pewne modyfikacje warunków reakcji, w celu optymalizacji wydajności otrzymywanych produktów (Table 1 – publikacja **P.1**). Do reakcji glikozylacji w roli donora wykorzystywałam per-*O*-acetylowane bromki glikozydowe, ze względu na prostotę ich otrzymywania z dobrymi wydajnościami oraz obecność dobrej grupy odchodzącej. Akceptorem była natomiast cząsteczka 8-HQ lub 2Me8HQ. Reakcje przebiegały według mechanizmu substytucji nukleofilowej przy anomerycznym atomie węgla i wymagały zastosowania odpowiedniego promotora reakcji. Zastosowałam następującą procedurę:

- *Procedura A* – reakcja prowadzona w układzie dwufazowym (H₂O/CH₃OH/CH₂Cl₂), z dodatkiem bromku tetra-*n*-butyloamoniowego jako katalizatora przeniesienia międzyfazowego. W tym wariantcie uzyskałam głównie odbezpieczone produkty [54].

- *Procedura B* – reakcja z zastosowaniem cieczy jonowej pełniącej funkcję rozpuszczalnika oraz aktywatora reakcji, prowadzona w obecności węgla srebra i soli tetraalkiloamonowej [111].
- *Procedura C* – reakcja prowadzona w acetonitrylu, w środowisku zasadowym, z dodatkiem poli(glikolu etylenowego) PEG 4000 jako katalizatora przeniesienia międzyfazowego [112].
- *Procedura D* – odbezpieczanie produktów otrzymanych w wyniku *procedury B i C*, według standardowego protokołu Zempléna [102].

Pełny opis eksperymentalny wraz z dokładnym omówieniem procedur oraz analizą widm spektroskopowych ^1H NMR i ^{13}C NMR glikozydów **G1-G8** znajduje się w publikacji **P.1** (związki **15-22**).

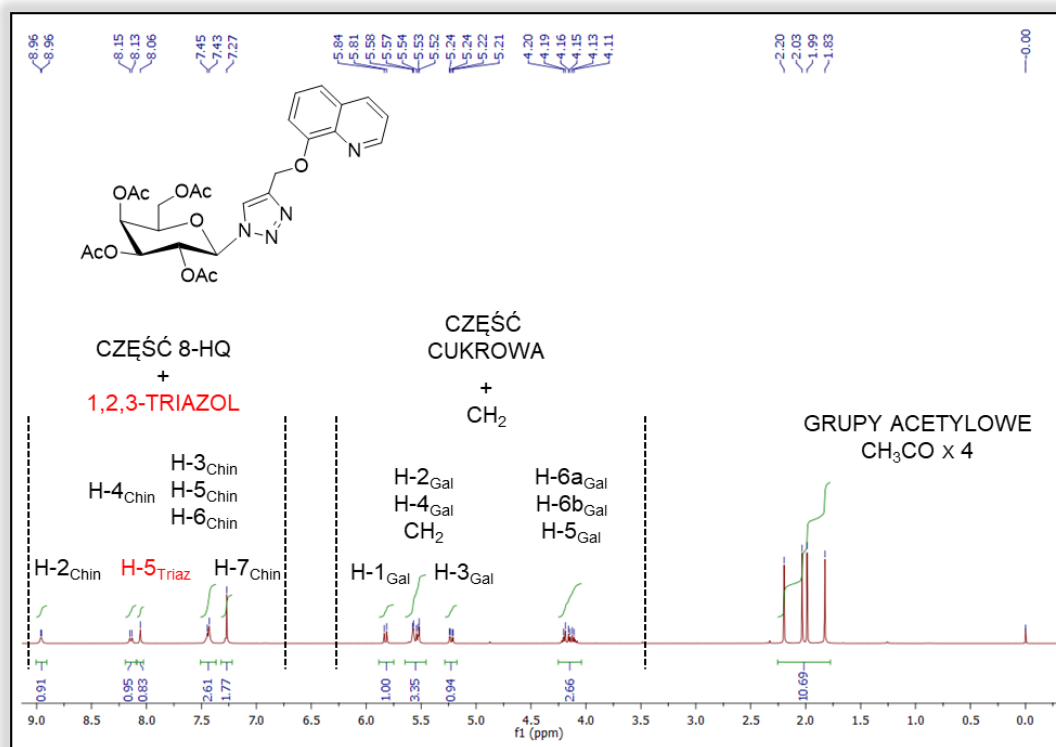
Pozostałe glikokoniugaty pochodne 8-HQ **G9-G119** charakteryzują się obecnością pierścienia 1,2,3-triazolowego w strukturze łącznika. Wszystkie z nich otrzymałam w wyniku katalizowanej jonami miedzi(I) reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydo-alkinowej (CuAAC). Ogólny przebieg syntezy został przedstawiony na Schemacie 5. Reagenty, czyli wcześniej otrzymane pochodne D-glukozy lub D-galaktozy oraz pochodne 8-HQ, zawierające odpowiednie grupy funkcyjne (terminalne alkiny lub azydki), wykorzystałam w tych reakcjach w stosunku równomolowym, rozpuszczając je w układzie rozpuszczalników *izo*-propanol/tetrahydrofuran (*v/v*), co pozwalało na uzyskanie klarownych roztworów. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodawałam, przygotowany bezpośrednio przed użyciem, wodny układ katalityczny, składający się z siarczanu miedzi ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) i askorbinianu sodu (NaAsc). $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ stanowi w tej reakcji źródło jonów miedzi, natomiast NaAsc jest czynnikiem redukującym jony miedzi z II na I stopień utlenienia oraz zapobiega tworzeniu się ubocznych produktów utleniania. Zastosowanie miedzi w roli katalizatora, oprócz przyspieszenia reakcji, umożliwiło przeprowadzenie jej w temperaturze pokojowej i gwarantowało kontrolę nad jej regioselektywnością, gdyż w jej wyniku powstawały wyłącznie 1,4-dipodstawione 1,2,3-triazole. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą TLC. Całkowitą konwersję substratów do produktów docelowych w niektórych przypadkach można było zaobserwować już po ok. 2 godzinach, jednakże wydłużenie czasu reakcji nie wpływało negatywnie na wydajność ze względu na stabilność powstających glikokoniugatów. Z tego względu często przerób mieszaniny poreakcyjnej następował dopiero po 24 godzinach. Przerób ten polegał na odsączeniu wytrąconego osadu soli nieorganicznych z mieszaniny reakcyjnej i oddestylowaniu rozpuszczalników pod zmniejszonym ciśnieniem. Czyste produkty wyizolowałam z dobrą lub bardzo dobrą wydajnością korzystając z chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż z powodu chemoselektywności niniejszej reakcji, nie ma konieczności stosowania zabezpieczeń grup hydroksylowych w jednostkach cukrowych. Eliminuje to konieczność odbezpieczenia finalnych glikokoniugatów, które są bardziej wrażliwe na środowisko zasadowe od substratów cukrowych, czego konsekwencją jest niższa wydajność odbezpieczonych produktów uzyskiwanych w takiej sekwencji reakcji.



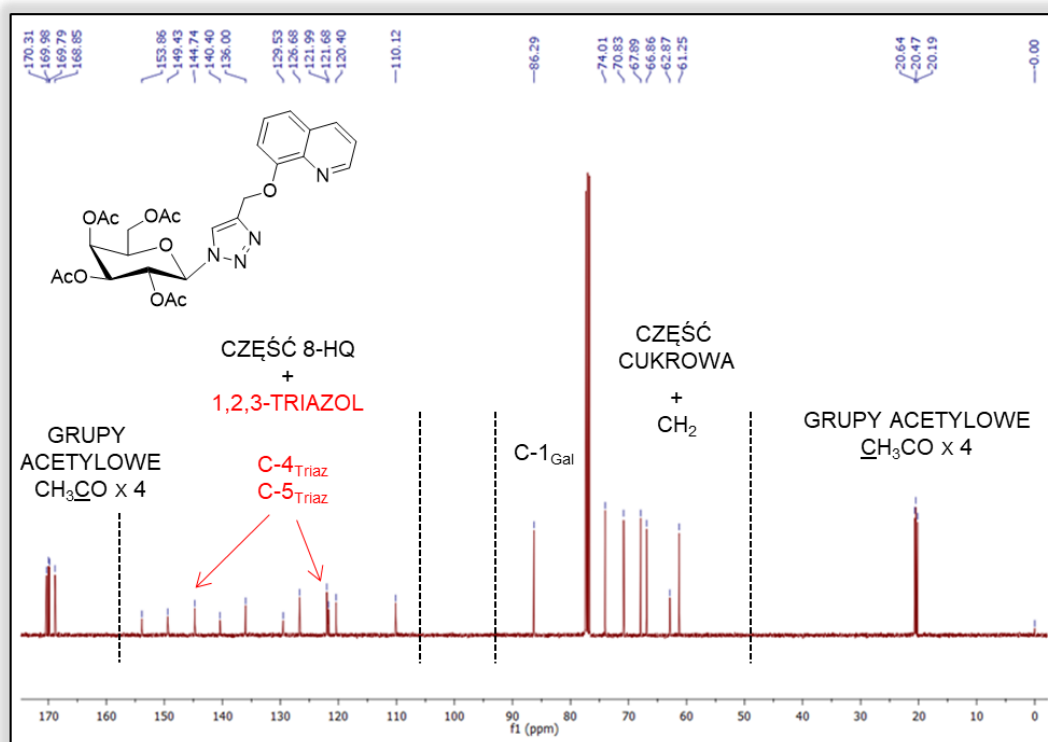
Schemat 5. Schemat reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydo-alkinowej katalizowanej jonami miedzi(I)

Struktury otrzymanych glikokoniugatów **G9-G119** przedstawione są w Tabeli 1. Dodatkowo znajdują się tam również informacje o zastosowanych do syntezy substratach oraz wydajności poszczególnych produktów, a także kolorem zielonym zaznaczone są odnośniki do oryginalnych publikacji oraz zastosowanej tam numeracji związków. Struktury wszystkich glikokoniugatów potwierdziłam za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego (^1H NMR i ^{13}C NMR) oraz wysokorozdzielczej spektrometrii masowej (HRMS). Określiłam również właściwości fizykochemiczne glikokoniugatów takie jak temperatura topnienia i skręcalność optyczna. O tworzeniu pożądaných produktów świadczy obecność na widmach NMR charakterystycznych sygnałów pochodzących z pierścienia 1,2,3-triazolowego. Są to: singlet o przesunięciu około 8.0 ppm na widmach ^1H NMR odpowiadający protonowi H-5_{Triaz} pierścienia triazolu oraz dwa charakterystyczne sygnały na widmach ^{13}C NMR o przesunięciach około 122 ppm i 144 ppm odpowiednio dla węgli C-4_{Triaz} i C-5_{Triaz}. Otrzymane glikokoniugaty **G9-G110** utworzone poprzez funkcjonalizację pozycji anomerycznej cukru zawierały jednostkę cukrową z wiązaniem o konfiguracji β anomerycznego atomu węgla, ponieważ wcześniej omawiane doniesienia literaturowe sugerowały, iż właśnie taka orientacja jest korzystna dla wiązania z transporterami GLUT1. Potwierdzeniem takiej konfiguracji są obserwowane na widmach ^1H NMR poszczególnych produktów sygnały pochodzące od protonu H-1 o stosunkowo dużej stałej sprzężenia wynoszącej około 8.0 Hz. Przykładowe widma NMR wraz z zaznaczonymi charakterystycznymi sygnałami dla glikokoniugatów zamieściłam na Rysunku 6 i 7.

- Procedury syntetyczne **G9-G16** wraz z analizą widm NMR znajdują się w publikacji **P.1**.
- Procedury syntetyczne **G17-G80** wraz z analizą widm NMR znajdują się w publikacji **P.2**.
- Procedury syntetyczne **G81-G110** wraz z analizą widm NMR znajdują się w publikacji **P.3**.
- Procedury syntetyczne **G111-G119** wraz z analizą widm NMR znajdują się w publikacji **P.4**.



Rysunek 6. Przykładowe widmo ^1H NMR sporządzone dla glikokoniugatu **G10**



Rysunek 7. Przykładowe widmo ^{13}C NMR sporządzone dla glikokoniugatu **G10**

Tabela 1. Struktury i wydajności otrzymanych glikokoniugatów pochodnych 8-HQ (Mając na uwadze, że numeracja związków w przewodniku różni się od numeracji użytej w publikacjach, kolorem zielonym zanotowane są oryginalne numery glikokoniugatów wraz ze wskazaniem numeru publikacji, w której zostały opisane)

Struktura					Substrat chinolinowy	Wydajność [%]
Związek	R ¹	R ²	R ³	R ⁴		
G1 [15, P.1]	Ac	OAc	H	H	Ch1	44 ^b / 22 ^c
G2 [16, P.1]	Ac	H	OAc	H	Ch1	37 ^b / 42 ^c
G3 [17, P.1]	Ac	OAc	H	CH ₃	Ch2	27 ^b / 29 ^c
G4 [18, P.1]	Ac	H	OAc	CH ₃	Ch2	45 ^b / 51 ^c
G5 [19, P.1]	H	OH	H	H	Ch1	49 ^a / 41 ^d
G6 [20, P.1]	H	H	OH	H	Ch1	34 ^a / 41 ^d
G7 [21, P.1]	H	OH	H	CH ₃	Ch2	21 ^a / 68 ^d
G8 [22, P.1]	H	H	OH	CH ₃	Ch2	29 ^a / 66 ^d

^a Procedura A

^b Procedura B

^c Procedura C

^d Procedura D

Tabela 1. Kontynuacja

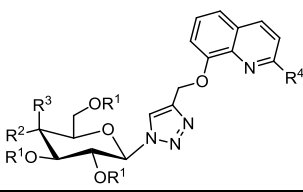
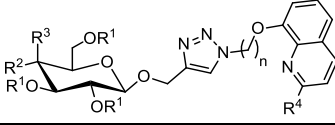
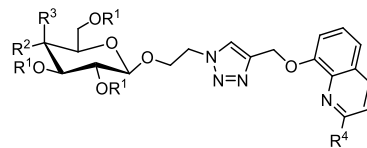
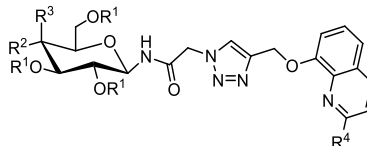
Struktura								
								
Związek	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Substrat chinolinowy	Substrat cukrowy	Wydajność [%]	
G9 [23, P.1]	Ac	OAc	H	H	Ch3	C13	99	
G10 [24, P.1]	Ac	H	OAc	H	Ch3	C14	76	
G11 [25, P.1]	Ac	OAc	H	CH ₃	Ch4	C13	80	
G12 [26, P.1]	Ac	H	OAc	CH ₃	Ch4	C14	87	
G13 [27, P.1]	H	OH	H	H	Ch3	C15	83	
G14 [28, P.1]	H	H	OH	H	Ch3	C16	78	
G15 [29, P.1]	H	OH	H	CH ₃	Ch4	C15	92	
G16 [30, P.1]	H	H	OH	CH ₃	Ch4	C16	56	
Struktura								
								
Związek	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	n	Substrat chinolinowy	Substrat cukrowy	Wydajność [%]
G17 [45, P.2]	Ac	OAc	H	H		Ch5	C5	73
G18 [46, P.2]	Ac	H	OAc	H		Ch5	C6	74
G19 [47, P.2]	Ac	OAc	H	CH ₃		Ch8	C5	100
G20 [48, P.2]	Ac	H	OAc	CH ₃	2	Ch8	C6	71
G21 [49, P.2]	H	OH	H	H		Ch5	C7	95
G22 [50, P.2]	H	H	OH	H		Ch5	C8	67
G23 [51, P.2]	H	OH	H	CH ₃		Ch8	C7	88
G24 [52, P.2]	H	H	OH	CH ₃		Ch8	C8	78
G25 [53, P.2]	Ac	OAc	H	H		Ch6	C5	100
G26 [54, P.2]	Ac	H	OAc	H		Ch6	C6	100
G27 [55, P.2]	Ac	OAc	H	CH ₃		Ch9	C5	65
G28 [56, P.2]	Ac	H	OAc	CH ₃	3	Ch9	C6	77
G29 [57, P.2]	H	OH	H	H		Ch6	C7	100
G30 [58, P.2]	H	H	OH	H		Ch6	C8	76
G31 [59, P.2]	H	OH	H	CH ₃		Ch9	C7	87
G32 [60, P.2]	H	H	OH	CH ₃		Ch9	C8	65
G33 [61, P.2]	Ac	OAc	H	H		Ch7	C5	96
G34 [62, P.2]	Ac	H	OAc	H		Ch7	C6	93
G35 [63, P.2]	Ac	OAc	H	CH ₃		Ch10	C5	92
G36 [64, P.2]	Ac	H	OAc	CH ₃	4	Ch10	C6	100
G37 [65, P.2]	H	OH	H	H		Ch7	C7	72
G38 [66, P.2]	H	H	OH	H		Ch7	C8	90
G39 [67, P.2]	H	OH	H	CH ₃		Ch10	C7	76
G40 [68, P.2]	H	H	OH	CH ₃		Ch10	C8	66

Tabela 1. Kontynuacja

Struktura							
							
Związek	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Substrat chinolinowy	Substrat cukrowy	Wydajność [%]
G41 [69, P.2]	Ac	OAc	H	H	Ch3	C9	78
G42 [70, P.2]	Ac	H	OAc	H	Ch3	C10	62
G43 [71, P.2]	Ac	OAc	H	CH ₃	Ch4	C9	97
G44 [72, P.2]	Ac	H	OAc	CH ₃	Ch4	C10	77
G45 [73, P.2]	H	OH	H	H	Ch3	C11	62
G46 [74, P.2]	H	H	OH	H	Ch3	C12	55
G47 [75, P.2]	H	OH	H	CH ₃	Ch4	C11	58
G48 [76, P.2]	H	H	OH	CH ₃	Ch4	C12	59

Struktura							
							
Związek	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Substrat chinolinowy	Substrat cukrowy	Wydajność [%]
G49 [77, P.2]	Ac	OAc	H	H	Ch3	C19	67
G50 [78, P.2]	Ac	H	OAc	H	Ch3	C20	74
G51 [79, P.2]	Ac	OAc	H	CH ₃	Ch4	C19	81
G52 [80, P.2]	Ac	H	OAc	CH ₃	Ch4	C20	78
G53 [81, P.2]	H	OH	H	H	Ch3	C21	60
G54 [82, P.2]	H	H	OH	H	Ch3	C22	58
G55 [83, P.2]	H	OH	H	CH ₃	Ch4	C21	61
G56 [84, P.2]	H	H	OH	CH ₃	Ch4	C22	78

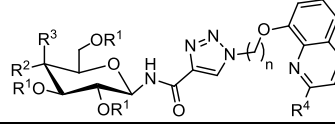
Struktura								
								
Związek	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	n	Substrat chinolinowy	Substrat cukrowy	Wydajność [%]
G57 [85, P.2]	Ac	OAc	H	H		Ch5	C23	72
G58 [86, P.2]	Ac	H	OAc	H		Ch5	C24	93
G59 [87, P.2]	Ac	OAc	H	CH ₃		Ch8	C23	66
G60 [88, P.2]	Ac	H	OAc	CH ₃	2	Ch8	C24	82
G61 [89, P.2]	H	OH	H	H		Ch5	C25	60
G62 [90, P.2]	H	H	OH	H		Ch5	C26	85
G63 [91, P.2]	H	OH	H	CH ₃		Ch8	C25	63
G64 [92, P.2]	H	H	OH	CH ₃		Ch8	C26	81
G65 [93, P.2]	Ac	OAc	H	H		Ch6	C23	67
G66 [94, P.2]	Ac	H	OAc	H		Ch6	C24	84
G67 [95, P.2]	Ac	OAc	H	CH ₃		Ch9	C23	61
G68 [96, P.2]	Ac	H	OAc	CH ₃	3	Ch9	C24	63
G69 [97, P.2]	H	OH	H	H		Ch6	C25	69
G70 [98, P.2]	H	H	OH	H		Ch6	C26	74
G71 [99, P.2]	H	OH	H	CH ₃		Ch9	C25	58
G72 [100, P.2]	H	H	OH	CH ₃		Ch9	C26	74

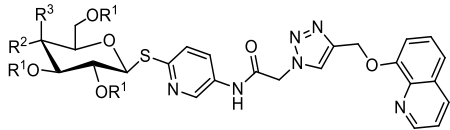
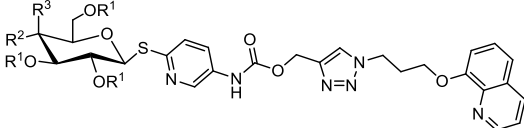
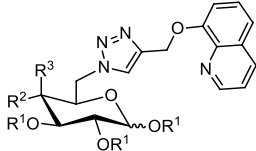
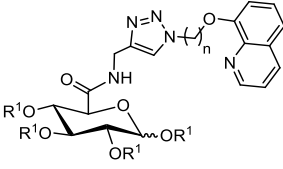
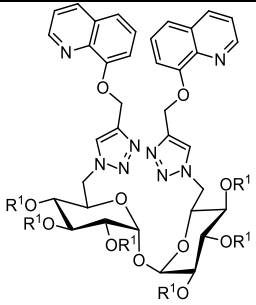
Tabela 1. Kontynuacja

Struktura							
Związek	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Substrat chinolinowy	Substrat cukrowy	Wydajność [%]
G73 [101, P.2]	Ac	OAc	H	H	Ch6	C27	94
G74 [102, P.2]	Ac	H	OAc	H	Ch6	C28	90
G75 [103, P.2]	Ac	OAc	H	CH ₃	Ch9	C27	68
G76 [104, P.2]	Ac	H	OAc	CH ₃	Ch9	C28	64
G77 [105, P.2]	H	OH	H	H	Ch6	C29	83
G78 [106, P.2]	H	H	OH	H	Ch6	C30	82
G79 [107, P.2]	H	OH	H	CH ₃	Ch9	C29	80
G80 [108, P.2]	H	H	OH	CH ₃	Ch9	C30	78

Struktura								
Związek	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	n	Substrat chinolinowy	Substrat cukrowy	Wydajność [%]
G81 [43, P.3]	Ac	OAc	H	H	1	Ch3	C33	79
G82 [44, P.3]	Ac	H	OAc	H		Ch3	C34	93
G83 [45, P.3]	Ac	OAc	H	CH ₃		Ch4	C33	87
G84 [46, P.3]	Ac	H	OAc	CH ₃		Ch4	C34	92
G85 [47, P.3]	H	OH	H	H		Ch3	C37	71
G86 [48, P.3]	H	H	OH	H		Ch3	C38	79
G87 [49, P.3]	H	OH	H	CH ₃		Ch4	C37	83
G88 [50, P.3]	H	H	OH	CH ₃		Ch4	C38	92
G89 [51, P.3]	Ac	OAc	H	H	2	Ch3	C35	79
G90 [52, P.3]	Ac	H	OAc	H		Ch3	C36	82
G91 [53, P.3]	Ac	OAc	H	CH ₃		Ch4	C35	77
G92 [54, P.3]	Ac	H	OAc	CH ₃		Ch4	C36	70
G93 [55, P.3]	H	OH	H	H		Ch3	C39	99
G94 [56, P.3]	H	H	OH	H		Ch3	C40	77
G95 [57, P.3]	H	OH	H	CH ₃		Ch4	C39	87
G96 [58, P.3]	H	H	OH	CH ₃		Ch4	C40	88

Struktura							
Związek	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Substrat chinolinowy	Substrat cukrowy	Wydajność [%]
G97 [59, P.3]	Ac	OAc	H	H	Ch6	C41	94
G98 [60, P.3]	Ac	H	OAc	H	Ch6	C42	79
G99 [61, P.3]	Ac	OAc	H	CH ₃	Ch9	C41	77
G100 [62, P.3]	Ac	H	OAc	CH ₃	Ch9	C42	80
G101 [63, P.3]	H	OH	H	H	Ch6	C43	81
G102 [64, P.3]	H	H	OH	H	Ch6	C44	89
G103 [65, P.3]	H	OH	H	CH ₃	Ch9	C43	91
G104 [66, P.3]	H	H	OH	CH ₃	Ch9	C44	90

Tabela 1. Kontynuacja

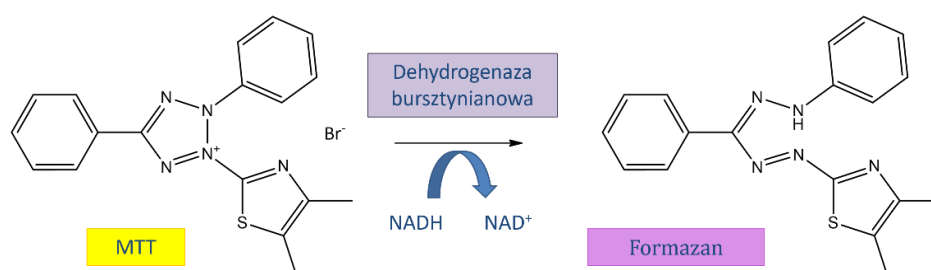
Struktura						
						
Związek	R ¹	R ²	R ³	Substrat chinolinowy	Substrat cukrowy	Wydajność [%]
G105 [67, P.3]	Ac	OAc	H	Ch3	C47	84
G106 [68, P.3]	Ac	H	OAc	Ch3	C48	83
G107 [69, P.3]	H	OH	H	Ch3	C49	77
Struktura						
						
Związek	R ¹	R ²	R ³	Substrat chinolinowy	Substrat cukrowy	Wydajność [%]
G108 [70, P.3]	Ac	OAc	H	Ch6	C50	72
G109 [71, P.3]	Ac	H	OAc	Ch6	C51	73
G110 [72, P.3]	H	OH	H	Ch6	C52	78
Struktura						
						
Związek	R ¹	R ²	R ³	Substrat chinolinowy	Substrat cukrowy	Wydajność [%]
G111 [A-1, P.4]	Ac	OAc	H	Ch3	C53	93
G112 [A-2, P.4]	H	OH	H	Ch3	C54	69
G113 [B-1, P.4]	Ac	H	OAc	Ch3	C55	86
G114 [B-2, P.4]	H	H	OH	Ch3	C56	64
Struktura						
						
Związek	R ¹	n	Substrat chinolinowy	Substrat cukrowy	Wydajność [%]	
G115 [C-1, P.4]	Ac	2	Ch5	C58	76	
G116 [C-2, P.4]	Ac	3	Ch6	C58	76	
G117 [C-3, P.4]	H	3	Ch6	C59	67	
Struktura						
						
Związek	R ¹	Substrat chinolinowy	Substrat cukrowy	Wydajność [%]		
G118 [D-1, P.4]	Ac	Ch3	C61	76		
G119 [D-2, P.4]	H	Ch3	C62	62		

3.1.4. Ocena aktywności biologicznej glikokoniugatów pochodnych 8-hydroksychinoliny

Kolejnym etapem badań zrealizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej była wstępna ocena aktywności biologicznej otrzymanych związków, polegająca na określeniu ich potencjału w leczeniu chorób nowotworowych. W tym celu dla każdego typu glikokoniugatów przeprowadziłam przesiewowe badania w środowisku *in vitro*, mające na celu ocenę wpływu poczynionych modyfikacji strukturalnych na ich zdolność do hamowania proliferacji wybranych linii komórek nowotworowych lub też do hamowania aktywności enzymu β -1,4-galaktozylotransferazy, której nadekspresję obserwuje się w niektórych typach nowotworów. Nie ulega wątpliwości, że badania w warunkach *in vitro* nie zastępują badań w środowisku *in vivo*, jednakże stanowią dobrą metodę przesiewową pozwalającą na szybkie i stosunkowo mało kosztowne przeprowadzenie wstępnych testów na szerokim panelu związków, aby dzięki temu ograniczyć ilość przyszłych prób przeprowadzanych na zwierzętach. W kontekście niniejszej pracy, związki o najwyższej aktywności być może okażą się obiecującym materiałem do dalszych, bardziej szczegółowych i bardziej zaawansowanych badań w środowisku *in vivo*.

Test cytotoksyczności MTT

W celu oceny zdolności związków do hamowania proliferacji komórek nowotworowych oraz komórek zdrowych przeprowadziłam test cytotoksyczności MTT [113]. Istotą tego testu jest zdolność dehydrogenazy bursztynianowej do przekształcenia żółtej soli tetrazolowej MTT (bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-ilo]-2,5-difenyloctetrazoliowy) w fioletowe kryształy formazanu (Schemat 6). Konwersja ta zachodzi wyłącznie w żywych komórkach, ponieważ wspomniany enzym jest obecny jedynie w mitochondriach komórek aktywnych metabolicznie. W celu wykonania oznaczenia komórki inkubuje się wstępnie z badanymi związkami, a następnie z substratem (MTT). Ilość wytworzonego formazanu oznacza się spektrofotometrycznie mierząc absorbancję (przy długości fali światła 570 nm) za pomocą spektrofotometru płytkowego. Dzięki temu możliwe jest wyznaczenie stopnia proliferacji komórek potraktowanych potencjalnymi lekami, poprzez porównanie uzyskanych wyników pomiarowych z wynikami absorbancji dla komórek bez dodatku leku. Intensywność barwy roztworu jest wprost proporcjonalna do ilości powstałego produktu i pośrednio do liczby żywych komórek.



Schemat 6. Reakcja konwersji MTT do formazanu

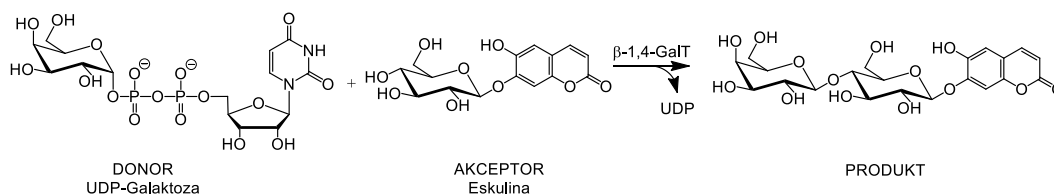
Cytotoksyczność badanych związków była testowana względem linii komórek nowotworowych, które charakteryzują się dużym zapotrzebowaniem na glukozę oraz galaktozę, obserwowanym przez wysoką ekspresję transporterów GLUT1 [16,17]. Na tej podstawie do przesiewowych badań aktywności antyproliferacyjnej glikokoniugatów chinolinowych wybrałam linię komórkową raka jelita grubego (HCT-116) oraz linię komórkową raka piersi (MCF-7) [114,115]. Ponadto są to szczególnie istotne nowotwory ze względu na częstość ich

występowania, trudność w leczeniu i złe rokowania. Najaktywniejsze pochodne zostały przetestowane na dodatkowym panelu komórek nowotworowych. W celu weryfikacji bezpieczeństwa stosowania otrzymanych związków w formie leków przeciwnowotworowych i oszacowaniu ich indeksu selektywności, dla pochodnych charakteryzujących się największą aktywnością antyproliferacyjną w obrębie linii komórek nowotworowych, przeprowadziłam również testy cytotoksyczności względem komórek prawidłowych ludzkich fibroblastów skóry (NHDF-Neo). Aby porównać aktywność cytotoksyczną zsyntezowanych związków z dotychczas znanym i powszechnie stosowanym lekiem cytostatycznym, wykonałam także serię doświadczeń z udziałem doksorubicyny. Każdorazowo przetestowałam zarówno glikokoniugaty, jak i substraty potrzebne do ich syntezy. Komórki były traktowane różnymi stężeniami związków testowych przez 24-72 godziny w ściśle określonych i kontrolowanych warunkach doświadczalnych. Jako kontrolę w badaniach cytotoksyczności zastosowałam komórki zawieszone w pożywce uzupełnionej 0,5% DMSO. Była to ilość DMSO niezbędna do rozpuszczenia najwyższego stężenia danego związku. Parametrem opisującym aktywność cytotoksyczną substancji jest wartość IC_{50} (*ang. inhibitory concentration*). Wyraża ona stężenie badanej substancji, dla którego dochodzi do zahamowania proliferacji komórek o 50% w odniesieniu do wzrostu komórek kontrolnych.

Test hamowania aktywności β 1,4-GalT

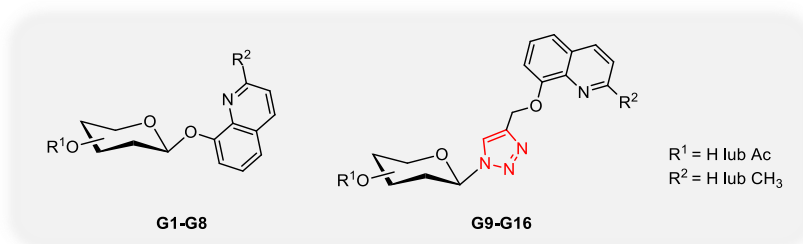
W przypadku niektórych typów nowotworów obserwuje się nadekspresję enzymów z rodziny glikozylotransferaz, które zaangażowane są w reakcje syntezy wiązań glikozydowych, katalizując przenoszenie jednostek cukrowych z donorów na cząsteczki akceptorów. Zaburzenia aktywności tych enzymów stanowią ważny obiekt badań nad potencjalnymi terapiami przeciwnowotworowymi [116,117]. Dlatego też racjonalne wydaje się sprawdzenie, czy otrzymane glikokoniugaty są zdolne do hamowania aktywności wybranych enzymów z tej grupy, a tym samym do kontroli procesu glikozylacji. W związku z tym, przeprowadziłam eksperymenty pozwalające na ocenę inhibicji modelowego enzymu należącego do glikozylotransferaz na przykładzie dostępnej handlowo β -1,4-galaktozylotransferazy typu I (β 1,4-GalT), której nadekspresja jest związana z progresją nowotworu [118].

W celu pomiaru zdolności związków do hamowania enzymu, za pomocą techniki RP-HPLC oznacza się stężenie produktu powstającego w reakcji katalizowanej przez β 1,4-GalT z dodatkiem potencjalnego inhibitora i porównuje z ilością produktu powstałego w reakcji kontrolnej prowadzonej w tych samych warunkach lecz bez udziału inhibitora. Wykorzystany w niniejszych badaniach test enzymatyczny, opracowany przez prof. Gabrielę Pastuch-Gawołek, stanowi modyfikację opisaną w literaturze metody Vidala [119]. W eksperymentach tych w roli donora reszty cukrowej wykorzystuje się UDP-Galaktozę będącą naturalnym substratem β -1,4-GalT oraz eskulinę ((6-eskuletynylo) 4'-O- β -D-galaktopiranozylo- β -D-glukopiranozyd) jako akceptor glikozydowy, która dzięki obecności fluoroforu jest wykrywalna za pomocą detektora fluorescencyjnego, wskutek czego możliwe jest określenie ilości produktu powstającego w trakcie reakcji enzymatycznej (Schemat 7).



Schemat 7. Reakcja testowa do oceny aktywności β -1,4-galaktozylotransferazy

Glikokoniugaty G1-G16 (Publikacja P.1)



Rysunek 8. Ogólna struktura glikokoniugatów **G1-G16**

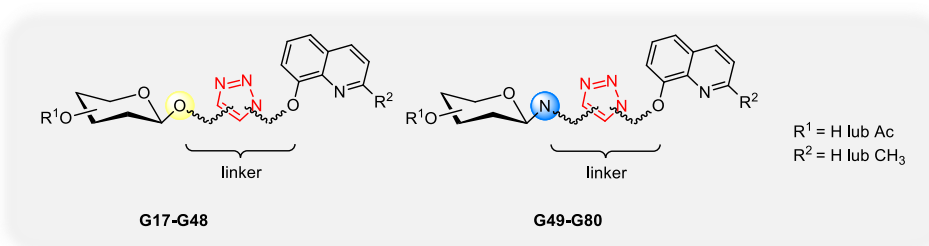
Na początku postanowiłam sprawdzić jaki wpływ na aktywność biologiczną glikokoniugatów chinolinowych będzie miało wprowadzenie do struktury tychże glikokoniugatów dodatkowego heteroaromatycznego fragmentu 1,2,3-triazolowego. Bazując na doniesieniach literaturowych, które wskazują, iż mechanizm działania przeciwnowotworowego pochodnych 8-HQ może być związany z kompleksowaniem jonów miedzi(II) założyłam, że obecność dodatkowego motywu wiążącego jony metali powinna wpłynąć na polepszenie ich aktywności antyproliferacyjnej.

Za pomocą testu MTT określiłam wpływ badanych związków na proliferację komórek nowotworowych oraz komórek zdrowych. Porównanie wartości IC₅₀ glikokoniugatów pochodnych 8-HQ, w których część cukrowa była połączona z fragmentem chinoliny zarówno bezpośrednio za pomocą wiązania *O*-glikozydowego, jak i za pośrednictwem łącznika zawierającego pierścień 1,2,3-triazolowy, znajduje się w Tabelach 4 i 5 w publikacji **P.1**. Wyniki eksperymentów wykazały brak toksyczności glikozydów **G1-G8** względem badanych linii komórek nowotworowych. Natomiast większość glikokoniugatów **G9-G16** z dołączonym do struktury łącznikiem pierścieniem 1,2,3-triazolowym charakteryzowało się zależną od stężenia zdolnością do hamowania wzrostu badanych komórek (Figure 1a-1c – publikacja **P.1**). Glikokoniugaty **G9**, **G10** oraz **G15** wykazały toksyczność również względem rozszerzonego panelu komórek nowotworowych (Table 5 – publikacja **P.1**). Można zatem przypuszczać, że obecność dodatkowego fragmentu heteroaromatycznego wiążącego jony metali poprawia aktywność cytotoksyczną glikokoniugatów, podczas gdy dołączona jednostka cukrowa zwiększa rozpuszczalność i biodostępność związku. Ponadto dla aktywności antyproliferacyjnej tego typu glikokoniugatów ważne jest by grupy hydroksylowe w jednostkach cukrowych były zabezpieczone ugrupowaniem acetylowym. Jak już wspomniałam, poprawia to lipofilowość cząsteczek i można przypuszczać, że dzięki temu mogą one przekraczać błony biologiczne za pomocą transportu biernego i swobodnie wnikać do wnętrza komórki, gdzie obecne esterazy są zdolne do usunięcia grup acylowych. Z kolei obserwowana znikoma aktywność odbezpieczonych pochodnych może wynikać z niedostatecznego powinowactwa tych związków do transporterów glukozy i wynikającej z tego utrudnionej penetracji do komórki przez lipidowe błony biologiczne. Brak zaangażowania białek GLUT w transport glikokoniugatów odzwierciedla fakt, że związki te okazały się być toksyczne także względem komórek zdrowych (NHDF-Neo), przez co nie można ich uznać za kandydatów na potencjalne leki przeciwnowotworowe i konieczne są ich dalsze modyfikacje strukturalne pozwalające na zwiększenie ich aktywności biologicznej oraz selektywności.

Analizując wyniki eksperymentów dotyczących hamowania aktywności enzymu β -1,4-GalT (Table 3 – publikacja **P.1**) można zauważyć, że glikokoniugaty z dołączonym fragmentem *O*-metyleno-1,2,3-triazolowym wykazywały zwiększoną aktywność w porównaniu z pochodnymi z wiązaniem *O*-glikozydowym. Obserwacja ta jest zgodna z założeniami,

ponieważ β -1,4-GalT należy do grupy enzymów metalozależnych, dlatego obecność w cząsteczce potencjalnego inhibitora ugrupowania zdolnego do koordynacji jonów metali, obecnych w centrum aktywnym enzymu, wydaje się być niezbędna do hamowania aktywności tych enzymów. Co ważne, w przeciwieństwie do wyników testów MTT, potencjał hamujący wykazały jedynie glikokoniugaty z niezabezpieczoną częścią cukrową. Obserwacja ta jest związana z faktem, że badania były prowadzone w środowisku wodnym, w którym struktury z lipofilowymi grupami zabezpieczającymi są słabo rozpuszczalne. Ponadto zabezpieczenia grup hydroksylowych we fragmencie cukru prowadzą do zwiększenia objętości analizowanych cząsteczek, co utrudnia ich wpasowanie się w miejsce aktywne enzymu, a wyizolowana β -1,4-GalT pozbawiona jest innych enzymów obecnych w komórkach, które na drodze hydrolizy byłyby w stanie usunąć estrowe grupy zabezpieczające.

Glikokoniugaty G17-G80 (Publikacja P.2)



Rysunek 9. Ogólna struktura glikokoniugatów **G17-G80**

Na podstawie przeprowadzonych badań wstępnych można wnioskować, iż dla aktywności biologicznej związku istotne znaczenie ma obecność fragmentu cukrowego oraz pierścienia 1,2,3-triazolowego w strukturze łącznika. W związku z tym, w ramach kontynuacji tematu, postanowiłam rozszerzyć bibliotekę takich połączeń i zbadać wpływ różnych modyfikacji strukturalnych glikokoniugatów na ich właściwości biologiczne. Do nowej serii związków wprowadziłam łącznik etoksylowy łączący układ 1,2,3-triazolowy z cukrem. W innych strukturach modulowałam długość łańcucha alkilowego pomiędzy pierścieniem 1,2,3-triazolowym i pochodną 8-HQ, a także odwróciłam orientację przestrzenną pierścienia 1,2,3-triazolowego w strukturze łącznika w stosunku do wcześniejszych koniugatów. Ponadto w wielu związkach biologicznie aktywnych obserwuje się występowanie ugrupowania amidowego bądź karbaminianowego, dlatego postanowiłam sprawdzić, czy wprowadzenie tych elementów strukturalnych do glikokoniugatów chinolinowych poprawi ich aktywność w stosunku do wcześniej otrzymanych pochodnych.

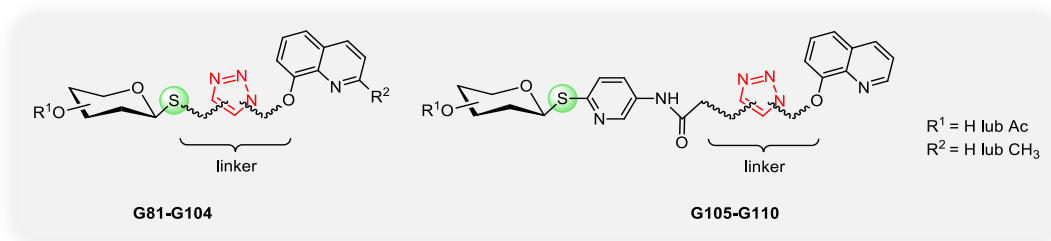
Wyniki testów cytotoksyczności MTT wskazują, że wszystkie glikokoniugaty zawierające acetylowe zabezpieczenia grup hydroksylowych w części cukrowej okazały się być aktywne względem testowanych linii komórek nowotworowych w badanym zakresie stężeń (Table 7 – publikacja **P.2**). Niektóre z nich pozwoliły na zahamowanie proliferacji komórkowej w znacznie lepszym stopniu niż związki macierzyste (Table 6 – publikacja **P.2**). Niestety, nie udało się osiągnąć wystarczającej cytotoksyczności oraz selektywności aby można je było uznać za obiecujące leki. Jednakże zaobserwowałam pewne prawidłowości w ich budowie, które wpływają na poprawę aktywności uzyskanych struktur. Najaktywniejsze względem testowanych linii komórek nowotworowych okazały się być glikokoniugaty zawierające w strukturze łącznika wiązanie amidowe. Można zatem potwierdzić, że obecność dodatkowego motywu wiążącego jony metali wpływa na poprawę cytotoksyczności glikokoniugatów. Niższa aktywność pochodnych z łącznikiem *O*-alkilowym może wynikać z możliwości ich przedwczesnej

degradacji przed dotarciem do komórki. Biorąc z kolei pod uwagę długość łańcucha alkilowego pomiędzy 8-HQ i 1,2,3-triazolem, najbardziej korzystną opcją wydaje się być zastosowanie łącznika z 3 atomami węgla.

Inaczej jest w przypadku analizy wyników badań glikokoniugatów pod kątem ich aktywności hamującej działanie β -1,4-GalT I (Table 8 – publikacja **P.2**). Największą zdolność do inhibicji enzymu wykazały *O*-glikozydy z wydłużonym łańcuchem alkilowym pomiędzy pierścieniem 1,2,3-triazolowym a fragmentem chinolinowym. Wiąże się to być może ze zwiększoną „elastycznością” cząsteczki, co wpływa na lepsze wpasowanie się w centrum aktywne enzymu. Prawdopodobnie z tego powodu najniższą zdolność do hamowania aktywności enzymu wykazały związki zawierające w strukturze wiązanie amidowe znajdujące się w bliskim sąsiedztwie pierścienia aromatycznego, co w rezultacie tworzy strukturę o dużej sztywności. Dodatkowo, podobnie jak w przypadku poprzednich badań z udziałem glikokoniugatów **G9-G16** z łącznikiem *O*-metylenotriazolowym, pochodne D-glukozy były zdecydowanie aktywniejsze od analogicznych pochodnych opartych na D-galaktozie. Badania enzymatyczne nowej serii związków potwierdziły brak korelacji między hamowaniem β -1,4-GalT I a efektami cytotoksycznymi względem linii komórkowych, więc mechanizm działania antyproliferacyjnego aktywnych związków wynika z ich interakcji z innymi celami molekularnymi.

Aby potwierdzić zdolność glikokoniugatów do tworzenia kompleksów z metalami, zostały przeprowadzone eksperymenty miareczkowania spektroskopowego roztworów wybranych związków jonami miedzi z wykorzystaniem spektroskopii UV-VIS i ESI-MS. Badanie właściwości kompleksowania metali potwierdziło, że uzyskane glikokoniugaty są zdolne do chelatowania jonów miedzi, co wiąże się z ich potencjałem przeciwnowotworowym. Ponadto dodanie fragmentu 1,2,3-triazolu poprawiło zdolność do tworzenia takich kompleksów. Wyznaczona stechiometria kompleksów wskazuje, że glikokoniugaty chelatują jony miedzi w stosunku molowym 1:1 (niezależnie od rodzaju łącznika), podczas gdy 8-HQ tworzy kompleksy z metalami w stosunku 2:1 (Figure 3 and 4 – publikacja **P.2**).

Glikokoniugaty G81-G110 (Publikacja P.3)



Rysunek 10. Ogólna struktura glikokoniugatów **G81-G110**

Oprócz pochodnych cukrów zawierających atom azotu lub tlenu w pozycji anomerycznej, wprowadziłam również w tę pozycję atom siarki. Ten rodzaj modyfikacji jest akceptowany przez większość układów biologicznych, a jednocześnie pozwala na poprawę stabilności otrzymanych glikokoniugatów w systemach biologicznych, gdyż związki z wiązaniem *S*-glikozydowym są mniej podatne na degradację chemiczną, jak również rozkład enzymatyczny, zwłaszcza pod wpływem glikozylohydrolaz [120,121]. Z tego względu pochodne 1-tiocukrów wykazują duży potencjał terapeutyczny. Modyfikacje w strukturze łącznika otrzymanych glikokoniugatów dotyczyły kierunku połączenia substratów w reakcji *click chemistry*, długości łańcucha alifatycznego pomiędzy atomem siarki i pierścieniem 1,2,3-triazolowym, a także wprowadzenia do struktury łącznika dodatkowego fragmentu heteroaromatycznego i wiązania amidowego.

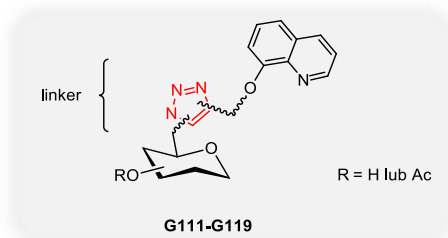
Ponownie, wszystkie glikokoniugaty chinolinowe z zabezpieczeniami acetylowymi w części cukrowej, w teście MTT wykazały zdolność do hamowania proliferacji komórek w badanym zakresie stężeń (Table 2 – publikacja **P.3**). Wyniki ujawniły, że zastąpienie atomu tlenu przy anomerycznym atomie węgla przez atom siarki zwiększa aktywność cytotoksyczną glikokoniugatów **G89-G90** w stosunku do testowanych poprzednio analogicznych pochodnych z tlenem **G41-G42** (Figure 3 – publikacja **P.3**). Prawdopodobnie stabilność w obecności enzymów hydrolitycznych wpływa na ich aktywność i może to sugerować, że glikokoniugaty nie uległy przedwczesnej degradacji przed wejściem do komórki, a co za tym idzie, ich stężenie w miejscu docelowego działania jest większe. Niestety, odwrotną zależność zaobserwowałam w przypadku glikokoniugatów **G97-G98** i ich odpowiedników z tlenem w pozycji anomerycznej cukru **G25-G26**. Można więc przypuszczać, że dla cytotoksyczności glikokoniugatów ważna jest nie tylko ich stabilność hydrolityczna, ale także wzajemna orientacja przestrzenna atomu przyłączonego w pozycji anomerycznej cukru (siarka lub tlen) i pierścienia 1,2,3-triazolowego. Wymiana atomu tlenu na atom siarki również nie poprawiła powinowactwa glikokoniugatów do transporterów GLUT, o czym świadczy słaba aktywność glikokoniugatów z niezabezpieczoną częścią cukrową. Poprawa stabilności hydrolitycznej otrzymanych glikokoniugatów poprzez wprowadzenie atomu siarki w pozycję anomeryczną cukru nie wpłynęła niestety na poprawę ich selektywności.

W celu doświadczalnego potwierdzenia hipotezy o pozytywnym wpływie siarki związanej z anomerycznym atomem węgla na stabilność związków w obecności enzymów hydrolitycznych, przeprowadziłam oznaczenie stabilności hydrolitycznej przykładowych glikokoniugatów, poddając je działaniu β -galaktozydazy z *Aspergillus oryzae*. Okazało się, że glikokoniugaty **G94** i **G102** zawierające atom siarki w pozycji anomerycznej nie uległy hydrolizie w obecności enzymu nawet po 24 godzinach reakcji, podczas gdy ich analogi **G46** i **G30** z tlenem w pozycji anomerycznej uległy całkowitemu rozpadowi już po 60 minutach reakcji katalizowanej enzymatycznie. Opis procedury i przebiegu eksperymentu zamieszczony jest w materiałach uzupełniających do publikacji **P.3**.

Poprzednio udowodniłam, że glikokoniugaty pochodne 8-HQ zawierające fragment 1,2,3-triazolu w strukturze łącznika są zdolne do tworzenia kompleksów z jonami miedzi. W związku z tym oczekiwałam, że wprowadzenie do struktury łącznika dodatkowego układu heteroaromatycznego wpłynie na poprawę właściwości chelatujących, a tym samym na zwiększenie cytotoksyczności takiego związku. Wbrew oczekiwaniom, obecność fragmentu tiopirydylowego nie zwiększyła istotnie potencjału terapeutycznego glikokoniugatów **G105-G110**. Ponieważ założyłam, że mechanizm działania przeciwnowotworowego tej grupy glikokoniugatów może wiązać się z chelatacją jonów metali, przeprowadziłam dla nich dodatkowe eksperymenty badania cytotoksyczności za pomocą testu MTT z dodatkiem jonów Cu^{2+} . Postanowiłam określić wpływ dostarczonych z zewnątrz jonów miedzi na wzrost komórek i cytotoksyczność badanych pochodnych. Oddziaływanie kompleksów glikokoniugatów z jonami metali na proliferację komórek mierzyłam poprzez obserwację wzrostu komórek traktowanych glikokoniugatami z dodatkiem soli miedzi w porównaniu z komórkami kontrolnymi traktowanymi taką samą ilością miedzi bez glikokoniugatów. Okazało się, że komórki nowotworowe traktowane roztworami glikokoniugatów w pożywce z dodatkiem soli miedzi charakteryzowały się znacznie wolniejszym tempem wzrostu w porównaniu z poprzednimi eksperymentami z samymi glikokoniugatami bez dodatku jonów miedzi. Może to świadczyć o tym, że glikokoniugaty poprzez tworzenie kompleksów z jonami miedzi, pozbawiły komórki jednego z czynników wzrostu, przez co zauważalne jest hamowanie proliferacji. Największą wrażliwością na obecność jonów miedzi charakteryzowały się komórki raka piersi (Table 2,

Figure 4 and 5 – publikacja **P.3**), natomiast na żywotność komórek zdrowej linii NHDF-Neo stężenie jonów miedzi nie miało tak istotnego wpływu, jak miało to miejsce w przypadku linii komórek nowotworowych.

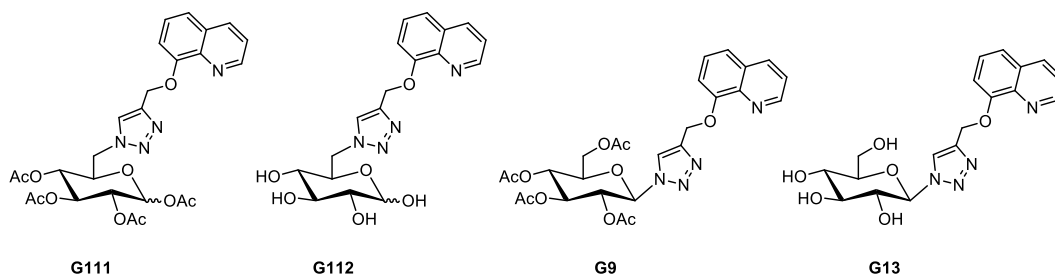
Glikokoniugaty G111-G119 (Publikacja P.4)



Rysunek 11. Ogólna struktura glikokoniugatów **G111-G119**

Z analizy powyższych badań wynika, że część z zaprojektowanych dotąd glikokoniugatów pochodnych 8-HQ wykazała znaczną cytotoksyczność na poziomie mikromolowym w stosunku do testowanych linii komórek nowotworowych w porównaniu z ich związkami macierzystymi. Niestety, związki te okazały się być również toksyczne wobec komórek zdrowych. Brak selektywności wskazuje, że omówione do tej pory glikokoniugaty, powstałe przez funkcjonalizację pozycji anomerycznej w cukrze, prawdopodobnie preferują transport bierny przez błony lipidowe do wnętrza komórek i nie są zdolne do interakcji z białkami GLUT. W celu lepszego dopasowania do transporterów cukrów, została zaprojektowana nowa seria glikokoniugatów, co powinno poprawić ich selektywność poprzez ukierunkowany transport do komórek nowotworowych. Niedawno opisana struktura krystaliczna ludzkiego GLUT1 ujawniła, że grupa hydroksylowa D-glukozy w pozycji C-6 jest najmniej zaangażowana w tworzenie wiązań wodorowych z różnymi resztami aminokwasów transporterów GLUT1 [122]. Dlatego modyfikacja jednostki cukrowej w pozycji 6-OH nie powinna tak silnie wpływać na wiązanie z receptorem, który w założeniu ma kierować związek do komórek, jak ma to miejsce w przypadku modyfikacji z wykorzystaniem pozycji anomerycznej cukru. W literaturze dostępnych jest kilka badań potwierdzających stawianą hipotezę, co zostało omówione we wstępie do publikacji **P.4**.

W związku z powyższym, aby zachować powinowactwo cząsteczki do transportera GLUT1, nowa seria glikokoniugatów charakteryzuje się obecnością cukru sfunkcjonalizowanego w pozycji 6-OH i połączonego przez tę pozycję z pochodną 8-HQ, czyli z fragmentem odpowiedzialnym za wywoływanie efektu cytotoksycznego. Założyłam, że podejście to pozwoli na zwiększenie selektywności w kierowaniu glikokoniugatów do komórek nowotworowych, gdzie uwolnione z proleku składowe będą w stanie indukować cytotoksyczność. Badania biologiczne *in vitro* otrzymanych związków rozpoczęłam od testu MTT i wyznaczenia ich cytotoksyczności (Table 1, 2, 3 – publikacja **P.4**). Analiza wyników wskazuje, że największą zdolność do hamowania wzrostu komórek nowotworowych można przypisać dla glikokoniugatów pochodnych D-glukozy **G111** i **G112**, w których część chinolinowa została przyłączona poprzez atom azotu 1,2,3-triazolu do jednostki D-glukozy bezpośrednio do węgla w pozycji C-6. Co więcej, związki te były bardziej selektywne niż analogiczne glikokoniugaty utworzone przez anomeryczną pozycję D-glukozy **G9** i **G13** (Figure 2, 3 – publikacja **P.4**). Na Rysunku 12 zostało przedstawione porównanie wpływu pozycji podstawienia danej grupy hydroksylowej cukru na aktywność glikokoniugatów.



Związek	Aktywność IC ₅₀ [μM] ^a			Indeks selektywności ^b	
	HCT-116	MCF-7	NHDF-Neo	HCT-116	MCF-7
G111	11.98 ± 0.90	52.84 ± 0.75	129.73 ± 1.49	10.83	2.46
G112	22.32 ± 0.70	54.92 ± 8.71	317.22 ± 9.46	14.21	5.78
G9	45.73 ± 1.81	57.69 ± 3.32	55.28 ± 5.08	1.21	0.96
G13	162.47 ± 5.97	185.34 ± 2.21	232.75 ± 9.44	1.43	1.26

^a Cytotoksyczność określono za pomocą testu MTT (czas inkubacji 72 h). Dane przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe (n = 3); ^b Indeks selektywności obliczono jako stosunek wartości IC₅₀ dla zdrowych komórek (NHDF-Neo) i wartości IC₅₀ dla komórek nowotworowych (HCT-116 lub MCF-7). Dane pochodzą z publikacji **P.4**.

Rysunek 12. Porównanie aktywności glikokoniugatów chinolinowych funkcjonalizowanych w pozycji C-6 oraz w pozycji anomerycznej D-glukozy

Warto również podkreślić, że pochodna **G112** wykazała porównywalne działanie cytotoksyczne do pochodnej **G111** wobec komórek nowotworowych. Jednak selektywność **G112**, tj. koniugatu zawierającego niezabezpieczoną resztę glukozy, a zatem mającego zwiększone powinowactwo do GLUT, była wyższa w porównaniu z pochodną **G111** z zabezpieczeniami acetylowymi części cukrowej. Świadczy to prawdopodobnie o wykorzystaniu białek GLUT w transporcie glikokoniugatów do komórek nowotworowych. Transportery GLUT nie ulegają nadekspresji w komórkach NHDF-Neo, dlatego w przypadku odbezpieczonych glikokoniugatów oczekuje się mniejszej cytotoksyczności niż w przypadku pochodnych zabezpieczonych, gdzie bierny transport związków przez błonę komórkową nie jest selektywny.

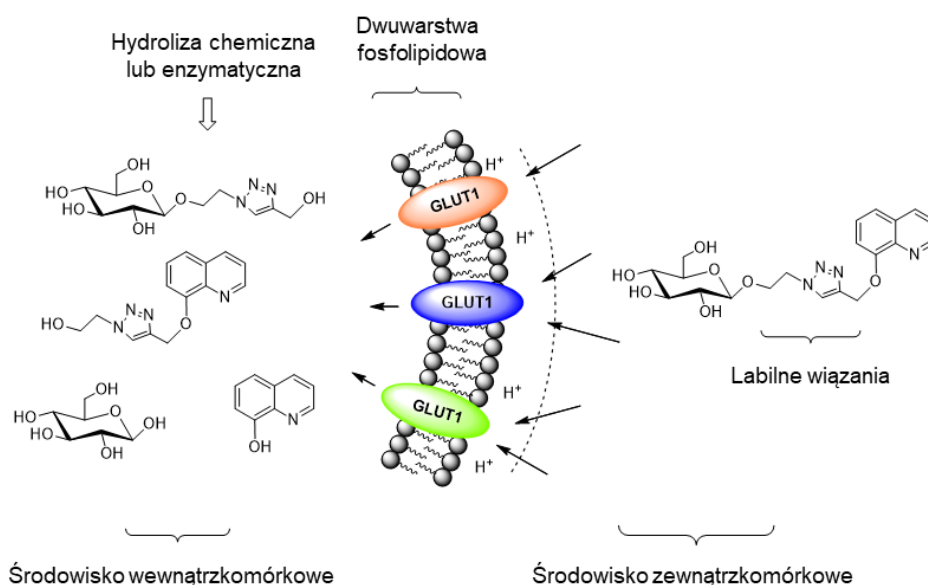
Wnioski dla pozostałych z serii glikokoniugatów sfunkcjonalizowanych w pozycji 6-OH prezentują się następująco. Pochodne trehalozy **G118** i **G119** charakteryzuje duża toksyczność i brak selektywności. Wbrew oczekiwaniom, disacharyd prawdopodobnie nie uległ hydrolizie do dwóch cząsteczek glukokoniugatu, co znacznie utrudniło wiązanie z transporterem GLUT. Glikokoniugaty pochodne D-galaktozy **G113-G114** oraz kwasu D-glukuronowego **G115-G117** również nie są dobrymi substratami dla GLUT, o czym świadczy niska aktywność związków z odbezpieczonym fragmentem cukru. Prawdopodobnie rodzaj jednostki cukrowej, podobnie jak sztywny fragment amidowy w strukturze pomiędzy cukrem a pierścieniem 1,2,3-triazolowym ograniczają możliwość dopasowania do receptora GLUT, stąd ich transport jest mniej wydajny niż w przypadku D-glukozy.

Testy cytotoksyczności przeprowadzone w obecności EDG (4,6-O-etylideno- α -D-glukoza), która jest inhibitorem GLUT1, wykazały pewne zmiany w żywotności komórek traktowanych glikokoniugatami **G111** i **G112** (Figure 4 – publikacja **P.4**). Po zastosowaniu inhibitora EDG i częściowym zahamowaniu aktywności GLUT1, nastąpiło zmniejszenie wychwyty związków, co skutkowało mniejszą akumulacją w komórkach i mniejszą cytotoksycznością glikokoniugatów. Zgodnie z oczekiwaniami, obecność inhibitora EDG nie miała żadnego wpływu na wychwyty komórkowy pozostałych typów glikokoniugatów i związku macierzystego 8-HQ.

W związku z powyższym można potwierdzić, że podstawienie D-glukozy w pozycji C-6 jest korzystniejsze niż podstawienie w pozycji C-1 z punktu widzenia dopasowania do białek GLUT, które mogą być zaangażowane w transport glikokoniugatów do komórek nowotworowych. Wyniki analiz apoptozy i cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej potwierdziły, że nowy typ glikokoniugatów wykazuje właściwości proapoptotyczne, nie wpływając znacząco na zmiany w rozkładzie faz cyklu komórkowego (Figure 7 and 8 – publikacja **P.4**). Ponadto glikokoniugaty były w stanie zmniejszyć potencjał klonogenny komórek nowotworowych, a także hamować zdolność komórek do migracji, które to cechy charakteryzują komórki zdolne do tworzenia przerzutów (Figure 5 and 6 – publikacja **P.4**). Za pomocą techniki UV-VIS została potwierdzona również możliwość oddziaływania glikokoniugatów z DNA poprzez interkalację (Figure 9 – publikacja **P.4**).

3.2. Potencjalne metabolity glikokoniugatów pochodnych 8-hydroksychinoliny [P.5]

Omówione glikokoniugaty zostały zaprojektowane jako proleki, czyli substancje, które uaktywniają się dopiero w wyniku przemian metabolicznych w organizmie. Dlatego oprócz oceny cytotoksyczności samych glikokoniugatów, warto również określić aktywność biologiczną potencjalnych produktów, które mogą być z nich uwalniane w układach biologicznych pod wpływem enzymów hydrolitycznych. Pomoże to określić jaką rolę odgrywają poszczególne fragmenty cząsteczki, a także które z elementów strukturalnych glikokoniugatów odpowiadają za obserwowaną aktywność biologiczną i czy związki te nie są toksyczne dla komórek zdrowych. W tym celu otrzymane na drodze syntetycznej potencjalne metabolity przetestowałam pod kątem hamowania proliferacji wspomnianych wcześniej linii komórek nowotworowych. Rysunek 13 przedstawia potencjalne losy przykładowego glikokoniugatu w mikrośrodkowisku komórek nowotworowych. Pożądanym jest by forma proleku zapewniła możliwość przedostania się cząsteczki do miejsca docelowego wewnątrz komórki, gdzie powinno nastąpić jego przekształcenie z uwolnieniem biologicznie czynnych składników leku.



Rysunek 13. Potencjalne losy przykładowego glikokoniugatu w mikrośrodkowisku komórek nowotworowych

Pożądane metabolity uzyskałam w reakcji katalizowanej miedzią(I) 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydo-alkinowej pomiędzy otrzymanymi wcześniej pochodnymi cukrów lub pochodnymi 8-HQ oraz alkoholem propargilowym lub 2-azydoetanolem (Scheme 1 and 2 – publikacja **P.5**). Zaprojektowane związki składają się z fragmentu 8-HQ połączonego łańcuchem alifatycznym o różnej długości z pierścieniem 1,2,3-triazolowym (Table 1 – publikacja **P.5**). Drugim typem otrzymanych metabolitów są pochodne D-glukozy zawierające w pozycji anomerycznej atom tlenu, azotu lub siarki, które również łączą się z pierścieniem 1,2,3-triazolu za pomocą różnych łączników (Table 2 – publikacja **P.5**). Otrzymałam także metabolity glikokoniugatów sfunkcjonalizowanych w pozycji C-6 cukru (Scheme 9 – publikacja **P.4**). Ze względu na stabilność triazoli w typowych warunkach fizjologicznych, łącznik 1,2,3-triazolowy jest obecny we wszystkich strukturach metabolitów.

Aktywność antyproliferacyjną metabolitów, wyrażoną poprzez wartości IC_{50} oznaczyłam w teście MTT i porównałam z aktywnością glikokoniugatów, z których teoretycznie omawiane metabolity mogłyby powstać. Okazało się, że w większości przypadków uzyskane metabolity nie były zdolne do hamowania proliferacji badanych linii komórkowych. Eksperymenty z udziałem 1,2,3-triazolowych pochodnych 8-HQ (Table 1 – publikacja **P.5**) potwierdziły, że obecność jednostki cukrowej jest konieczna dla uzyskania aktywności biologicznej. Jest to prawdopodobnie związane z brakiem możliwości transportu syntetycznie otrzymanych metabolitów przez błonę fosfolipidową do miejsca docelowego w komórce. Otrzymane potencjalne metabolity zawierające część cukrową i łącznik z pierścieniem 1,2,3-triazolowym w strukturze były również słabo lub całkowicie nieaktywne wobec badanych linii komórek nowotworowych w porównaniu z analogicznymi glikokoniugatami (Table 2 – publikacja **P.5**; Table 1 – publikacja **P.4**). Obserwacja ta potwierdza, że to fragment chinoliny jest odpowiedzialny za wykazywanie aktywności antyproliferacyjnej.

Przeprowadzone badania dowodzą, że dla pełnej aktywności glikokoniugatów niezbędna jest obecność wszystkich trzech elementów budulcowych: jednostki cukrowej, łącznika zawierającego pierścień 1,2,3-triazolowy oraz fragmentu 8-hydroksychinoliny. Oznacza to, że aby otrzymane konstrukty wykazywały oczekiwaną aktywność, powinny dotrzeć do wnętrza komórki w postaci niezmienionej, bez wcześniejszej degradacji.

3.3 Wykorzystanie nanoosiłków polimerowych do ukierunkowanego transportu glikokoniugatów [P.5, P.6, P.7]

Koncepcję glikokoniugacji związków biologicznie aktywnych wykorzystałam w kolejnych badaniach nad ukierunkowanym dostarczaniem leków do komórek nowotworowych z użyciem nanoosiłków polimerowych, w których były one enkapsulowane. Strategię tę można określić jako system podwójnego celowania leków w terapii przeciwnowotworowej, jako że oba wykorzystane wektory (glikokoniugacja i pH-czułe nośniki) celują w specyficzny dla komórek nowotworowych efekt Warburga. Badania opisane w tym rozdziale zrealizowałam we współpracy z grupą prof. Piotra Kurcoka z Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze.

Jedną ze strategii zwiększania biodostępności i selektywności leków jest stosowanie nanoosiłków polimerowych [123,124]. Nośniki polimerowe umożliwiają docelowy transport leków do miejsc zmienionych chorobowo i kontrolowane dozowanie enkapsulowanych związków biologicznie aktywnych pod wpływem odpowiednich bodźców. Takimi bodźcami mogą być zarówno czynniki endogenne (pH, reaktywne formy tlenu, enzymy itp.),

jak i egzogenne (temperatura, promieniowanie podczerwone, pole magnetyczne itp.) [125]. Pod wpływem bodźca dochodzi do zmian fizykochemicznych stabilnego w warunkach fizjologicznych nośnika polimerowego, w wyniku których następuje jego rozkład i uwolnienie zawartości. Mając na uwadze wspomniany wcześniej efekt Warburga, wiadomo że w otoczeniu tkanek nowotworowych panuje lekko kwaśne środowisko, co wynika z nadmiernej glikolizy w komórkach nowotworowych i wzmożonej produkcji kwasu mlekowego. Występujący gradient pH w zewnętrznym i wewnętrznym mikrośrodku komórek nowotworowych został wykorzystany do konstruowania wrażliwych na zmiany pH systemów do zastosowań terapeutycznych. Nanoosiłki aktywowane przez pH wykazały duży potencjał w zwiększaniu skuteczności dostarczania, a następnie kontrolowanego uwalniania leków przeciwnowotworowych [126-128]. W związku z powyższym, omawiane w niniejszym rozdziale badania koncentrują się na enkapsulacji glikokoniugatów do polimerowych nanoosiłków czułych na zmiany pH. Zastosowanie nośników ma na celu ułatwienie transportu hydrofobowych glikokoniugatów oraz poprawę ich selektywności.

Do ukierunkowanego transportu wybranych związków zostały zastosowane specjalnie opracowane biodegradowalne nanoosiłki polimerowe: micelle otrzymane z diblokowego kopolimeru - poli(glikol etylenowy-hydrazon-b-[R,S]-3-hydroksymaślan) z mechanizmem rzucania otoczki PEG w kwaśnym środowisku (Publikacja **P.6**) oraz micelle otrzymane z triblokowego kopolimeru kopoli(glikol etylenowy-b-9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-on-b-[R]-3-hydroksymaślan) z mechanizmem pęcznienia w kwaśnym środowisku (Publikacja **P.7**). W strukturach kopolimerów obecne są odpowiednio dobrane ugrupowania: hydrazonowe w kopoli(etero-estrze) lub ketalowe w kopoli(etero-węglano-estrze), które wykazują stabilność w warunkach fizjologicznych, natomiast ulegają szybkiej hydrolizie w kwaśnym środowisku. Badania stabilności i uwalniania leków *in vitro* potwierdziły, że zaprojektowane micelle są stabilne w fizjologicznym pH (7,4), natomiast ulegają degradacji w środowisku kwaśnym (pH 6,4 i 5,5), w wyniku czego uwalniają enkapsulowane leki. Opracowanie, synteza i charakterystyka nośników polimerowych oraz procedura ich enkapsulacji lekami nie mieści się w zakresie niniejszej rozprawy. Jednakże szczegółowa metodyka poświęcona temu zagadnieniu została opisana przez współautorów w publikacjach **P.6** oraz **P.7**.

Cytotoksyczność *in vitro* wolnych leków, wolnych miceli i obciążonych lekiem miceli określiłam za pomocą testu MTT z użyciem komórek nowotworowych (MCF-7 oraz HCT-116) oraz zdrowych (NHDF-Neo). Wspomniane micelle enkapsulowano glikokoniugatami **G9** oraz **G10**, a także 8-HQ i doksorubicyną. Wyniki wykazały, że żaden z zastosowanych materiałów polimerowych (puste micelle) nie wpłynął na żywotność komórek zdrowych oraz nowotworowych (Figure 5 – publikacja **P.6**; Figure 5 – publikacja **P.7**), co oznacza, że są one nietoksyczne i mogą być bezpiecznie stosowane w badaniach. Efekt zastosowania nanoosiłków oceniłam porównując aktywność cytotoksyczną wolnych leków i miceli naładowanych lekami. Micelle enkapsulowane środkami biologicznie aktywnymi wykazały zależne od dawki hamowanie proliferacji komórek (Figure 6-8 – publikacja **P.6**; Figure 6-9 – publikacja **P.7**). Testy MTT dowiodły, że micelle enkapsulowane glikokoniugatami charakteryzował znacznie silniejszy efekt cytotoksyczny w stosunku do testowanych linii komórek nowotworowych, w porównaniu z wolnymi glikokoniugatami. Enkapsulowane leki osiągają znacznie niższe wartości IC_{50} w porównaniu z ich wolnymi odpowiednikami (Table 3 – publikacja **P.6**; Table 3 – publikacja **P.7**). Mniejsza aktywność cytotoksyczna wolnych glikokoniugatów wynika z ich utrudnionego przenikania do komórki przez błony fosfolipidowe. Jak już zaobserwowałam we wcześniejszych badaniach, wykorzystane glikokoniugaty przekraczają bariery lipidowe komórki prawdopodobnie na zasadzie dyfuzji biernej. Następnym takiego mechanizmu przenikania leku

do komórki jest niestety brak selektywności. Ponadto toksyczność wolnych glikokoniugatów utrzymuje się w czasie eksperymentu na w miarę stałym poziomie. W przeciwieństwie do tego, cytotoksyczność enkapsulowanych glikokoniugatów każdorazowo wzrasta z czasem inkubacji wraz ze stopniem uwalniania leku z nośników polimerowych. Co ważne, micelle enkapsulowane glikokoniugatami wykazały wyższy wskaźnik selektywności w porównaniu z wolnymi glikokoniugatami (Table 4 – publikacja **P.7**), co może wynikać z wcześniej omawianych różnic pomiędzy komórkami nowotworowymi i zdrowymi. Zastosowanie miceli umożliwia uwalnianie leku w środowisku o niskim pH, zapobiegając w ten sposób wczesnemu uwalnianiu leku w przypadkowych miejscach o pH fizjologicznym, w których nie następuje degradacja nośnika. W niektórych przypadkach, zwłaszcza po 72 h inkubacji, glikokoniugaty 8-HQ wykazują cytotoksyczność porównywalną ze znanym lekiem przeciwnowotworowym – doksorubicyną, który zastosowano jako materiał odniesienia. Ponadto analizy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej potwierdziły zdolność związków do skierowania komórek na drogę apoptozy, bez wpływu na zmiany w rozkładzie faz cyklu komórkowego (Figure 10 and 11 – publikacja **P.7**).

Naszym zdaniem istnieją dwie prawdopodobne strategie transportu omawianych układów. W jednej z nich, micelle mogą uwalniać enkapsulowane glikokoniugaty w środowisku zewnątrzkomórkowym, po czym glikokoniugat wnika do komórki na zasadzie dyfuzji biernej. W przypadku drugiej strategii, możliwe jest wnikanie miceli do komórki nowotworowej przez endocytozę [129]. Następnie w środowisku wewnątrzkomórkowym następuje degradacja miceli wrażliwych na pH i stopniowe uwalnianie leków. Aby przybliżyć kwestię mechanizmu wnikania związków do komórek, przeprowadziliśmy dodatkowe eksperymenty opisane w publikacji **P.5**, z wykorzystaniem dwóch metabolitów glikokoniugatów zawierających w strukturze fragment 8-HQ oraz fragment 1,2,3-triazolu (Table 3, Figure 4 – publikacja **P.5**). Jak wspomniałam w poprzednim rozdziale, w teście MTT przeprowadzonym w standardowych warunkach, metabolity wykazały umiarkowaną cytotoksyczność względem testowanych linii komórek nowotworowych, co prawdopodobnie wynika z ich słabej biodostępności i utrudnionej penetracji do wnętrza komórki przez błony fosfolipidowe. Związki te załadowano więc do nanonośników polimerowych. Gdyby uwolnienie z miceli następowało w pobliżu komórki rakowej, efekt cytotoksyczności powinien być podobny do aktywności wolnego metabolitu ze względu na jego utrudnioną zdolność wnikania do komórki. Natomiast eksperymenty wykazały, że micelle enkapsulowane metabolitami charakteryzuje znacznie silniejszy efekt cytotoksyczny wobec badanych komórek w porównaniu z wolnymi metabolitami (Table 3, Figure 4 – publikacja **P.5**). Sugeruje to, że w przypadku metabolitów charakteryzujących się zmniejszoną lipofilowością, a tym samym ograniczoną możliwością wnikania do komórek na drodze transportu biernego, dominuje wariant zakładający wnikanie załadowanych miceli do komórki nowotworowej na drodze endocytozy i uwalnianie wprowadzonego do nich leku wewnątrzkomórkowo. Cytotoksyczność metabolitu wzrasta wraz z jego ilością uwalnianą z nośników polimerowych w komórce. Potwierdza to potencjał cytotoksyczny związków na bazie chinoliny.

Reasumując wyniki przeprowadzonych badań, można stwierdzić, że enkapsulacja zabezpieczonych glikokoniugatów pochodnych 8-HQ w nanonośnikach wrażliwych na pH znacząco poprawiła ich skuteczność dzięki możliwości zastosowania znacznie mniejszej dawki terapeutycznej leku oraz zwiększyła selektywność wykorzystanych proleków wobec komórek nowotworowych.

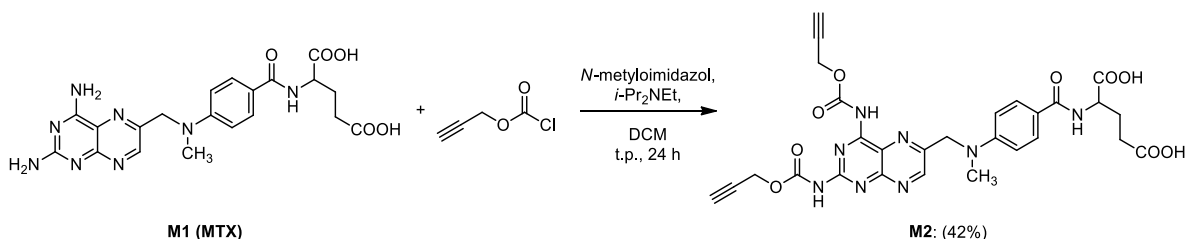
3.4. Glikokoniugacja pochodnej metotreksatu [P.8, P.9, P.10]

Innym środkiem chemioterapeutycznym jaki wybrałam w ramach realizowanej pracy doktorskiej do koniugowania z glukozą jest cząsteczka metotreksatu (MTX). Pozwoli to sprawdzić, czy użyta w stosunku do pochodnych chinolin strategia glikokoniugacji ma zastosowanie również w odniesieniu dla innych związków. MTX wytypowałam ze względu na dobrze udokumentowane właściwości cytotoksyczne, którym towarzyszy niestety także wysoka toksyczność ogólnoustrojowa. Innowacyjna strategia łączenia metotreksatu z glukozą w celu poprawienia jego skuteczności i obniżenia skutków ubocznych wynikających ze stosowania MTX, została opisana w artykułach wchodzących w zakres niniejszej rozprawy doktorskiej (Publikacje **P.8**, **P.9**, **P.10**) i stanowi przedmiot zgłoszenia patentowego (zgłoszenie patentowe P.426731), które zostało nagrodzone złotymi medalami podczas Międzynarodowej Wystawy Wynalazków iENA 2018 w Norymberdze oraz podczas Międzynarodowej Warszawskiej Wystawy Wynalazków IWIS 2018. Badania biologiczne opisane w tym rozdziale zostały zrealizowane w ramach współpracy z grupą naukowców z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

3.4.1. Synteza pochodnych metotreksatu

Modyfikacja cząsteczki metotreksatu nie jest zadaniem łatwym. MTX jest związkiem nietrwałym, ulegającym rozkładowi zarówno pod wpływem wysokiej temperatury, jak i pod wpływem światła. Dodatkowo jest praktycznie nierozpuszczalny w większości rozpuszczalników organicznych. Jednakże udowodniona aktywność biologiczna MTX sprawia, że jest wartą uwagi cząsteczką, co zachęca do podjęcia prób jej funkcjonalizacji.

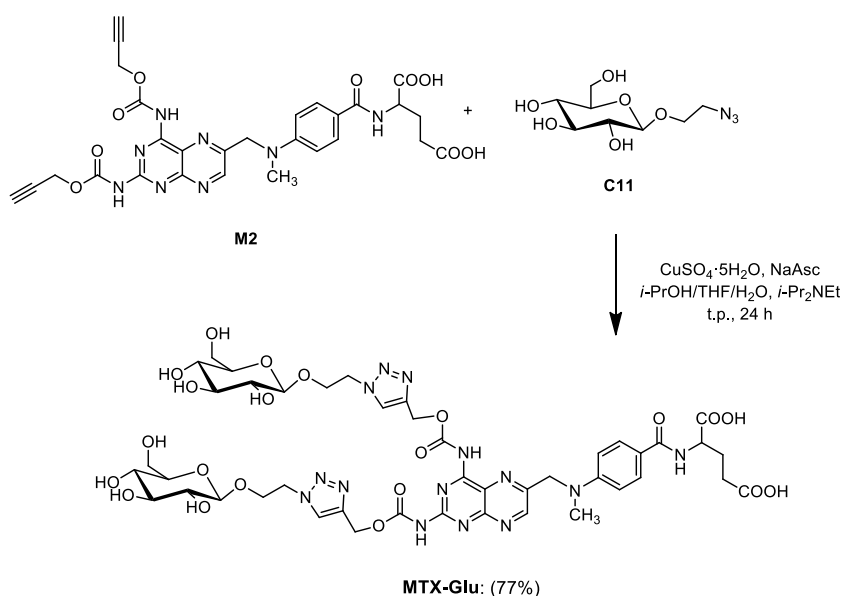
Cząsteczkę MTX zmodyfikowałam poprzez funkcjonalizację grup aminowych, w celu otrzymania pochodnej **M2** z terminalnym wiązaniem potrójnym. Po przetestowaniu różnych warunków reakcji kondensacji (Table 1 – publikacja **P.8**), ostatecznie produkt z zadowalającą wydajnością otrzymałam w reakcji MTX z chloromrówczanem propargilu w obecności *N*-metyloimidazolu i zasady Hüniga, prowadzonej w bezwodnym chlorku metylenu (Schemat 8). Zastosowanie nadmiaru chloromrówczanu propargilu pozwoliło na otrzymanie dipodstawionego produktu. Dokładny opis doboru warunków reakcji oraz procedury syntetycznej, a także analiza spektralna znajdują się w publikacji **P.8** (związek **4**).



Schemat 8. Schemat reakcji otrzymywania pochodnej metotreksatu **M2**

W kolejnym kroku propargilową pochodną metotreksatu **M2** połączyłam z 2-azydoetylo β-D-glukopiranozydem **C11** za pomocą reakcji typu *click* (Schemat 9). Ponieważ pochodna **M2** jest związkiem niestabilnym, słabo rozpuszczalnym w wodzie i typowych rozpuszczalnikach stosowanych w reakcji CuAAC, konieczne było przeprowadzenie kilku wariantów reakcji testowych mających na celu optymalizację wydajności produktu (Table 2 – publikacja **P.8**).

Najlepszym i najprostszym rozwiązaniem okazało się traktowanie cukru roztworem karbaminianowej pochodnej MTX w mieszaninie THF/*i*-PrOH/H₂O z dodatkiem *N,N*-diizopropyletyloaminy w trakcie sonifikacji w celu poprawienia rozpuszczalności substratu. Dzięki temu zabiegowi udało się poprawić wydajność reakcji z 11% (klasyczne warunki reakcji CuAAC) na 77%. Surowy glikokoniugat **MTX-Glu** oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej, a jego strukturę potwierdziłam na podstawie analiz ¹H i ¹³C NMR oraz HRMS, których wyniki wraz z opisem procedury syntetycznej przedstawiłam w publikacji **P.8** (związek **5**).



Schemat 9. Schemat reakcji otrzymywania glikokoniugatu pochodnej metotreksatu **MTX-Glu**

Cząsteczka **MTX-Glu** została zaprojektowana w oparciu o założenie jak najlepszego powinowactwa do receptorów GLUT. Przyjęto, że cząsteczka glikokoniugatu MTX jest zbyt duża, aby miała szansę przedostać się do komórki na zasadzie transportu biernego przez błony biologiczne. W związku z tym, jednostka D-glukozy w tym glikokoniugacie nie jest zabezpieczona żadnymi grupami ochronnymi i jest połączona z łącznikiem przez wiązanie β-*O*-glikozydowe, ponieważ taka orientacja jest preferowana w odniesieniu do białek GLUT. Układ 1,2,3-triazolowy w łączniku między częścią cukrową a lekiem zwiększa powinowactwo związku do transportera ze względu na możliwość tworzenia wiązań wodorowych. Z kolei struktura łącznika z wiązaniem glikozydowym od strony cukru i wiązaniem karbaminianowym od strony MTX, jest dobrana tak, by zapewnić cząsteczce stabilność w środowisku zewnątrzkomórkowym i możliwość degradacji wspomnianych wiązań wewnątrz komórki. Po wprowadzeniu koniugatu do komórki nowotworowej oczekuje się, że podatne na działanie enzymów hydrolitycznych wiązania występujące w cząsteczce zostaną zhydrolizowane i nastąpi uwolnienie aktywnej formy leku (MTX), D-glukozy i fragmentu łącznika wewnątrz komórki.

3.4.2 Ocena aktywności biologicznej glikokoniugatu pochodnej metotreksatu

W ramach badań biologicznych, w pierwszej kolejności przeprowadzono ocenę aktywności cytotoksycznej (test MTT) glikokoniugatu MTX w stosunku do linii komórek nowotworowych MCF-7 (rak piersi) i SW480 (rak okrężnicy). Mikrośrodowisko nowotworu pozbawione tlenu i składników odżywczych jest uważane za kluczowy czynnik odpowiedzialny za oporność raka na chemioterapię. Eksperymenty przeprowadzone w stanie kontrolowanej hipoksji (1% O₂) wykazały, że skoniugowanie metotreksatu z glukozą może przewyciężyć lekooporność wywołaną niedotlenieniem, gdyż obserwuje się zwiększoną toksyczność takiego połączenia względem badanych komórek nowotworowych, w stosunku do wolnego MTX, na którego obecność niedotlenione komórki były znacznie bardziej odporne (Figure 2 A, B – publikacja **P.8**). Eksperymenty przeprowadzone w warunkach niedoboru glukozy również wskazują na większą skuteczność glikokoniugatu w hamowaniu proliferacji badanych komórek w porównaniu z MTX (Figure 2 C, D – publikacja **P.8**). Obserwacja ta wiąże się prawdopodobnie z nasiloną akumulacją glikokoniugatu w komórkach. Ponadto stwierdzono, że **MTX-Glu** skuteczniej niż MTX hamuje zdolność do migracji komórek w teście gojenia ran *in vitro* (Figure 3 – publikacja **P.8**). Dodatkowo analiza za pomocą cytometrii przepływowej wykazała wysoki stopień indukcji apoptozy komórek MCF-7 po traktowaniu **MTX-Glu** (Figure 5 – publikacja **P.8**). Na podstawie porównania widm MS obrazujących zawartość MTX w komórkach traktowanych pożywką z samym lekiem lub z jego glikokoniugatem można stwierdzić, że koniugat wnikał do komórek w większej ilości niż miało to miejsce w przypadku samego leku i uwolnił w nich ładunek cytotoksyczny (Figure S1 – publikacja **P.8**).

Metotreksat jest od wielu lat szeroko stosowanym cytostatykiem również w leczeniu wielu rodzajów nowotworów hematologicznych. Z uwagi na fakt, że transportery GLUT1 są nadekspresjonowane również w nowotworach krwi [130,131], skuteczność cytotoksyczna glikokoniugatu MTX została dodatkowo przetestowana na ludzkich liniach komórek chłoniaka (Toledo, Raji) i białaczki (CCRF-CEM, Jurkat). Testy żywotności komórek MTT wykazały, że działanie cytotoksyczne koniugatu **MTX-Glu** jest podobne do działania niezmodyfikowanego MTX. Oba związki wykazywały silną aktywność w niskich dawkach (Figure 2, 3 – publikacja **P.9**). Za pomocą cytometrii przepływowej przeprowadzono analizy, które wykazały, że **MTX-Glu** oraz MTX są zdolne do skierowania komórek chłoniaka i białaczki na drogę apoptozy (Figure 4, 5 – publikacja **P.9**), a także oba preparaty wpływają na cykl życia komórek białaczki poprzez zatrzymanie syntezy DNA w fazie S cyklu komórkowego (Figure 6, 7 – publikacja **P.9**). Wynik ten wnosi, że oba związki wykazują podobny mechanizm działania, więc cytotoksyczność indukowaną przez **MTX-Glu** można przypisać metotretosatowi uwalnianemu wewnątrzkomórkowo. Dodatkowo badanie wychwytu komórkowego z wykorzystaniem spektrometrii masowej wykazało, że połączenie metotreksatu z glukozą znacząco zwiększyło akumulację leku w przedziale wewnątrzkomórkowym, w porównaniu z wolnym MTX (Figure 8 – publikacja **P.9**). Wyniki te potwierdzają hipotezę, że koniugaty glukozy wykorzystują efekt Warburga i preferencyjnie gromadzą się w komórkach nowotworowych.

Dalsza ocena aktywności antyproliferacyjnej *in vitro* glikokoniugatu MTX została przetestowana na liniach nowotworowych: SCC-25 (rak płaskonabłonkowy), A-427 (rak płuc), MCF-7 (rak piersi), MG-63 (kostniakomięsak), DLD-1 (rak jelita grubego) oraz komórkach zdrowych WI-38 (fibroblasty). **MTX-Glu** wykazał nieco słabszy lub porównywalny efekt cytotoksyczny do MTX wobec wspomnianych linii komórek nowotworowych i był mniej toksyczny wobec komórek zdrowych od MTX (Figure 2 – publikacja **P.10**).

Testy cytotoksyczności przeprowadzone z zastosowaniem inhibitora GLUT1, jakim jest 4,6-*O*-etylideno- α -D-glukoza (EDG), ukazują hamowanie aktywności cytotoksycznej **MTX-Glu** w obecności EDG (odwrotnie niż w przypadku MTX), co potwierdza hipotezę, że transporter glukozy GLUT1 może być zaangażowany w wychwytywanie komórkowy glikokoniugatu MTX. Mniejsza akumulacja leku w komórkach skutkuje mniejszą cytotoksycznością (Figure 3 – publikacja **P.10**). Po raz kolejny pomiar wychwytywania komórkowego MTX i **MTX-Glu** metodą spektrometrii masowej wykazał, że wychwytywanie glikokoniugatu w komórkach raka okrężnicy SW-480 jest znacznie bardziej wydajny w porównaniu z wolnym MTX. W przedziale wewnątrzkomórkowym dochodzi do rozszczepienia wiązań w koniugacie, co skutkuje uwolnieniem i akumulacją wolnego MTX (Figure 4 – publikacja **P.10**). Analiza za pomocą cytometrii przepływowej wskazuje, że zarówno **MTX-Glu**, jak i MTX wpływają na cykl komórkowy linii MCF-7 w podobny sposób, prowadząc do zatrzymania cyklu w fazie S, co potwierdza taki sam mechanizm działania badanych związków (Figure 5, Table 1 – publikacja **P.10**).

Kolejne badania dotyczyły oceny aktywności *in vivo* glikokoniugatu MTX na modelach mysich. **MTX-Glu** powodował znaczne opóźnienie wzrostu guza u myszy z nowotworem sutka 4T1, który charakteryzuje się nadekspresją receptorów GLUT1 [132], w porównaniu z myszami leczonymi MTX oraz myszami kontrolnymi (Figure 6 – publikacja **P.10**). Ocena histopatologiczna narządów i tkanek myszy wykonana po zakończeniu terapii wykazała, że leczenie glikokoniugatem nie wpłynęło na ich stan, natomiast leczenie metotreksatem prowadziło do stanów zapalnych w wątrobie i płucach (Figure 7 – publikacja **P.10**).

Reasumując, przedstawiony cykl badań zawiera propozycję wydajnej metody syntezy nowej klasy związków do zastosowań terapeutycznych oraz ocenę wstępnej aktywności przeciwnowotworowej nowego glikokoniugatu metotreksatu. Stwierdzono, że **MTX-Glu** wykazuje silne działanie cytotoksyczne w środowisku *in vitro* wobec szerokiego panelu linii komórek nowotworowych, zbliżone do aktywności niezmodyfikowanego MTX. Zostało to potwierdzone w badaniach *in vivo* celujących w nowotwór piersi u myszy. Jednocześnie koniugat MTX wykazał niską toksyczność względem komórek nienowotworowych, co znacznie poprawiło selektywność leku. Również wychwytywanie glikokoniugatu przez komórki nowotworowe i jego akumulacja w przedziale wewnątrzkomórkowym jest zdecydowanie bardziej wydajna w porównaniu z MTX, co może wskazywać na ułatwiony transport glikokoniugatu poprzez celowanie w transportery GLUT1, jego rozkład w komórce i wewnątrzkomórkowe uwolnienie cząsteczki aktywnej. Należy mieć jednak na uwadze, że dotychczasowe wyniki nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że koniugat jest kierowany do komórki specyficznie za pomocą transporterów GLUT1. Jednakże, biorąc pod uwagę wysoce hydrofilową naturę zaprojektowanego glikokoniugatu, a także jego rozmiar, jest mało prawdopodobnie, aby ulegał internalizacji przez błonę komórkową na zasadzie dyfuzji biernej.

Opisane tutaj wyniki stanowią interesujący punkt wyjścia do dalszych prac badawczych poświęconych funkcjonalizacji MTX za pomocą cząsteczek cukru. W ramach kontynuacji badań nad tym zagadnieniem, zsyntezowałam nowe, oparte na glukozie analogi MTX, a uzyskane obiecujące wyniki dotyczące aktywności *in vitro* oraz *in vivo* skłoniły nasz zespół do podjęcia prac nad przygotowaniem zgłoszenia patentowego o zasięgu europejskim.

4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Podsumowując, badania podjęte w ramach prezentowanego monotematycznego cyklu dotyczyły opracowania strategii ukierunkowanego transportu glikokoniugatów do komórek nowotworowych, wykorzystując charakterystyczny dla nich efekt Warburga. W ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej zsyntezowałam oraz przeprowadziłam ocenę aktywności biologicznej nowych glikokoniugatów pochodnych 8-hydroksychinoliny oraz glikokoniugatu metotreksatu. Cechą wspólną zaprojektowanych cząsteczek jest obecność w części aglikonu związków biologicznie aktywnych zawierających w swojej strukturze fragment *N*-heterocykliczny (8-HQ lub MTX), a także obecność w strukturze łącznika fragmentu 1,2,3-triazolowego. Proleki zostały zaprojektowane z uwzględnieniem niektórych unikalnych cech komórek nowotworowych. Fragment cukrowy glikokoniugatu może zakłócać szlak metabolizmu glukozy, natomiast potencjał cytotoksyczny pochodnych 8-HQ związany jest z ich zdolnością do kompleksowania jonów metali, na które zwiększone zapotrzebowanie wykazują komórki nowotworowe. Głównym celem badań było określenie wpływu zastosowanych modyfikacji strukturalnych glikokoniugatów na wykazywaną przez nie aktywność przeciwnowotworową.

W ramach części syntetycznej niniejszej pracy doktorskiej, na początku otrzymałam szeroką gamę elementów budulcowych niezbędnych do dalszych reakcji. Do łączenia pochodnych D-glukozy lub D-galaktozy ze związkiem biologicznie aktywnym wykorzystałam zarówno pozycję anomeryczną cukru, jak i pozycję C-6. Cząsteczkę 8-hydroksychinoliny sfunkcjonalizowałam w pozycji 8-OH, natomiast metotreksat modyfikowałam poprzez funkcjonalizację grup aminowych. Do substratów dołączałam odpowiednie grupy funkcyjne, umożliwiające przeprowadzenie między nimi reakcji 1,3-dipolarnej cykloadycji azydoalkinowej katalizowanej miedzią(I). Potwierdziłam, że podejście *click chemistry* zapewnia prosty, niedrogi i uniwersalny sposób łączenia dwóch cząsteczek w celu uzyskania szerokiej gamy produktów o wysokiej czystości z dobrą wydajnością i selektywnością. Aspekt ten jest ważny z punktu widzenia zastosowania ich jako potencjalnych leków w przemyśle farmaceutycznym, gdyż eliminuje nieopłacalność procesu ich otrzymywania ze względu na czasochłonność i kosztowność. W rezultacie otrzymałam i w pełni scharakteryzowałam sto dwadzieścia nowych glikokoniugatów, a także ich potencjalne metabolity, co znacznie rozszerza dotychczasową bibliotekę tego typu struktur opisanych w literaturze.

Część poświęcona badaniom biologicznym miała na celu wstępną ocenę aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych cząsteczek. Badania przesiewowe obejmowały ocenę zdolności związków do hamowania proliferacji wybranych linii komórek nowotworowych oraz komórek prawidłowych w środowisku *in vitro*, do czego posłużył test cytotoksyczności MTT. Dzięki badaniom przeprowadzonym na zdrowych komórkach możliwa była ocena selektywności badanych związków w stosunku do komórek nowotworowych, co ma kluczowe znaczenie w projektowaniu i syntezie leków przeciwnowotworowych. Dla wybranych pochodnych przeprowadziłam dodatkowe eksperymenty mające na celu przybliżenie prawdopodobnego mechanizmu ich działania.

Na wstępie sprawdziłam, czy elementy budulcowe niezbędne do uzyskania końcowych glikokoniugatów są w stanie ograniczyć proliferację komórkową. Pochodne cukrów okazały się nieaktywne w stosunku do testowanych linii komórkowych. Zaobserwowałam jednak wysoką toksyczność 8-HQ i jej pochodnych względem linii komórkowej raka piersi. Związek ten jest zatem atrakcyjnym punktem wyjściowym do modyfikacji strukturalnych, dających nadzieję na uzyskanie skutecznych terapeutów opartych na szkielecie chinoliny.

Badania wstępne obejmujące ocenę aktywności pierwszych otrzymanych glikokoniugatów chinolinowych, których wyniki opisałam w publikacji **P.1**, wykazały że dla aktywności biologicznej istotna jest obecność w strukturze zarówno jednostki cukrowej, jak i fragmentu 1,2,3-triazolowego. Można zatem założyć, że cukier poprawia biodostępność preparatu oraz jego rozpuszczalność, podczas gdy *N*-heteroaromatyczny fragment zwiększa cytotoksyczność glikokoniugatów, prawdopodobnie poprzez poprawę zdolności do chelatowania jonów metali obecnych w mikrośrodku wielu typów nowotworów. Obiecujące wyniki badań wstępnych rozpoczęły cykl prac poświęcony modyfikacjom strukturalnym glikokoniugatów chinolinowych, dążących do zwiększenia ich aktywności biologicznej. Modyfikacje te dotyczyły wydłużenia łańcucha alkilowego między pierścieniem 1,2,3-triazolowym i fragmentem chinolinowym lub cukrowym, a także wprowadzenia do struktury łącznika dodatkowej grupy amidowej, karbaminianowej lub fragmentu heteroaromatycznego. Sprawdziłam również, jak rodzaj atomu w pozycji anomerycznej cukru oraz orientacja przestrzenna pierścienia 1,2,3-triazolowego w łączniku wpływają na aktywność otrzymanych połączeń. W toku badań postanowiłam również ustalić, jaki wpływ na działanie biologiczne związku będzie miała zmiana pozycji podstawienia we fragmencie cukrowym.

W glikokoniugatach opisanych w publikacjach **P.2** i **P.3** dołączenia fragmentu cukrowego ze związkiem biologicznie aktywnym wykorzystałam pozycję anomeryczną cukru, w której atomem połączonym bezpośrednio z pozycją C-1 cukru był tlen, azot lub siarka. Choć wyznaczone wartości IC_{50} nie predestynują zastosowania uzyskanych związków do roli potencjalnych leków, można zauważyć pewne prawidłowości w ich budowie, które wpływają na aktywność otrzymanych cząsteczek. Nie oznacza to również, że te same związki nie wykażą większej aktywności względem innych linii komórkowych. Glikokoniugaty zawierające wiązanie amidowe w strukturze łącznika charakteryzowały się największą aktywnością spośród przebadanych struktur względem testowanych linii komórek nowotworowych. Tym samym sugeruje to, że obecność w strukturze dodatkowego fragmentu z wolnymi parami elektronowymi zdolnymi do oddziaływania z jonami metali jest ważna. W tym kontekście, warto było przeprowadzić eksperymenty dotyczące zdolności kompleksowania metali, które potwierdziły, że otrzymane glikokoniugaty są zdolne do chelatowania jonów miedzi, a obecność fragmentu 1,2,3-triazolu poprawia ich potencjał do tworzenia takich kompleksów.

Co ciekawe, glikokoniugaty z ugrupowaniem amidowym w strukturze łącznika nie wpłynęły znacząco na hamowanie aktywności metalozależnego enzymu β -1,4-galaktozylotransferazy I, której nadekspresję zaobserwowano w przypadku niektórych typów nowotworów. Z drugiej strony zauważyłam, że wydłużenie łańcucha alkilowego między częścią triazolową a chinolinową zwiększa potencjał glikokoniugatów do inhibicji użytego enzymu, co prawdopodobnie wynika ze zwiększonej „elastyczności” łącznika i można przypuszczać, że sprzyja to odpowiedniemu usytuowaniu związku w centrum aktywnym enzymu.

Mając na uwadze, że przedwczesna hydroliza glikokoniugatów w krążeniu ogólnoustrojowym może być powodem ich umiarkowanej aktywności, ważne jest aby glikokoniugaty dotarły do komórki w postaci niezmienionej. W toku dalszych badań stwierdziłam, że na poprawę stabilności hydrolitycznej glikokoniugatów chinolinowych wpływa obecność siarki w pozycji anomerycznej cukru. Zabieg ten nie wpływa jednak na ich selektywność. Nawiązując do badań kompleksowania, na przykładzie glikokoniugatów pochodnych 1-tiocukrów przeprowadziłam dodatkowe eksperymenty pomiaru ich aktywności antyproliferacyjnej (test MTT) w obecności dostarczonych z zewnątrz jonów Cu^{2+} . Zaobserwowałam, że cytotoksyczność glikokoniugatów istotnie wzrosła w obecności jonów miedzi w stosunku do wyników uzyskanych w eksperymentach, w których stosowałam

glikokoniugaty bez dodatku jonów miedzi. Potwierdza to właściwości kompleksujące badanych pochodnych oraz wrażliwość komórek na obecność jonów miedzi.

Idąc dalej, można zauważyć, że aktywność otrzymanych glikokoniugatów zależy od obecności grup zabezpieczających w jednostce cukrowej. Mianowicie, pochodne z acetylowymi grupami ochronnymi w fragmencie cukrowym w większym bądź mniejszym stopniu są zdolne do hamowania proliferacji komórek. Potwierdza to, że lipofilowość ma znaczący wpływ na aktywność biologiczną badanych związków, a wiąże się to z ułatwieniem transportu biernego przez błony biologiczne do wnętrza komórek. Istotne jest, że ten rodzaj transportu nie jest selektywny, więc wspomniane związki jednocześnie okazały się być toksyczne również dla komórek prawidłowych. Natomiast pochodne z niezabezpieczonym fragmentem cukru wykazują znikomą aktywność, prawdopodobnie ze względu na ich wysoką hydrofilowość i niskie powinowactwo do błony komórkowej oraz niedopasowanie do struktury transporterów GLUT. Rezultat ten wskazał, że badania nad zależnością aktywności cytotoksycznej glikokoniugatów od ich struktury należało poszerzyć w kierunku umożliwiającym lepsze dopasowanie glikokoniugatów do białek transportujących cukry przez błony komórkowe.

Według doniesień literaturowych, grupa 6-OH to pozycja w cukrze, która jest najmniej zaangażowana w wiązanie z transporterem GLUT1. W związku z tym publikacja **P.4** została poświęcona glikokoniugatom, w których związki biologicznie aktywne przyłączyłam za pośrednictwem pozycji C-6 jednostki cukrowej. Pochodne te okazały się bardziej cytotoksyczne i jednocześnie bardziej selektywne niż analogiczne glikokoniugaty utworzone przez pozycję C-1 D-glukozy. Dodatkowo, przeciwnie niż w przypadku glikokoniugatów funkcjonalizowanych w pozycji anomerycznej, nowa seria glikokoniugatów zawierająca niezabezpieczoną resztę glukozy jest znacznie bardziej selektywna względem komórek nowotworowych, w porównaniu z pochodnymi z zabezpieczeniami acetylowymi. Przeprowadzone eksperymenty (m.in. test cytotoksyczności w obecności inhibitora EDG) sugerują, że w wychwyty nowej serii glikokoniugatów mogą być zaangażowane transportery GLUT1, dzięki czemu mogą być one przenoszone bezpośrednio do komórek nowotworowych, pozwalając uniknąć toksyczności ogólnoustrojowej. Ponadto glikokoniugaty te wykazały właściwości proapoptotyczne, bez znaczącego wpływu na zmiany w dystrybucji cyklu komórkowego, a także były w stanie zmniejszać potencjał klonogeny komórek nowotworowych oraz hamować zdolność migracyjną komórek i interkalować DNA.

Kolejnym aspektem badań opisanych w publikacjach **P.6** i **P.7** oraz częściowo w **P.5** było wykorzystanie nanoosiłków polimerowych do ukierunkowanego transportu wybranych glikokoniugatów i ich metabolitów, których uwalnianie miałyby nastąpić wskutek degradacji chemicznej nośnika w obniżonym pH mikrośrodowiska nowotworu. Przeprowadzone badania dowodzą, że zabieg enkapsulacji glikokoniugatów do nanoosiłków znacząco zwiększa ich skuteczność oraz selektywność wobec komórek nowotworowych, co można przypisać zwiększonemu wychwytywowi komórkowemu nośników i wewnątrzkomórkowemu uwalnianiu enkapsulowanych leków. Ze względu na charakter chemiczny użytych miceli, możliwe jest obciążenie ich wyłącznie związkami hydrofobowymi, takimi jak glikokoniugaty z acetylowymi zabezpieczeniami grup hydroksylowych. Jedną z przyszłych możliwości zwiększenia selektywności jest opracowanie materiału polimerowego umożliwiającego zamknięcie hydrofilowych glikokoniugatów z niezabezpieczonym fragmentem cukrowym. Gdyby uwolnienie leków następowało w środowisku zewnątrzkomórkowym, takie związki miałyby potencjał przenikania do komórki nowotworowej poprzez aktywny transport przez transportery GLUT.

Kolejnym związkiem, do którego postanowiłam przyłączyć jednostkę cukrową był metotreksat, czyli znany i stosowany w medycynie cytostatyk. Podejście do glikokoniugacji MTX zostało opisane w publikacjach **P.8**, **P.9** oraz **P.10** wchodzących w zakres niniejszej rozprawy doktorskiej. Kompleksowa ocena aktywności przeciwnowotworowej w środowisku *in vitro* oraz *in vivo* pozwoliła stwierdzić, że glikokoniugat metotreksatu wykazuje silne działanie cytotoksyczne wobec szerokiego panelu linii komórek nowotworowych, zbliżone do aktywności niezmodyfikowanego MTX, nawet w warunkach hipoksji i niedoboru glukozy. Jednocześnie strategia glikokoniugacji pozwoliła obniżyć toksyczność ogólnoustrojową towarzyszącą stosowaniu MTX. Analiza za pomocą cytometrii przepływowej wskazuje, że oba związki wykazują podobny mechanizm działania, poprzez zatrzymanie syntezy DNA w fazie S cyklu komórkowego. Dodatkowe pomiary wychwytu komórkowego z wykorzystaniem spektrometrii masowej dowiodły, że glikokoniugat akumuluje się w przedziale wewnątrzkomórkowym, gdzie następnie uwalnia ładunek cytotoksyczny (MTX). Potwierdziły to testy z zastosowaniem EDG – inhibitora GLUT1, tym samym uwiarygadniając hipotezę, że transporter glukozy GLUT1 może być zaangażowany w wychwyt komórkowy glikokoniugatu MTX.

Badania z udziałem MTX podkreślają potencjał glikokoniugatów jako środków przeciwnowotworowych, a także potwierdziły, że opisana tutaj strategia celowania w komórki nowotworowe, opracowana na przykładzie glikokoniugacji 8-HQ, stanowi uniwersalną metodę, którą można zastosować względem dowolnej cząsteczki biologicznie aktywnej.

W kontekście uzyskanych wyników dotyczących związków opartych na fragmencie 8-HQ, uzasadnione wydaje się być podjęcie dalszych eksperymentów nad otrzymaniem glikokoniugatów z wolną grupą 8-OH we fragmencie chinoliny. Pozwoli to zweryfikować hipotezę o jej kluczowym znaczeniu w procesie chelatowania jonów metali.

Reasumując, przeprowadzony cykl badań dowodzi, że strategia glikokoniugacji związków biologicznie aktywnych ma spory potencjał w przypadku zastosowania jej w leczeniu chorób nowotworowych. Znając już pewne zależności struktura-aktywność można wskazać te elementy strukturalne, które powinny się w cząsteczce znaleźć, by wykazywała ona działanie terapeutyczne. Z przeprowadzonego przeze mnie cyklu badań wynika, że aktywność otrzymanych glikokoniugatów pochodnych 8-HQ zależy od rodzaju przyłączonego cukru, obecności grup ochronnych w jednostkach cukrowych, pozycji poprzez którą cukier jest przyłączany i obecności odpowiednio skonstruowanego łącznika między cukrem i aglikonem. Uwieńczeniem badań jest obserwacja, że z punktu widzenia powinowactwa cząsteczki do receptorów GLUT1, funkcjonalizacja grupy hydroksylowej D-glukozy w pozycji C-6 jest korzystniejsza niż podstawienie D-glukozy w pozycji C-1, co przekłada się na selektywny transport glikokoniugatu przez błony biologiczne do komórek nowotworowych.

5. LITERATURA

- [1] Key Global Cancer Data for 2020; International Agency for Research on Cancer (IARC); <https://www.iarc.who.int/biennial-report-2020-2021web/> [dostęp: 4.01.2023]
- [2] Maeda, H.; Khatami, M. Analyses of repeated failures in cancer therapy for solid tumors: poor tumor-selective drug delivery, low therapeutic efficacy and unsustainable costs. *Clin. Trans. Med.* **2018**, *7*, 11.
- [3] Zhong, L.; Li, Y.; Xiong, L.; Wang, W.; Wu, M.; Yuan, T.; Yang, W.; Tian, C.; Miao, Z.; Wang, T.; Yang, S. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Sig. Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 201.
- [4] Souza, C.; Pellosi, D.S.; Tedesco, A.C. Prodrugs for targeted cancer therapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2019**, *19*, 483-502.
- [5] Srinivasarao, M.; Low, P.S. Ligand-targeted drug delivery. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 12133-12164.
- [6] Srinivasarao, M.; Galliford, C.V.; Low, P.S. Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 203-219.
- [7] Senapati, S.; Mahanta, A.K.; Kumar, S.; Maiti, P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Sig. Transduct. Target. Ther.* **2018**, *3*, 7.
- [8] Pérez-Herrero, E.; Fernández-Medarde, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *93*, 52-79.
- [9] Patel, T.K.; Adhikari, N.; Amin, A.; Biswas, S.; Jha, T.; Ghosh, B. Small molecule drug conjugates (SMDCs): an emerging strategy for anticancer drug design and discovery. *New J. Chem.* **2021**, *45*, 5291-5321.
- [10] Roma-Rodrigues, C.; Mendes, R.; Baptista, P.V.; Fernandes, A.R. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 840.
- [11] Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **1956**, *123*, 309-314.
- [12] Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029-1033.
- [13] DeBerardinis, R.J.; Chandel, N.S. We need to talk about the Warburg effect. *Nat. Metab.* **2020**, *2*, 127-129.
- [14] Barron, C.C.; Bilan, P.J.; Tsakiridis, T.; Tsiani, E. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism* **2016**, *65*, 124-139.
- [15] Tanasova, M.; Fedie, J.R. Molecular tools for facilitative carbohydrate transporters (Gluts). *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1774-1788.
- [16] Szablewski, L. Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1835*, 164-169.
- [17] Carvalho, K.C.; Cunha, I.W.; Rocha, R.M.; Ayala, F.R.; Cajaíba, M.M.; Begnami, M.D.; Vilela, R.S.; Paiva, G.R.; Andrade, R.G.; Soares, F.A. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics* **2011**, *66*, 965-972.
- [18] Ben-Haim, S; Eil, P. ¹⁸F-FDG PET and PET/CT in the Evaluation of Cancer Treatment Response. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 88-99.
- [19] Calvaresi, E.C.; Hergenrother, P.J. Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2319-2333.
- [20] Fu, J.; Yang, J.; Seeberger, P.H.; Yin, J. Glycoconjugates for glucose transporter-mediated cancer-specific targeting and treatment. *Carbohydr. Res.* **2020**, *498*, 108195.
- [21] Hossain, F.; Andreana, P.R. Developments in carbohydrate-based cancer therapeutics. *Pharmaceuticals* **2019**, *12*, 84.
- [22] Pohl, J.; Bertram, B.; Hilgard, P.; Nowrousian, M.R.; Stüben, J.; Wießler, M. D-19575—A sugar-linked isophosphoramidate mustard derivative exploiting transmembrane glucose transport. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1995**, *35*, 364-370.
- [23] Lacombe, D. Glufosfamide: Can we improve the process of anticancer agent development? *Expert Opin. Investig. Drugs* **2012**, *21*, 749-754.

- [24] Liu, P.; Lu, Y.; Gao, X.; Liu, R.; Zhang-Negrerie, D.; Shi, Y.; Wang, Y.; Wang, S.; Gao, Q. Highly water-soluble platinum(II) complexes as GLUT substrates for targeted therapy: improved anticancer efficacy and transporter-mediated cytotoxic properties. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2421-2423.
- [25] Wu, M.; Li, H.; Liu, R.; Gao, X.; Zhang, M.; Liu, P.; Fu, Z.; Yang, J.; Zhang-Negrerie, D.; Gao, Q. Galactose conjugated platinum(II) complex targeting the Warburg effect for treatment of non-small cell lung cancer and colon cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *110*, 32-42.
- [26] Patra, M.; Johnstone, T.C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S.J. A potent glucose-platinum conjugate exploits glucose transporters and preferentially accumulates in cancer cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2550-2554.
- [27] Ma, J.; Wang, Q.; Huang, Z.; Yang, X.; Nie, Q.; Hao, W.; Wang, P.G.; Wang, X. Glycosylated platinum(IV) complexes as substrates for glucose transporters (GLUTs) and organic cation transporters (OCTs) exhibited cancer targeting and human serum albumin binding properties for drug delivery. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 5736-5748.
- [28] Bononi, G.; Iacopini, D.; Cicio, G.; Di Pietro, S.; Granchi, C.; Di Bussolo, V.; Minutolo, F. Glycoconjugated metal complexes as cancer diagnostic and therapeutic agents. *ChemMedChem* **2021**, *16*, 30-64.
- [29] Akam, E.A.; Tomat, E. Targeting iron in colon cancer via glycoconjugation of thiosemicarbazone prochelators. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1807-1812.
- [30] Cao, J.; Cui, S.; Li, S.; Du, C.; Tian, J.; Wan, S.; Qian, Z.; Gu, Y.; Chen, W.R.; Wang, G. Targeted cancer therapy with a 2-deoxyglucose-based adriamycin complex. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1362-1373.
- [31] Liu, D.Z.; Sinchaikul, S.; Reddy, P.V.G.; Chang, M.Y.; Chen, S.T. Synthesis of 2'-paclitaxel methyl 2-glucopyranosyl succinate for specific targeted delivery to cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 617-620.
- [32] Lin, Y.S.; Tungpradit, R.; Sinchaikul, S.; An, F.M.; Liu, D.Z.; Phutrakul, S.; Chen, S.T. Targeting the delivery of glycan-based paclitaxel prodrugs to cancer cells via glucose transporters. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7428-7441.
- [33] Reux, B.; Weber, V.; Galmier, M.J.; Borel, M.; Madesclaire, M.; Madelmont, J.C.; Debiton, E.; Coudert, P. Synthesis and cytotoxic properties of new fluorodeoxyglucose-coupled chlorambucil derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5004-5020.
- [34] Miot-Noirault, E.; Reux, B.; Debiton, E.; Madelmont, J.C.; Chezal, J.M.; Coudert, P.; Weber, V. Preclinical investigation of tolerance and antitumor activity of new fluorodeoxyglucose-coupled chlorambucil alkylating agents. *Invest. New Drugs* **2011**, *29*, 424-433.
- [35] He, Q.L.; Minn, I.; Wang, Q.; Xu, P.; Head, S.A.; Datan, E.; Yu, B.; Pomper, M.G.; Liu, J.O. Targeted delivery and sustained antitumor activity of triptolide through glucose conjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12035-12039.
- [36] Datan, E.; Minn, I.; Xu, P.; He, Q.L.; Ahn, H.H.; Yu, B.; Pomper, M.G.; Liu, J.O. A glucose-triptolide conjugate selectively targets cancer cells under hypoxia. *iScience* **2020**, *23*, 101536.
- [37] Gupte, A.; Mumper, R.J. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 32-46.
- [38] Denoyer, D.; Masaldan, S.; La Fontaine, S.; Cater, M.A. Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. *Metallomics* **2015**, *7*, 1459-1476.
- [39] Santini, C.; Pellei, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 815-862.
- [40] Helsel, M.E.; Franz, K.J. Pharmacological activity of metal binding agents that alter copper bioavailability. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 8760-8770.
- [41] Gaur, K.; Vázquez-Salgado, A.M.; Duran-Camacho, G.; Dominguez-Martinez, I.; Benjamín-Rivera, J.A.; Fernández-Vega, L.; Carmona Sarabia, L.; Cruz García, A.; Pérez-Deliz, F.; Méndez Román, J.A.; Vega-Cartagena, M.; Loza-Rosas, S.A.; Rodríguez Acevedo, X.; Tinoco, A.D. Iron and copper intracellular chelation as an anticancer drug strategy. *Inorganics* **2018**, *6*, 126.
- [42] Kumar, D.; Jain, S.K. A comprehensive review of *N*-heterocycles as cytotoxic agents. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 4338-4394.

- [43] Vitaku, E.; Smith, D.T.; Njardarson, J.T. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10257-10274.
- [44] Solomon, V.R.; Lee, H. Quinoline as a privileged scaffold in cancer drug discovery. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1488-1508.
- [45] Afzal, O.; Kumar, S.; Haider, R.; Ali, R.; Kumar, R.; Jaggi, M.; Bawa, S. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 871-910.
- [46] Matada, B.S.; Pattanashettar, R.; Yernale, N.G. A comprehensive review on the biological interest of quinoline and its derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *32*, 115973.
- [47] Song, Y.; Xu, H.; Chen, W.; Zhan, P.; Liu, X. 8-Hydroxyquinoline: A privileged structure with a broad-ranging pharmacological potential. *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6*, 61-74.
- [48] Gupta, R.; Luxami, V.; Paul, K. Insights of 8-hydroxyquinolines: A novel target in medicinal chemistry. *Bioorg. Chem.* **2021**, *108*, 104633.
- [49] Prachayasittikul, V.; Prachayasittikul, S.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V. 8-Hydroxyquinolines: A review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des. Dev. Ther.* **2013**, *7*, 1157-1178.
- [50] Oliveri, V.; Vecchio, G. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *120*, 252-274.
- [51] Savić-Gajić, I.M.; Savić, I.M. Drug design strategies with metal-hydroxyquinoline complexes. *Expert Opin. Drug Discov.* **2020**, *15*, 383-390.
- [52] Lauria, A.; La Monica, G.; Bono, A.; Martorana, A. Quinoline anticancer agents active on DNA and DNA-interacting proteins: From classical to emerging therapeutic targets. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *220*, 113555.
- [53] Oliveri, V.; Vecchio, G. Glycoconjugates of Quinolines: Application in Medicinal Chemistry. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2016**, *16*, 1185-1194.
- [54] Oliveri, V.; Giuffrida, M.L.; Vecchio, G.; Aiello, C.; Viale, M. Gluconjugates of 8-hydroxyquinolines as potential anti-cancer prodrugs. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 4530-4535.
- [55] Oliveri, V.; Viale, M.; Caron, G.; Aiello, C.; Gangemi, R.; Vecchio, G. Glycosylated copper(II) ionophores as prodrugs for β -glucosidase activation in targeted cancer therapy. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 2023-2034.
- [56] Oliveri, V.; Viale, M.; Aiello, C.; Vecchio, G. New 8-hydroxyquinoline galactosides. The role of the sugar in the antiproliferative activity of copper(II) ionophores. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *142*, 101-108.
- [57] Oliveri, V.; Grasso, G.I.; Bellia, F.; Attanasio, F.; Viale, M.; Vecchio, G. Soluble sugar-based quinoline derivatives as new antioxidant modulators of metal-induced amyloid aggregation. *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 2591-2602.
- [58] Oliveri, V.; Puglisi, A.; Viale, M.; Aiello, C.; Sgarlata, C.; Vecchio, G.; Clarke, J.; Milton, J.; Spencer, J. New cyclodextrin-bearing 8-hydroxyquinoline ligands as multifunctional molecules. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 13946-13955.
- [59] Oliveri, V.; Bellia, F.; Pietropaolo, A.; Vecchio, G. Unusual cyclodextrin derivatives as a new avenue to modulate self- and metal-induced A β aggregation. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 14047-14059.
- [60] Oliveri, V.; Sgarlata, C.; Vecchio, G. Cyclodextrins 3-functionalized with 8-hydroxyquinolines: copper-binding ability and inhibition of synuclein aggregation. *Chem. Asian J.* **2016**, *11*, 2436-2442.
- [61] Oliveri, V.; Attanasio, F.; Puglisi, A.; Spencer, J.; Sgarlata, C.; Vecchio, G. Multifunctional 8-hydroxyquinoline-appended cyclodextrins as new inhibitors of metal-induced protein aggregation. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 8954-8964.
- [62] Li, W.; Zhang, Z.W.; Wang, S.X.; Ren, S.M.; Jiang, T. Synthesis and analysis of potential DNA intercalators containing quinoline-glucose hybrids. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 80-86.
- [63] Zhao, J.; Li, W.; Ma, R.; Chen, S.; Ren, S.; Jiang, T. Synthesis and DNA interaction study of new potential DNA bis-intercalators based on glucuronic acid. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 16851-16865.
- [64] Pastuch-Gawolek, G.; Malarz, K.; Mrozek-Wilczkiewicz, A.; Musioł, M.; Serda, M.; Czaplińska, B.; Musioł, R. Small molecule glycoconjugates with anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *112*, 130-144.

- [65] Rashad, A.E.; El-Sayed, W.A.; Mohamed, A.M.; Ali, M.M. Synthesis of new quinoline derivatives as inhibitors of human tumor cells growth. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2010**, *8*, 440-448.
- [66] Freitas, L.B.O.; Borgati, T.F.; Freitas, R.P.; Ruiz, A.L.T.G.; Marchetti, G.M.; Carvalho, J.E.; Cunha, E.F.F.; Ramalho, T.C.; Alves, R.B. Synthesis and antiproliferative activity of 8-hydroxyquinoline derivatives containing a 1,2,3-triazole moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *84*, 595-604.
- [67] Areti, S.; Bandaru, S.; Rao, C.P. Triazole-linked quinoline conjugate of glucopyranose: Selectivity comparison among Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺ based on spectroscopy, thermodynamics, and microscopy, and reversible sensing of Zn²⁺ and the structure of the complex using DFT. *ACS Omega* **2016**, *1*, 626-635.
- [68] Makuch, S.; Woźniak, M.; Krawczyk, M.; Pastuch-Gawolek, G.; Szeja, W.; Agrawal, S. Glycoconjugation as a promising treatment strategy for psoriasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2020**, *373*, 204-212.
- [69] Rajitha, P.; Biswas, R.; Sabitha, M.; Jayakumar, R. Methotrexate in the treatment of psoriasis and rheumatoid arthritis: Mechanistic insights, current issues and novel delivery approaches. *Curr Pharm. Des.* **2017**, *23*, 3550-3566.
- [70] Abolmaali, S.S.; Tamaddon, A.M.; Dinarvand, R. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, *71*, 1115-1130.
- [71] Maksimovic, V.; Pavlovic-Popovic, Z.; Vukmirovic, S.; Cvejic, J.; Mooranian, A.; Al-Salami, H.; Mikov, M.; Golocorbin-Kon, S. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 4699-4708.
- [72] Abdulrahman, L.; Bakare, O.; Abdulrahman, M. The chemical approach of methotrexate targeting. *Front. Biosci.* **2017**, *1*, 50-73.
- [73] Yang, V.; Gouveia, M.J.; Santos, J.; Koksche, B.; Amorim, I.; Gärtner, F.; Vale, N. Breast cancer: Insights in disease and influence of drug methotrexate. *RSC Med. Chem.* **2020**, *11*, 646-664.
- [74] Pignatello, R.; Vicari, L.; Sorrenti, V.; Di Giacomo, C.; Spampinato, G.; Puglisi, G.; Toth, I. Lipophilic methotrexate conjugates with glucose-lipoamino acid moieties: Synthesis and in vitro antitumor activity. *Drug Dev. Res.* **2001**, *52*, 454-461.
- [75] Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [76] Kolb, H.C.; Sharpless, K.B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *DDT* **2003**, *8*, 1128-1137.
- [77] Dheer, D.; Singh, V.; Shankar, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorg. Chem.* **2017**, *71*, 30-54.
- [78] Liang, L.; Astruc, D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) "click" reaction and its applications. An overview. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2933-2945.
- [79] Rostovtsev, V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [80] Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H.H.Y.; Williams, I.D.; Sharpless, K.B.; Fokin, V.V.; Jia, G. Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998-15999.
- [81] Struthers, H.; Mindt, T.L.; Schibli, R. Metal chelating systems synthesized using the copper(I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 675-696.
- [82] Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. Click chemistry for drug development and diverse chemical-biology applications. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905-4979.
- [83] Forezi, L.S.M.; Lima, C.G.S.; Amaral, A.A.P.; Ferreira, P.G.; de Souza, M.C.B.V.; Cunha, A.C.; da Silva, F. de C.; Ferreira, V.F. Bioactive 1,2,3-triazoles: An account on their synthesis, structural diversity and biological applications. *Chem. Rec.* **2021**, *21*, 2782-2807.
- [84] Rani, A.; Singh, G.; Singh, A.; Maqbool, U.; Kaur, G.; Singh, J. CuAAC-enssembled 1,2,3-triazole-linked isosteres as pharmacophores in drug discovery: review. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 5610-5635.
- [85] Alam, M.M. 1,2,3-Triazole hybrids as anticancer agents: A review. *Arch. Pharm.* **2022**, *355*, 2100158.

- [86] Xu, Z.; Zhao, S.J.; Liu, Y. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, action mechanisms and structure-activity relationships. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *183*, 111700.
- [87] Kushwaha, D.; Singh, S.K.; Tiwari, V.K. Chapter Ten: Carbo-click in drug discovery and development: Opportunities and challenges. *Carbohydrates in Drug Discovery and Development. Synthesis and Application* **2020**, 403-450.
- [88] Tiwari, V.K.; Mishra, B.B.; Mishra, K.B.; Mishra, N.; Singh, A.S.; Chen, X. Cu-catalyzed click reaction in carbohydrate chemistry. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3086-3240.
- [89] Agrahari, A.K.; Bose, P.; Jaiswal, M.K.; Rajkhowa, S.; Singh, A.S.; Hotha, S.; Mishra, N.; Tiwari, V.K. Cu(I)-catalyzed click chemistry in glycoscience and their diverse applications. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 7638-7956.
- [90] Figg, W.D.; Cole, K.A.; Reed, E.; Steinberg, S.M.; Piscitelli, S.C.; Davis, P.A.; Soltis, M.J.; Jacob, J.; Boudoulas, S.; Goldspiel, B. Pharmacokinetics of orally administered carboxyamido-triazole, an inhibitor of calcium-mediated signal transduction. *Clin. Cancer Res.* **1995**, *8*, 797-803.
- [91] Markham, A. Savolitinib: First approval. *Drugs* **2021**, *81*, 1665-1670.
- [92] Barnett, J.E.G.; Holman, G.D.; Munday, K.A. Structural requirements for binding to the sugar-transport system of the human erythrocyte. *Biochem. J.* **1973**, *131*, 211-221.
- [93] Lancuški, A.; Bossard, F.; Fort, S. Carbohydrate-decorated PCL fibers for specific protein adhesion. *Biomacromol.* **2013**, *14*, 1877-1884.
- [94] Le Roux, A.; Meunier, S.; Le Gall, T.; Denis, J.M.; Bischoff, P.; Wagner, A. Synthesis and radioprotective properties of pulvinic acid derivatives. *Chem. Med. Chem.* **2011**, *6*, 561-569.
- [95] Rajaram, H.; Palanivelu, M.K.; Arumugam, T.V.; Rao, V.M.; Shaw, P.N.; McGeary, R.P.; Ross, B.P. 'Click' assembly of glycoclusters and discovery of a trehalose analogue that retards A β 40 aggregation and inhibits A β 40-induced neurotoxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4523-4528.
- [96] Kónya, B.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L. Synthesis of heterocyclic *N*-(β -D-glucopyranosyl)carboxamides for inhibition of glycogen phosphorylase. *Carbohydr. Res.* **2012**, *351*, 56-63.
- [97] Hemantha, H.P.; Lamani, R.S.; Sureshbabu, V.V. Synthesis of hybrid peptidomimetics and neoglycoconjugates employing click protocol: Dual utility of poc-group for inserting carbamate-triazole units into peptide backbone. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2010**, *16*, 267-275.
- [98] Fulton, D.A.; Stoddart, J.F. Synthesis of cyclodextrin-based carbohydrate clusters by photoaddition reactions. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8309-8319.
- [99] Zhu, X.; Schmidt, R.R. Glycosylthiomethyl chloride: A new species for *S*-neoglycoconjugate synthesis. Synthesis of 1-*N*-glycosylthiomethyl-1,2,3-triazoles. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1081-1085.
- [100] Pietrzik, N.; Schips, C.; Ziegler, T. Efficient synthesis of glycosylated asparaginic acid building blocks via click chemistry. *Synthesis* **2008**, *4*, 519-526.
- [101] Pastuch-Gawolek, G.; Szeja, W. A facile and efficient synthesis of *S*-glycosylated derivatives of 5-nitropyridine. *Carbohydr. Lett.* **1997**, *2*, 281-286.
- [102] Zemplén, G.; Pacsu, E. Über die Verseifung acetylierter zucker und verwandter substanzen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62*, 1613-1614.
- [103] Arai, M.A.; Yamaguchi, Y.; Ishibashi, M. Total synthesis of agalloside, isolated from *Aquilaria agallocha*, by the 5-*O*-glycosylation of flavan. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 5025-5032.
- [104] Işılar, Ö.; Bulut, A.; Yaglioglu, A.S.; Demirtaş, İ.; Arat, E.; Türk, M. Synthesis and biological evaluation of novel urea, thiourea and squaramide diastereomers possessing sugar backbone. *Carbohydr. Res.* **2020**, *492*, 107991.
- [105] Campo, V.L.; Carvalho, I.; Da Silva, C.H.T.P.; Schenkman, S.; Hill, L.; Nepogodiev, S.A.; Field, R.A. Cyclooligomerisation of azido-alkyne-functionalised sugars: Synthesis of 1,6-linked cyclic *pseudo*-galactooligosaccharides and assessment of their sialylation by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 507-514.
- [106] Laurent, P.; Razafindralambo, H.; Wathélet, B.; Blecker, C.; Wathélet, J.P.; Paquot, M. Synthesis and surface-active properties of ionic amide derivatives, surfactants from renewable organic raw materials. *J. Surfact. Deterg.* **2011**, *14*, 51-63.

- [107] Wang, M.; Xu, Z.; Tu, P.; Yu, X.; Xiao, S.; Yang, M. α,α -Trehalose derivatives bearing guanidino groups as inhibitors to HIV-1 Tat-TAR RNA interaction in human cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2585-2588.
- [108] Srinivasachari, S.; Liu, Y.; Zhang, G.; Prevette, L.; Reineke, T.M. Trehalose click polymers inhibit nanoparticle aggregation and promote pDNA delivery in serum. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8176-8184.
- [109] Wu, Y.; Pan, M.; Dai, Y.; Liu, B.; Cui, J.; Shi, W.; Qiu, Q.; Huang, W.; Qian, H. Design, synthesis and biological evaluation of LBM-A5 derivatives as potent P-glycoprotein-mediated multidrug resistance inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 2287-2297.
- [110] Agnew, H.D.; Rohde, R.D.; Millward, S.W.; Nag, A.; Yeo, W.S.; Hein, J.E.; Pitram, S.M.; Tariq, A.A.; Burns, V.M.; Krom, R.J.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B.; Heath, J.R. Iterative in situ click chemistry creates antibody-like protein-capture agents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4944-4948.
- [111] Talisman, I.J.; Kumar, V.; Razzaghy, J.; Malhotra, S.V. *O*-Glycosidation reactions promoted by in situ generated silver *N*-heterocyclic carbenes in ionic liquids. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 883-890.
- [112] Kur'yanov, V.O.; Priskoka, U.S.; Chupakhina, T.A.; Chirva, V.Y. A phase-transfer glucosamination of phenols catalyzed by polyethylene glycol. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2005**, *31*, 335-336.
- [113] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.
- [114] Haber, R.S.; Rathan, A.; Weiser, K.R.; Pritsker, A.; Itzkowitz, S.H.; Bodian, C.; Slater, G.; Weiss, A.; Burstein, D.E. GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: A marker for poor prognosis. *Cancer* **1998**, *83*, 34-40.
- [115] Kang, S.S.; Chun, Y.K.; Hur, M.H.; Lee, H.K.; Kim, Y.J.; Hong, S.R.; Lee, J.H.; Lee, S.G.; Park, Y.K. Clinical significance of glucose transporter 1 (GLUT1) expression in human breast carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* **2002**, *93*, 1123-1128.
- [116] Weijers, C.A.G.M.; Franssen, M.C.R.; Visser, G.M. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 436-456.
- [117] Christiansen, M.N.; Chik, J.; Lee, L.; Anugraham, M.; Abrahams, J.L.; Packer, N.H. Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics* **2014**, *14*, 525-546.
- [118] Hung, J.S.; Huang, J.; Lin, Y.C.; Huang, M.J.; Lee, P.H.; Lai, H.S.; Liang, J.T.; Huang, M.C. C1GALT1 overexpression promotes the invasive behavior of colon cancer cells through modifying *O*-glycosylation of FGFR2. *Oncotarget* **2014**, *5*, 2096-2106.
- [119] Vidal, S.; Bruyère, I.; Malleron, A.; Augé, C.; Praly, J.P. Non-isosteric *C*-glycosyl analogues of natural nucleotide diphosphate sugars as glycosyltransferase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7293-7301.
- [120] De Leon, C.A.; Levine, P.M.; Craven, T.W.; Pratt, M.R. The sulfur-linked analog of *O*-GlcNAc (*S*-GlcNAc) is an enzymatically stable and a reasonable structural surrogate for *O*-GlcNAc at the peptide and protein levels. *Biochemistry* **2017**, *56*, 3507-3517.
- [121] Cagnoni, A.J.; Kovensky, J.; Uhrig, M.L. Design and synthesis of hydrolytically stable multivalent ligands bearing thiodigalactoside analogues for peanut lectin and human galectin-3 binding. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 6456-6467.
- [122] Deng, D.; Xu, C.; Sun, P.; Wu, J.; Yan, C.; Hu, M.; Yan, N. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* **2014**, *510*, 121-125.
- [123] Cabral, H.; Miyata, K.; Osada, K.; Kataoka, K. Block copolymer micelles in nanomedicine applications. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 6844-6892.
- [124] Mitchell, M.J.; Billingsley, M.M.; Haley, R.M.; Wechsler, M.E.; Peppas, N.A.; Langer, R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 101-124.
- [125] Sun, H.; Zhong, Z. 100th Anniversary of macromolecular science viewpoint: Biological stimulus-sensitive polymer prodrugs and nanoparticles for tumor-specific drug delivery. *ACS Macro Lett.* **2020**, *9*, 1292-1302.
- [126] Domiński, A.; Konieczny, T.; Duale, K.; Krawczyk, M.; Pastuch-Gawolek, G.; Kurcok, P. Stimuli-responsive aliphatic polycarbonate nanocarriers for tumor-targeted drug delivery. *Polymers* **2020**, *12*, 2890.

- [127] Tang, H.; Zhao, W.; Yu, J.; Li, Y.; Zhao, C. Recent development of pH-responsive polymers for cancer nanomedicine. *Molecules* **2019**, *24*, 4.
- [128] Deirram, N.; Zhang, C.; Kermaniyan, S.S.; Johnston, A.P.R.; Such, G.K. pH-Responsive polymer nanoparticles for drug delivery. *Macromol. Rapid Commun.* **2019**, *40*, 1800917.
- [129] Duncan, R.; Richardson, S.C.W. Endocytosis and intracellular trafficking as gateways for nanomedicine delivery: opportunities and challenges. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 2380-2402.
- [130] Ancey, P.B.; Contat, C.; Meylan, E. Glucose transporters in cancer—from tumor cells to the tumor microenvironment. *FEBS J.* **2018**, *285*, 2926-2943.
- [131] Adekola, K.; Rosen, S.T.; Shanmugam, M. Glucose transporters in cancer metabolism. *Curr. Opin. Oncol.* **2012**, *24*, 650-654.
- [132] Young, C.D.; Lewis, A.S.; Rudolph, M.C.; Ruehle, M.D.; Jackman, M.R.; Yun, U.J.; Ilkun, O.; Pereira, R.; Abel, E.D.; Anderson, S.M. Modulation of glucose transporter 1 (GLUT1) expression levels alters mouse mammary tumor cell growth in vitro and in vivo. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23205.

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Glikokoniugacja *N*-heterocyklicznych związków biologicznie aktywnych
oraz ocena ich aktywności przeciwnowotworowej

mgr inż. Monika Domińska

Promotor: dr hab. inż. Gabriela Pastuch-Gawołek, prof. PŚ

Glikokoniugacja związków biologicznie aktywnych polega na przyłączeniu fragmentu cukru do cząsteczki biologicznie aktywnej, poprzez utworzenie wiązania kowalencyjnego. Zabieg ten ma na celu ukierunkowanie cząsteczki do interakcji z białkami błonowymi GLUT, które odpowiadają za transport cukrów do przestrzeni wewnątrzkomórkowych. Glikokoniugacja wpływa na poprawę właściwości farmakokinetycznych potencjalnych leków przeciwnowotworowych, zwłaszcza ich selektywności, gdyż transportery cukrów ulegają nadekspresji w szybko namnażających się komórkach nowotworowych.

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej dotyczą syntezy oraz oceny aktywności biologicznej glikokoniugatów *N*-heterocyklicznych związków biologicznie aktywnych. Struktura zaprojektowanych glikokoniugatów składa się z trzech podstawowych elementów budulcowych: jednostki cukrowej, związku biologicznie aktywnego (8-hydroksychinoliny lub metotreksatu) oraz różnego typu łączników zawierających pierścień 1,2,3-triazolowy. W części syntetycznej pracy, odpowiednio zaprojektowane bloki budulcowe połączono ze sobą w wyniku katalizowanej miedzią(I) reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddykcji azydo-alkinowej należącej do innowacyjnej koncepcji *click chemistry*. Struktury wszystkich otrzymanych związków zostały potwierdzone za pomocą metod spektroskopowych (NMR i HRMS). Przeprowadzono ocenę aktywności biologicznej otrzymanych glikokoniugatów pod kątem ich zdolności do hamowania proliferacji wybranych linii komórek nowotworowych oraz komórek zdrowych (test cytotoksyczności MTT), a także zdolności do inhibicji modelowego enzymu z grupy transferaz na przykładzie β -1,4-galaktozylotransferazy I, której nadekspresja związana jest z rozwojem niektórych typów nowotworów. Dla najaktywniejszych związków zostały przeprowadzone dodatkowe badania, mające na celu przybliżenie możliwego mechanizmu ich działania.

W ramach realizacji pracy określono wpływ modyfikacji strukturalnych glikokoniugatów pochodnych 8-hydroksychinoliny na wykazywaną przez nie aktywność biologiczną. Ich aktywność zależy od rodzaju dołączonego cukru, pozycji poprzez którą cukier jest przyłączony, obecności grup ochronnych w reszcie cukrowej oraz obecności łącznika między cukrem a aglikonem chinolinowym. Cukier poprawia biodostępność preparatu oraz jego rozpuszczalność, natomiast obecność układu 1,2,3-triazolowego w strukturze łącznika wpływa na poprawę zdolności chelatowania jonów metali dwuwartościowych niezbędnych do wzrostu komórek nowotworowych. Wykazano, że glikokoniugaty utworzone z wykorzystaniem pozycji C-6 D-glukozy są bardziej cytotoksyczne i selektywne w porównaniu z analogicznymi glikokoniugatami utworzonymi poprzez pozycję anomeryczną. Tak zaprojektowane glikokoniugaty wykazują zwiększone powinowactwo do GLUT, dzięki którym mogą być transportowane bezpośrednio do komórek nowotworowych, unikając toksyczności ogólnoustrojowej. Ważnym aspektem kolejnych badań było wykorzystanie nanonośników polimerowych do ukierunkowanego transportu wybranych glikokoniugatów, których uwalnianie następowało wskutek degradacji chemicznej nośnika w obniżonym pH mikrośrodowiska nowotworu. W dalszej części pracy zaprezentowane zostały badania nad cukrową pochodną metotreksatu. Glikokoniugat ten jest selektywnie wychwytywany przez szereg komórek nowotworowych i hamuje ich wzrost w środowisku *in vitro*. Jego aktywność została również potwierdzona badaniami toksyczności *in vivo* w mysim modelu raka piersi.

SUMMARY OF THE DOCTORAL DISSERTATION

Glycoconjugation of *N*-heterocyclic biologically active compounds
and assessment of their anticancer activity

mgr inż. Monika Domińska

Supervisor: dr hab. inż. Gabriela Pastuch-Gawołek, prof. PŚ

Glycoconjugation of biologically active compounds consists in attaching a sugar fragment to a biologically active molecule by forming a covalent bond. This treatment is aimed at directing the molecule to interact with GLUT membrane proteins, which are responsible for the transport of sugars into intracellular spaces. Glycoconjugation improves the pharmacokinetic properties of potential anticancer drugs, especially their selectivity, as sugar transporters are overexpressed in rapidly proliferating cancer cells.

The research presented in the doctoral dissertation concerns the synthesis and assessment of the biological activity of glycoconjugates of *N*-heterocyclic biologically active compounds. The structure of the designed glycoconjugates consists of three basic building blocks: a sugar unit, a biologically active compound (8-hydroxyquinoline or methotrexate), and a various types of linkers containing a 1,2,3-triazole ring. In the synthetic part of the work, appropriately designed building blocks were connected together as a result of a copper(I) catalyzed reaction of 1,3-dipolar azido-alkyl cycloaddition belonging to the innovative *click chemistry* concept. The structures of all obtained compounds were confirmed by spectroscopic methods (NMR and HRMS). The biological activity of the obtained glycoconjugates was evaluated in terms of their ability to inhibit the proliferation of selected cancer cell lines and healthy cells (MTT cytotoxicity test), as well as the ability to inhibit the model enzyme from the group of transferases on the example of β -1,4-galactosyltransferase I, which overexpression is associated with the growth of some types of cancer. For the most active compounds, additional studies were conducted to approximate the possible mechanism of their action.

As part of the work, the influence of structural modifications of 8-hydroxyquinoline derivatives on their biological activity was determined. Their activity depends on the type of sugar attached, the position by which the sugar is attached, the presence of protecting groups in the sugar moiety, and the presence of a linker between the sugar and the quinoline aglycone. Sugar improves the bioavailability of the preparation and its solubility, while the presence of the 1,2,3-triazole fragment in the linker structure improves the ability to chelate divalent metal ions necessary for the growth of cancer cells. Glycoconjugates formed using the C-6 position of D-glucose have been shown to be more cytotoxic and selective compared to analogous glycoconjugates formed by the anomeric position. Such designed glycoconjugates show increased affinity for GLUT, thanks to which they can be transported directly to cancer cells, avoiding systemic toxicity. An important aspect of the next research was the use of polymeric nanocarriers for the targeted transport of selected glycoconjugates, which were released as a result of chemical degradation of the carrier in the reduced pH of the cancer microenvironment. In the following part of the paper, research on the sugar derivative of methotrexate was presented. This glycoconjugate is selectively taken up by a range of cancer cells and inhibits their growth in the *in vitro* environment. Its activity has also been confirmed by *in vivo* toxicity studies in a mouse model of breast cancer.

WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

Sumaryczny Impact Factor = 78,348

Sumaryczna liczba punktów MEiN = 1890

Sumaryczna liczba cytowań* = 133

Indeks Hirscha* = 7

* wg bazy Scopus na dzień 12.01.2023 r.

Publikacje w czasopismach notowanych w bazie JCR:

1. Co-Delivery of 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates and Doxorubicin by Supramolecular Hydrogel Based on α -Cyclodextrin and pH-Responsive Micelles for Enhanced Tumor Treatment
A. Domiński*, T. Konieczny, M. Godzierz, M. Musioł, H. Janeczek, A. Foryś, **M. Domińska**, G. Pastuch-Gawołek, T. Piotrowski, P. Kurcok*
Pharmaceutics (2022), 14, 2490 (IF₂₀₂₁ = 6,525; 100 pkt MEiN)
2. [P.4] Glycoconjugation of Quinoline Derivatives Using the C-6 Position in Sugars as a Strategy for Improving the Selectivity and Cytotoxicity of Functionalized Compounds
M. Domińska*, G. Pastuch-Gawołek, M. Skonieczna, W. Szeja, A. Domiński, P. Kurcok
Molecules (2022), 27, 6918 (IF₂₀₂₁ = 4,927; 140 pkt MEiN)
3. [P.5] Synthesis and Preliminary Evaluation of the Cytotoxicity of Potential Metabolites of Quinoline Glycoconjugates
M. Domińska*, G. Pastuch-Gawołek*, A. Domiński, P. Kurcok, K. Erfurt
Molecules (2022), 27, 1040 (IF₂₀₂₁ = 4,927; 140 pkt MEiN)
4. [P.7] Shell-Sheddable Micelles Based on Poly(ethylene glycol)-hydrazone-poly[R,S]-3-hydroxybutyrate Copolymer Loaded with 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates as a Dual Tumor-Targeting Drug Delivery System
A. Domiński*, **M. Domińska**, M. Skonieczna, G. Pastuch-Gawołek, P. Kurcok*
Pharmaceutics (2022), 14, 290 (IF₂₀₂₁ = 6,525; 100 pkt MEiN)
5. [P.9] The Effect of a New Glucose-Methotrexate Conjugate on Acute Lymphoblastic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma Cell Lines
M. Woźniak, S. Makuch, G. Pastuch-Gawołek, J. Wiśniewski, W. Szeja, M. Nowak, **M. Krawczyk***, S. Agrawal*
Molecules (2021), 26, 2547 (IF₂₀₂₁ = 4,927; 140 pkt MEiN)
6. [P.10] In Vitro and In Vivo Efficacy of a Novel Glucose-Methotrexate Conjugate in Targeted Cancer Treatment
M. Woźniak, G. Pastuch-Gawołek, S. Makuch, J. Wiśniewski, T. Krenács, P. Hamar, A. Gamian, W. Szeja, D. Szkudlarek, **M. Krawczyk***, S. Agrawal*
International Journal of Molecular Sciences (2021), 22, 1748 (IF₂₀₂₁ = 6,208; 140 pkt MEiN)
7. [P.8] Overcoming Hypoxia-Induced Chemoresistance in Cancer Using a Novel Glycoconjugate of Methotrexate
M. Woźniak, G. Pastuch-Gawołek, S. Makuch, J. Wiśniewski, P. Ziółkowski, W. Szeja, **M. Krawczyk***, S. Agrawal*
Pharmaceutics (2021), 14, 13 (IF₂₀₂₁ = 5,215; 100 pkt MEiN)

8. Glycoconjugation of Betulin Derivatives Using Copper-Catalyzed 1,3-Dipolar Azido-Alkyne Cycloaddition Reaction and a Preliminary Assay of Cytotoxicity of the Obtained Compounds
M. Grymel*, G. Pastuch-Gawołek, A. Lalik, M. Zawojak, S. Boczek, **M. Krawczyk**, K. Erfurt
Molecules (2020), 25, 6019 (IF₂₀₂₀ = 4,412; 140 pkt MEiN)
9. Anti-Tick-Borne Encephalitis Virus Activity of Novel Uridine Glycoconjugates Containing Amide or/and 1,2,3-Triazole Moiety in the Linker Structure
G. Brzuska, G. Pastuch-Gawołek, **M. Krawczyk**, B. Szewczyk, E. Król*
Pharmaceuticals (2020), 13, 460 (IF₂₀₂₀ = 5,863; 100 pkt MEiN)
10. Stimuli-Responsive Aliphatic Polycarbonate Nanocarriers for Tumor-Targeted Drug Delivery
A. Domiński, T. Konieczny, K. Duale, **M. Krawczyk**, G. Pastuch-Gawołek, P. Kurcok*
Polymers (2020), 12, 2890 (IF₂₀₂₀ = 4,329; 100 pkt MEiN)
11. **[P.3]** 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates Containing Sulfur at the Sugar Anomeric Position — Synthesis and Preliminary Evaluation of Their Cytotoxicity
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawołek, A. Hadasik, K. Erfurt
Molecules (2020), 25, 4174 (IF₂₀₂₀ = 4,412; 140 pkt MEiN)
12. **[P.6]** Biodegradable pH-Responsive Micelles Loaded with 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates for Warburg Effect Based Tumor Targeting
A. Domiński, **M. Krawczyk**, T. Konieczny, M. Kasprów, A. Foryś, G. Pastuch-Gawołek, P. Kurcok*
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (2020), 154, 317-329 (IF₂₀₂₀ = 5,571; 100 pkt MEiN)
13. Glycoconjugation as a Promising Treatment Strategy for Psoriasis
S. Makuch, M. Woźniak, **M. Krawczyk**, G. Pastuch-Gawołek, W. Szeja, S. Agrawal*
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (2020), 373, 204-212 (IF₂₀₂₀ = 4,030; 140 pkt MEiN)
14. **[P.2]** 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates: Modifications in the Linker Structure and Their Effect on the Cytotoxicity of the Obtained Compounds
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawołek, A. Pluta, K. Erfurt, A. Domiński, P. Kurcok
Molecules (2019), 24, 4181 (IF₂₀₁₉ = 3,267; 140 pkt MEiN)
15. **[P.1]** Synthesis of 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates and Preliminary Assay of Their β 1,4-GalT Inhibitory and Anti-Cancer Properties
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawołek, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Kuczak, M. Skonieczna, R. Musioł
Bioorganic Chemistry (2019), 84, 326-338 (IF₂₀₁₉ = 4,831; 100 pkt MEiN)
16. Catalyst-Free Friedel-Crafts Reaction of 1-(*N*-acylamino)alkyltriarylphosphonium Salts with Electron-Rich Arenes
J. Adamek*, A. Węgrzyk, **M. Krawczyk**, K. Erfurt
Tetrahedron (2018), 74, 2575-2583 (IF₂₀₁₈ = 2,379; 70 pkt MEiN)

*Wskaźnik Impact Factor (IF) został podany zgodnie z rokiem opublikowania. W przypadku prac opublikowanych w roku 2022 został przyjęty IF z roku 2021.
Punkty Ministra Edukacji i Nauki (MEiN) zostały podane zgodnie z najnowszym wykazem z dn. 21.12.2021 roku.*

Publikacje pokonferencyjne:

1. Glikokoniugaty chinolinowe zawierające w strukturze linkera azot i/lub siarkę – synteza i właściwości biologiczne
A. Hadasik*, **M. Krawczyk**, G. Pastuch-Gawołek
Zagadnienia aktualnie poruszane przez młodych naukowców, Wyd. CREATIVETIME, Kraków (2019), 15, 12-17 (ISBN: 978-83-63058-89-0)
2. Synteza i aktywność biologiczna glikokoniugatów pochodnych 8-hydroksychinoliny zawierających łącznik heteroaromatyczny
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawołek
Zagadnienia aktualnie poruszane przez młodych naukowców, Wyd. CREATIVETIME, Kraków (2018), 13, 34-39 (ISBN: 978-83-63058-83-8)
3. Glikokoniugaty pochodne 8-hydroksychinoliny – otrzymywanie i właściwości biologiczne
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawołek
Zagadnienia aktualnie poruszane przez młodych naukowców, Wyd. CREATIVETIME, Kraków (2017), 11, 117-122 (ISBN: 978-83-63058-72-2)

Patenty oraz zgłoszenia patentowe:

1. Koniugat metotreksatu i glukozy do zastosowania w zapobieganiu lub leczeniu chorób autoimmunologicznych
S. Agrawal, M. Woźniak, S. Makuch, W. Szeja, G. Pastuch-Gawołek, **M. Krawczyk**, J. Wiśniewski, A. Gamian, P. Ziółkowski, G. Mazur
Zgłoszenie patentowe krajowe nr P.438135 z dn. 11.06.2021 r.
2. Glikokoniugatowa pochodna metotreksatu i glukozy oraz sposób jej otrzymywania i jej zastosowanie w leczeniu i zapobieganiu nowotworom
S. Agrawal, M. Woźniak, S. Makuch, W. Szeja, G. Pastuch-Gawołek, **M. Krawczyk**, J. Wiśniewski, A. Gamian, P. Ziółkowski
Zgłoszenie patentowe krajowe nr P.438134 z dn. 11.06.2021 r.
3. Glikokoniugatowa pochodna metotreksatu i glukozy, jej zastosowanie oraz sposób otrzymywania
S. Agrawal, M. Woźniak, W. Szeja, A.K. Agrawal, A. Gamian, **M. Krawczyk**, G. Pastuch-Gawołek, S. Makuch, J. Wiśniewski, P. Ziółkowski
Zgłoszenie patentowe krajowe nr P.426731 z dn. 20.08.2018 r.
4. Sposób wytwarzania soli 1-aryloalkilofosfoniowych
J. Adamek, A. Węgrzyk, **M. Krawczyk**
Patent krajowy nr 235666 z dn. 19.05.2020 r.

Konferencje międzynarodowe:

1. Codelivery of 8-hydroxyquinoline glycoconjugates and doxorubicin with pH-responsive supramolecular hydrogel matrix for enhanced tumor treatment
A. Domiński*, T. Konieczny, **M. Domińska**, G. Pastuch-Gawolek, P. Kurcok
The Silesian Meetings on Polymer Materials Polymat 2022, 17.03.2022 Zabrze, Poland (Poster)
2. Glut-targeting improves the properties of drug glycoconjugates in relation to neoplastic cells
A. Kasprzycka, K. Żurawska, G. Pastuch-Gawolek, **M. Domińska**, M. Woźniak, S. Makuch, S. Agrawal, T. Cichoń, E. Pilny, W. Szeja*
XXV Gliwice Scientific Meetings, 18-20.11.2021 Gliwice, Poland (Referat)
3. Anti-coronaviruses activity of uridine glycoconjugates containing 1,2,3-triazole moiety
M. Graul, G. Pastuch-Gawolek, **M. Krawczyk**, B. Szewczyk, E. Król*
VIII European Seminar in Virology (EuSeV), 15-17.10.2021 Bertinoro, Italy (Poster)
4. pH-Responsive shell-sheddable micelles based on poly(ethylene glycol)-hydrazone-poly[R,S]-3-hydroxybutyrate copolymer for tumor-targeted drug delivery
A. Domiński*, **M. Krawczyk**, T. Konieczny, G. Pastuch-Gawolek, P. Kurcok
UK-Poland Bioinspired Materials Conference, 23-24.11.2020 on-line (Poster)
5. Glucose-conjugation enhances the anticancer effect of methotrexate *via* increase of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells in hypoxic and aglycemic conditions
S. Makuch*, M. Nowak, M. Woźniak, G. Pastuch-Gawolek, W. Szeja, **M. Krawczyk**, S. Agrawal
XXIV Gliwice Scientific Meetings, 20-21.11.2020 Gliwice, Poland (Poster)
6. Overcoming chemoresistance in SW480 colon cancer cells using novel glycoconjugate of methotrexate in hypoxic/aglycemic conditions
M. Woźniak*, M. Nowak, S. Makuch, G. Pastuch-Gawolek, W. Szeja, **M. Krawczyk**, S. Agrawal,
XXIV Gliwice Scientific Meetings, 20-21.11.2020 Gliwice, Poland (Poster)
7. Application of (5-amino-2-pyridyl) 1-thioglycosides derivatives to inhibit the growth of copper ions dependent cancer cells
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawolek
EFMC-ISMC & EFMC-YMCS Virtual Poster Session, 9.09.2020 on-line (Poster)
8. Prodrug delivery system. Increased effectiveness, selectivity, and tolerability of glycoconjugate derivative of methotrexate in cancer
S. Agrawal, W. Szeja*, G. Pastuch-Gawolek, **M. Krawczyk**, M. Woźniak
XXIII Gliwice Scientific Meetings, 22-23.11.2019 Gliwice, Poland (Referat)
9. Glycoconjugation as a strategy to improve the cytotoxicity properties of quinoline and uridine derivatives
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawolek
XXIII Gliwice Scientific Meetings, 22-23.11.2019 Gliwice, Poland (Poster)
10. pH-Responsive biodegradable micelles for triggered release of anticancer drugs
T. Konieczny*, A. Domiński, **M. Krawczyk**, M. Kasprów, A. Foryś, P. Kurcok
IV International Conference InterNanoPoland, 16-17.10.2019 Katowice, Poland (Poster)

11. Ocena cytotoksyczności i zdolności do chelatowania jonów metali glikokoniugatów chinolinowych i ich potencjalnych metabolitów
M. Krawczyk*, A. Walczyk, A. Domiński, G. Pastuch-Gawołek
 VIII Edition of the Conference for Young Scientists, Science Beyond Disciplines, 19-20.09.2019 Chorzów, Poland (Poster)
12. Wstrzykiwalne, pH-czułe supramolekularne hydrożele do kontrolowanego uwalniania leku
 A. Domiński*, T. Konieczny, **M. Krawczyk**, P. Kurcok
 VIII Edition of the Conference for Young Scientists, Science Beyond Disciplines, 19-20.09.2019 Chorzów, Poland (Referat)
13. Injectable, pH-sensitive supramolecular hydrogel for controlled drug delivery
 A. Domiński*, **M. Krawczyk**, T. Konieczny, M. Kasprów, A. Foryś, G. Pastuch-Gawołek, P. Kurcok
 XIX National Symposium Polymers 2019, 9-12.09.2019 Pomorie, Bulgaria (Poster)
14. Synthesis of quinoline glycoconjugates with potential anticancer activity using azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition
M. Krawczyk*, A. Pluta, A. Hadasik, G. Pastuch-Gawołek
 XXI International Symposium *Advances in the chemistry of heterorganic compounds*, 23.11.2018 Łódź, Poland (Poster)
15. Preliminary assessment of the *in vitro* activity of new quinoline glycoconjugates with built-in 1,2,3-triazole ring
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawołek, A. Pluta, R. Musioł
 XXII Gliwice Scientific Meetings, 16-17.11.2018 Gliwice, Poland (Poster)
16. Effect of structural modification and type of protecting groups in uridine glycoconjugates with 1,2,3-triazole in the linker on their antiproliferative activity
 G. Pastuch-Gawołek, **M. Krawczyk***, A. Tarnas
 XXII Gliwice Scientific Meetings, 16-17.11.2018 Gliwice, Poland (Poster)
17. Synthesis of 8-hydroxyquinoline glycoconjugates using azide-alkyne cycloaddition and preliminary evaluation of their anticancer activity
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawołek, M. Skonieczna, R. Musioł
 XXI Gliwice Scientific Meetings, 17-18.11.2017 Gliwice, Poland (Poster)
18. Synthesis of uridine glycoconjugates containing 1,2,3-triazole linker and their biological activity
 G. Pastuch-Gawołek*, M. Skonieczna, **M. Krawczyk**, S. Ratajczyk
 XXI Gliwice Scientific Meetings, 17-18.11.2017 Gliwice, Poland (Poster)
19. Mechanistic aspects of the classical and non-classical course of the Tscherniac-Einhorn-type reaction
 J. Adamek, **M. Krawczyk***, A. Węgrzyk
 XIX International Symposium *Advances in the chemistry of heterorganic compounds*, 25.11.2016 Łódź, Poland (Poster)
20. Synthesis of 8-hydroxyquinoline glycoconjugates and preliminary evaluation of their biological activity
M. Krawczyk, K. Górecka, G. Pastuch-Gawołek*, I. Wandzik, U. Nawrot
 XX Gliwice Scientific Meetings, 18-19.11.2016 Gliwice, Poland (Poster)

Konferencje krajowe:

1. Glikokoniugaty pochodne 8-aminochinoliny – synteza i wstępna ocena cytotoxycznosci
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawolek
Promovendi, Ogólnopolska Konferencja Naukowa Zrozumieć Naukę V edycja, 25.09.2021 on-line (Referat)
2. Biodegradowalne micelle z powloka PEG odlaczalna pod wplywem pH do kontrolowanego uwalniania lekow
A. Dominski*, **M. Krawczyk**, G. Pastuch-Gawolek, P. Kurcok
63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 13-17.09.2021 Łódź (Referat)
3. Ocena cytotoxycznosci potencjalnych metabolitow glikokoniugatow chinolinowych zawierajacych układ 1,2,3-triazolowy
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawolek
Promovendi, Ogólnopolska Konferencja Naukowa Zrozumieć Naukę IV edycja, 26.09.2020 on-line (Referat)
4. Wplyw rodzaju heteroatomu w pozycji anomerycznej cukru na cytotoxycznosc glikokoniugatow chinolinowych
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawolek
Kopernikańskie E-Seminarium Doktoranckie, 7.09.2020 on-line (Poster)
5. Zastosowanie pochodnych 1-tiocukrow w syntezie glikokoniugatow o potencjalnych wlasnosciach przeciwnowotworowych
M. Krawczyk*, A. Hadasik, G. Pastuch-Gawolek
III Seminarium Ogólnoakademickie *Metody fizykochemiczne w badaniach naukowych*, 17.04.2019 Sosnowiec (Poster)
6. Glikokoniugaty chinolinowe zawierajace w strukturze linkera azot i/lub siarke – synteza i wlasnosci biologiczne
A. Hadasik*, **M. Krawczyk**, G. Pastuch-Gawolek
Dokonania Naukowe Doktorantow VII edycja, 6.04.2019 Kraków (Referat)
7. Synteza i ocena cytotoxycznosci cukrowych pochodnych 8-hydroksychinoliny
M. Krawczyk*, A. Pluta, G. Pastuch-Gawolek, K. Juszcak, R. Musiol
VII Ogólnopolska Konferencja Pomiedzy Naukami, 14.09.2018 Chorzów (Poster)
8. Glikokoniugaty urydyny zawierajace w strukturze linker heterocykliczny – synteza i wstepna ocena ich aktywnosci biologicznej
A. Tarnas*, A. Hadasik, **M. Krawczyk**, G. Pastuch-Gawolek
VII Ogólnopolska Konferencja Pomiedzy Naukami, 14.09.2018 Chorzów (Poster)
9. Triazolowe pochodne pentacyklicznych triterpenow typu lupanu jako zwiazki o potencjalnej aktywnosci biologicznej
M. Zawojak*, **M. Krawczyk**, M. Grymel
VII Ogólnopolska Konferencja Pomiedzy Naukami, 14.09.2018 Chorzów (Poster)
10. Metody fizykochemiczne stosowane w syntezie i ocenie aktywnosci biologicznej glikokoniugatow pochodnych chinoliny i urydyny
M. Krawczyk*, A. Pluta, A. Tarnas, G. Pastuch-Gawolek
II Seminarium Ogólnoakademickie *Metody fizykochemiczne w badaniach naukowych*, 23.04.2018 Sosnowiec (Poster)

11. Synteza i aktywność biologiczna glikokoniugatów pochodnych 8-hydroksychinoliny zawierających łącznik heteroaromatyczny
M. Krawczyk*
Dokonania Naukowe Doktorantów VI edycja, 21.04.2018 Kraków (Referat)
12. Sole 1-aryloalkilotriarylofosfoniowe – otrzymywanie i właściwości
J. Adamek*, A. Węgrzyk, **M. Krawczyk**
60 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 17-21.09.2017 Wrocław (Poster)
13. Synteza i wstępna ocena aktywności przeciwnowotworowej glikokoniugatów pochodnych 8-hydroksychinoliny
M. Krawczyk*, A. Środa, G. Pastuch-Gawołek, M. Skonieczna, R. Musioł
VI Ogólnopolska Konferencja Pomiędzy Naukami, 15.09.2017 Chorzów (Referat)
14. Glikokoniugaty pochodne 8-hydroksychinoliny – otrzymywanie i właściwości biologiczne
M. Krawczyk*, G. Pastuch-Gawołek
Dokonania Naukowe Doktorantów V edycja, 22.04.2017 Kraków (Poster)
15. Kationy 1-(*N*-acyloamino)- i 1-imidoalkilokarbeniowe: generowanie i reaktywność w wybranych reakcjach tworzenia wiązań C-C
J. Adamek*, A. Węgrzyk, **M. Krawczyk**, R. Mazurkiewicz
X Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, 21-24.06.2016 Bachotek (Poster)

Projekty badawcze:

- Główny wykonawca projektów statutowych Politechniki Śląskiej, realizowanych w ramach subwencji na utrzymanie i rozwój potencjału badawczego, przyznanych przez MNiSW:
 - Grant BKM nr 04/020/BKM17/0044 (BKM-534/RCH2/2017)
Synteza i wstępna ocena aktywności biologicznej glikokoniugatów pochodnych 8-hydroksychinoliny z wykorzystaniem reakcji cykloaddycji azydo-alkinowej
 - Grant BKM nr 04/020/BKM18/0074 (BKM-525/RCH2/2018)
Synteza pochodnych chinoliny zawierających w strukturze pierścień 1,2,3-triazolowy oraz wstępna ocena ich aktywności biologicznej
 - Grant BKM nr 04/020/BKM19/0095 (BKM-526/RCH2/2019)
Zastosowanie pochodnych 1-tiocukrów w syntezie glikokoniugatów chinolinowych o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych
 - Grant BKM nr 04/020/BKM20/0138 (BKM-611/RCH2/2020)
Badania wpływu modyfikacji strukturalnych glikokoniugatów chinolinowych na ich aktywność cytotoksyczną
- Główny wykonawca prac naukowo-badawczych realizowanych w latach 2017-2022 na Politechnice Śląskiej, zleczanych przez Zakład Badawczo-Produkcyjny SYNTEX Sp. z o.o., dotyczących syntezy pochodnych D-glukozy i metotreksatu lub auranofiny.

Wyróżnienia i nagrody:

- Zwiększenie stypendium doktoranckiego z dotacji projakościowej w latach akademickich 2017/2018 oraz 2020/2021.
- Rektorski grant projakościowy II stopnia za wysoko punktowane publikacje lub udzielone patenty przyznany w 2021 roku oraz zwiększenie kwoty grantu w kolejnym roku.
- Rektorski grant projakościowy za publikację wydaną w czasopiśmie z listy TOP10 przyznany w 2021 roku.
- Rektorski grant projakościowy przyznany w 2021 roku za publikację wydaną we współpracy z autorem reprezentującym zagraniczny ośrodek naukowy.
- Zespołowa nagroda Rektora Politechniki Śląskiej stopnia III za osiągnięcia naukowe przyznana w 2021 roku.
- Wyróżnienie za najlepszy poster na konferencji Dokonania Naukowe Doktorantów V edycja, 22.04.2017 Kraków, *Glikokoniugaty pochodne 8-hydroksychinoliny – otrzymanie i właściwości biologiczne*.
- Złote medale na Międzynarodowej Wystawie Wynalazków w Warszawie (IWIS 2018) oraz Norymberdze (iENA 2018), za projekt *Glikokoniugatowa pochodna metotreksatu i glukozy (P.426731)*.

Warsztaty i Szkolenia:

- *Wprowadzenie do zasad Dobrej Praktyki Laboratoryjnej* mgr inż. Anna Rakowska – Specjalistka ds. Systemów Jakości w firmie EcoMelius Institute Sp. z o.o.
- Szkolenie w zakresie *Zarządzania projektami badawczymi* organizowane przez Politechnikę Śląską.

Działalność popularyzatorska i dydaktyczna:

- Współprowadzenie warsztatów popularnonaukowych dla dzieci i młodzieży w ramach trzech kolejnych edycji *Nocy Naukowców Politechniki Śląskiej* w latach 2017, 2018 i 2019.
- Opiekun pomocniczy 7 prac badawczych realizowanych w ramach Studenckiego Koła Naukowego Chemików przy Politechnice Śląskiej oraz 15 prac magisterskich studentów z kierunku Chemia lub Biotechnologia Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej.
- Opracowanie nowych stanowisk oraz instrukcji laboratoryjnych w ramach prowadzonych zajęć dydaktycznych.
- Prowadzenie zajęć dydaktycznych z przedmiotów: Chemia związków naturalnych, Chemia bioorganiczna z elementami glikobiologii, Metodyka prowadzenia badań biologicznych, Podstawy biotechnologii, Analiza instrumentalna w bioanalityce.

OŚWIADCZENIA
WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI
O WKŁADZIE AUTORSKIM

Synthesis of 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates and Preliminary Assay of Their β 1,4-GalT Inhibitory and Anti-Cancer Properties

Monika Krawczyk*, Gabriela Pastuch-Gawolek, Anna Mrozek-Wilczkiewicz, Michał Kuczak, Magdalena Skonieczna, Robert Musioł

Bioorganic Chemistry (2019), 84, 326-338

OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE AUTORSKIM

Monika Domińska (Krawczyk)

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; opracowanie procedur i przeprowadzenie syntez chemicznych pochodnych cukrowych, pochodnych chinoliny i glikokoniugatów oraz oczyszczenie otrzymanych związków; wykonanie oraz analiza widm NMR w celu potwierdzenia struktur otrzymanych związków; oznaczenie parametrów fizykochemicznych otrzymanych związków (skręcalność właściwa, temperatura topnienia); przeprowadzenie hodowli komórkowej oraz wykonanie testów cytotoksyczności MTT; opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu publikacji; korespondencja z redakcją czasopisma.



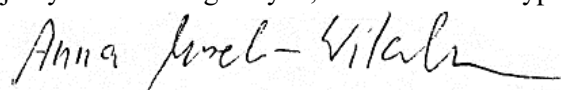
Gabriela Pastuch-Gawolek

Opracowanie koncepcji i planu badań; konsultacje przy doborze metodyki badań, prowadzeniu syntez chemicznych oraz interpretacji wyników; częściowe wykonanie i pomoc w interpretacji widm NMR otrzymanych związków; przeprowadzenie badań hamowania aktywności β -1,4-galaktozylotransferazy; korekta manuskryptu.



Anna Mrozek-Wilczkiewicz

Przeprowadzenie testów cytotoksyczności MTS; przygotowanie opisu w manuskrypcie dotyczącego badań cytotoksyczności; konsultacje przy interpretacji wyników biologicznych; korekta manuskryptu.



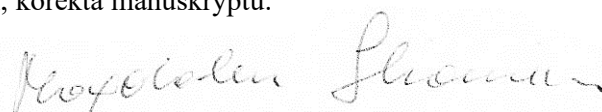
Michał Kuczak

Przeprowadzenie testów cytotoksyczności MTS; przygotowanie opisu w manuskrypcie dotyczącego badań cytotoksyczności; korekta manuskryptu.



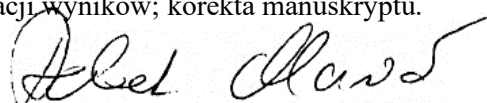
Magdalena Skonieczna

Konsultacje przy prowadzeniu hodowli komórkowej oraz wykonaniu testów cytotoksyczności MTT; konsultacje przy interpretacji wyników biologicznych; korekta manuskryptu.



Robert Musioł

Opracowanie koncepcji wykorzystania pochodnych chinoliny jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych; konsultacje przy interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates: Modifications in the Linker Structure and Their Effect on the Cytotoxicity of the Obtained Compounds

Monika Krawczyk*, Gabriela Pastuch-Gawołek, Aleksandra Pluta, Karol Erfurt, Adrian Domański, Piotr Kurcok

Molecules (2019), 24, 4181

OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE AUTORSKIM

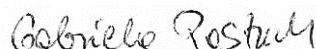
Monika Domańska (Krawczyk)

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; opracowanie procedur i przeprowadzenie syntez chemicznych pochodnych cukrowych, pochodnych chinoliny i glikokoniugatów oraz oczyszczenie otrzymanych związków; wykonanie oraz analiza widm NMR w celu potwierdzenia struktur otrzymanych związków; oznaczenie parametrów fizykochemicznych otrzymanych związków (skręcalność właściwa, temperatura topnienia); przeprowadzenie hodowli komórkowej oraz wykonanie testów cytotoksyczności MTT; opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu publikacji; korespondencja z redakcją czasopisma.



Gabriela Pastuch-Gawołek

Opracowanie koncepcji i planu badań; konsultacje przy doborze metodyki badań, prowadzeniu syntez chemicznych oraz interpretacji wyników; częściowe wykonanie i pomoc w interpretacji widm NMR otrzymanych związków; przeprowadzenie badań hamowania aktywności β -1,4-galaktozylotransferazy; korekta manuskryptu.




Aleksandra Pluta

Przeprowadzenie pod kierunkiem Gabrieli Pastuch-Gawołek i Moniki Domańskiej syntez chemicznych części związków, ich oczyszczenie oraz charakterystyka w ramach realizacji pracy magisterskiej.



Karol Erfurt

Wykonanie analiz HRMS związków.



Adrian Domański

Przeprowadzenie badań kompleksowania metali przez glikokoniugaty z wykorzystaniem techniki UV-VIS i ESI-MS; przygotowanie opisu w manuskrypcie dotyczącego badań kompleksowania; korekta manuskryptu.



Piotr Kurcok

Konsultacje przy interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates Containing Sulfur at the Sugar Anomeric Position — Synthesis and Preliminary Evaluation of Their Cytotoxicity

Monika Krawczyk*, Gabriela Pastuch-Gawołek, Agnieszka Hadasik, Karol Erfurt

Molecules (2020), 25, 4174

OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE AUTORSKIM

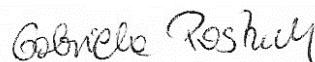
Monika Domińska (Krawczyk)

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; opracowanie procedur i przeprowadzenie syntez chemicznych pochodnych cukrowych, pochodnych chinoliny i glikokoniugatów oraz oczyszczenie otrzymanych związków; wykonanie oraz analiza widm NMR w celu potwierdzenia struktur otrzymanych związków; oznaczenie parametrów fizykochemicznych otrzymanych związków (skręcalność właściwa, temperatura topnienia); przeprowadzenie hodowli komórkowej oraz wykonanie testów cytotoksyczności MTT; opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu publikacji; korespondencja z redakcją czasopisma.



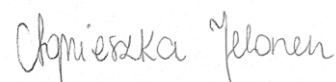
Gabriela Pastuch-Gawołek

Opracowanie koncepcji i planu badań; konsultacje przy doborze metodyki badań, prowadzeniu syntez chemicznych oraz interpretacji wyników; częściowe wykonanie i pomoc w interpretacji widm NMR otrzymanych związków; korekta manuskryptu.



Agnieszka Hadasik

Przeprowadzenie pod kierunkiem Gabrieli Pastuch-Gawołek i Moniki Domińskiej syntez chemicznych części związków, ich oczyszczenie oraz charakterystyka w ramach realizacji pracy magisterskiej.



Karol Erfurt

Wykonanie analiz HRMS związków.



Glycoconjugation of Quinoline Derivatives Using the C-6 Position in Sugars as a Strategy for Improving the Selectivity and Cytotoxicity of Functionalized Compounds

Monika Domińska*, Gabriela Pastuch-Gawolek, Magdalena Skonieczna, Wiesław Szeja,
Adrian Domiński, Piotr Kurcok

Molecules (2022), 27, 6918

OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE AUTORSKIM

Monika Domińska

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; opracowanie procedur i przeprowadzenie syntez chemicznych pochodnych cukrowych, pochodnych chinoliny i glikokoniugatów oraz oczyszczenie otrzymanych związków; wykonanie oraz analiza widm NMR w celu potwierdzenia struktur otrzymanych związków; oznaczenie parametrów fizykochemicznych otrzymanych związków (skręcalność właściwa, temperatura topnienia); przeprowadzenie hodowli komórkowej oraz wykonanie testów cytotoksyczności; przygotowanie materiału do analiz cytometrycznych; opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu publikacji; korespondencja z redakcją czasopisma.



Gabriela Pastuch-Gawolek

Opracowanie koncepcji i planu badań; konsultacje przy doborze metodyki badań, prowadzeniu syntez chemicznych oraz interpretacji wyników; częściowe wykonanie i pomoc w interpretacji widm NMR otrzymanych związków; korekta manuskryptu.



Magdalena Skonieczna

Wykonanie analiz cytometrycznych; konsultacje przy interpretacji wyników biologicznych; korekta manuskryptu.



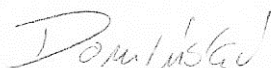
Wiesław Szeja

Konsultacje przy interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



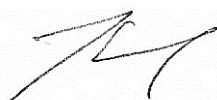
Adrian Domiński

Przeprowadzenie badań interkalacji DNA przez glikokoniugaty z wykorzystaniem techniki UV-Vis oraz przygotowanie opisu w manuskrypcie; korekta manuskryptu.



Piotr Kurcok

Konsultacje przy interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



Synthesis and Preliminary Evaluation of the Cytotoxicity of Potential Metabolites of Quinoline Glycoconjugates

Monika Domińska*, Gabriela Pastuch-Gawolek*, Adrian Domiński, Piotr Kurcok, Karol Erfurt

Molecules (2022), 27, 1040

OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE AUTORSKIM

Monika Domińska

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; opracowanie procedur i przeprowadzenie syntez chemicznych pochodnych cukrowych, pochodnych chinoliny i glikokoniugatów oraz oczyszczenie otrzymanych związków; wykonanie oraz analiza widm NMR w celu potwierdzenia struktur otrzymanych związków; oznaczenie parametrów fizykochemicznych otrzymanych związków (skręcalność właściwa, temperatura topnienia); przeprowadzenie hodowli komórkowej oraz wykonanie testów cytotoxyczości MTT; opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu publikacji; korespondencja z redakcją czasopisma.



Gabriela Pastuch-Gawolek

Opracowanie koncepcji i planu badań; konsultacje przy doborze metodyki badań, prowadzeniu syntez chemicznych oraz interpretacji wyników; częściowe wykonanie i pomoc w interpretacji widm NMR otrzymanych związków; korekta manuskryptu.



Adrian Domiński

Przygotowanie i charakterystyka nośników polimerowych; przygotowanie opisu w manuskrypcie dotyczącego syntezy i charakterystyki micel; korekta manuskryptu.



Piotr Kurcok

Konsultacje dotyczące przygotowania nośników polimerowych; korekta manuskryptu.



Karol Erfurt

Wykonanie analiz HRMS związków.



Biodegradable pH-Responsive Micelles Loaded With 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates for Warburg Effect Based Tumor Targeting

Adrian Domiński, Monika Krawczyk, Tomasz Konieczny, Maciej Kasprów, Aleksander Foryś, Gabriela Pastuch-Gawolek, Piotr Kurcok*

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (2020), 154, 317–329

OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE AUTORSKIM

Monika Domińska (Krawczyk)

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań biologicznych; przeprowadzenie syntez chemicznych glikokoniugatów; przeprowadzenie hodowli komórkowej oraz wykonanie testów cytotoksyczności MTT; opracowanie i interpretacja wyników testów cytotoksyczności; przygotowanie opisów w manuskrypcie dotyczących metodyki oraz analizy testów cytotoksyczności; korekta manuskryptu.



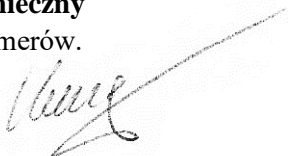
Adrian Domiński

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; synteza polimerów; przygotowanie i charakterystyka nośników polimerowych; opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu publikacji.



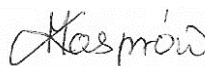
Tomasz Konieczny

Synteza polimerów.



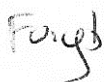
Maciej Kasprów

Przeprowadzenie badań stabilności nośników polimerowych.



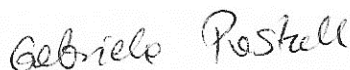
Aleksander Foryś

Wykonanie analiz cryo-TEM.



Gabriela Pastuch-Gawolek

Konsultacje przy interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



Piotr Kurcok

Opracowanie koncepcji i planu badań; konsultacje przy doborze metodyki badań, prowadzeniu syntez polimerów i nośników polimerowych oraz interpretacji wyników; korekta manuskryptu; korespondencja z redakcją czasopisma.



Shell-Sheddable Micelles Based on Poly(ethylene glycol)-hydrazono-poly[R,S]-3-hydroxybutyrate Copolymer Loaded with 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates as a Dual Tumor-Targeting Drug Delivery System

Adrian Domański*, Monika Domańska, Magdalena Skonieczna, Gabriela Pastuch-Gawolek, Piotr Kurcok*

Pharmaceutics (2022), 14, 290

OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE AUTORSKIM

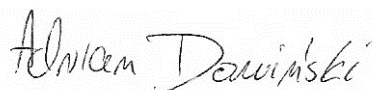
Monika Domańska

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań biologicznych; przeprowadzenie syntez chemicznych glikokoniugatów; przeprowadzenie hodowli komórkowej oraz wykonanie testów cytotoksyczności MTT; przygotowanie materiału do analiz cytometrycznych; opracowanie i interpretacja wyników badań biologicznych; przygotowanie opisów w manuskrypcie dotyczących metodyki oraz analizy badań biologicznych; korekta manuskryptu.



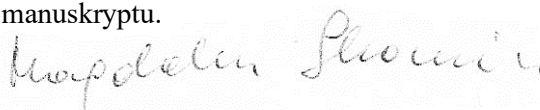
Adrian Domański

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; synteza polimerów; przygotowanie i charakterystyka nośników polimerowych; opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu publikacji; korespondencja z redakcją czasopisma.



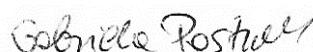
Magdalena Skonieczna

Wykonanie analiz cytometrycznych oraz obrazowania mikroskopowego komórek; konsultacje przy interpretacji wyników biologicznych; korekta manuskryptu.



Gabriela Pastuch-Gawolek

Konsultacje przy interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



Piotr Kurcok

Opracowanie koncepcji i planu badań; konsultacje przy doborze metodyki badań, prowadzeniu syntez polimerów i nośników polimerowych oraz interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



Overcoming Hypoxia-Induced Chemoresistance in Cancer Using a Novel Glycoconjugate of Methotrexate

Marta Woźniak, Gabriela Pastuch-Gawolek, Sebastian Makuch, Jerzy Wiśniewski, Piotr Ziółkowski, Wiesław Szeja, Monika Krawczyk*, Siddarth Agrawal*

Pharmaceuticals (2021), 14, 13

OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE AUTORSKIM

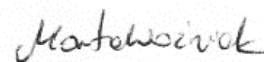
Monika Domińska (Krawczyk)

Dobór metodyki badań; opracowanie procedur i przeprowadzenie syntez chemicznych; oczyszczenie otrzymanych związków; wykonanie oraz analiza widm NMR w celu potwierdzenia struktur otrzymanych związków; oznaczenie parametrów fizykochemicznych otrzymanych związków (skręcalność właściwa, temperatura topnienia); udział w opracowaniu i interpretacji wyników; przygotowanie części chemicznej manuskryptu publikacji; korekta manuskryptu.



Marta Woźniak

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; przeprowadzenie badań biologicznych; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; przygotowanie manuskryptu publikacji; korekta manuskryptu; korespondencja z redakcją czasopisma.



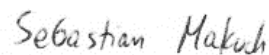
Gabriela Pastuch-Gawolek

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



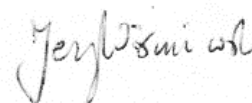
Sebastian Makuch

Dobór metodyki badań; przeprowadzenie badań biologicznych; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



Jerzy Wiśniewski

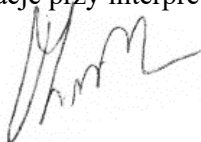
Dobór metodyki badań; przeprowadzenie analiz LC/MS oraz przygotowanie opisu w manuskrypcie; korekta manuskryptu.



OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE AUTORSKIM CD.

Piotr Ziółkowski

Konsultacje przy interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



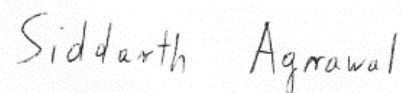
Wiesław Szeja

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; konsultacje przy prowadzeniu syntez chemicznych; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



Siddarth Agrawal

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; przygotowanie manuskryptu publikacji.



The Effect of a New Glucose–Methotrexate Conjugate on Acute Lymphoblastic Leukemia and Non-Hodgkin’s Lymphoma Cell Lines

Marta Woźniak, Sebastian Makuch, Gabriela Pastuch-Gawolek, Jerzy Wiśniewski, Wiesław Szeja, Martyna Nowak, Monika Krawczyk*, Siddarth Agrawal*

Molecules (2021), 26, 2547

OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE AUTORSKIM

Monika Domińska (Krawczyk)

Dobór metodyki badań; opracowanie procedur i przeprowadzenie syntez chemicznych; oczyszczenie otrzymanych związków; wykonanie oraz analiza widm NMR w celu potwierdzenia struktur otrzymanych związków; oznaczenie parametrów fizykochemicznych otrzymanych związków (skręcalność właściwa, temperatura topnienia); udział w opracowaniu i interpretacji wyników; przygotowanie części chemicznej manuskryptu publikacji; korekta manuskryptu.

Monika Domińska

Marta Woźniak

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; przeprowadzenie badań biologicznych; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; przygotowanie manuskryptu publikacji; korekta manuskryptu.

Marta Woźniak

Sebastian Makuch

Dobór metodyki badań; przeprowadzenie badań biologicznych; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; korekta manuskryptu.

Sebastian Makuch

Gabriela Pastuch-Gawolek

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; korekta manuskryptu.

Gabriela Pastuch

Jerzy Wiśniewski


Dobór metodyki badań; przeprowadzenie analiz LC/MS oraz przygotowanie opisu w manuskrypcie; korekta manuskryptu.

Jerzy Wiśniewski

OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE AUTORSKIM CD.

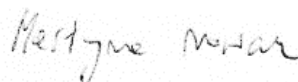
Wiesław Szeja

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; konsultacje przy prowadzeniu syntez chemicznych; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



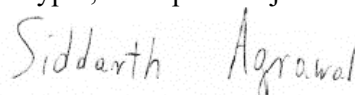
Martyna Nowak

Przeprowadzenie badań biologicznych; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



Siddarth Agrawal

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; przygotowanie manuskryptu publikacji; korekta manuskryptu; korespondencja z redakcją czasopisma.



In Vitro and In Vivo Efficacy of a Novel Glucose–Methotrexate Conjugate in Targeted Cancer Treatment

Marta Woźniak, Gabriela Pastuch-Gawolek, Sebastian Makuch, Jerzy Wiśniewski, Tibor Krenács,
Peter Hamar, Andrzej Gamian, Wiesław Szeja, Danuta Szkudlarek, Monika Krawczyk*,
Siddarth Agrawal*

International Journal of Molecular Sciences (2021), 22, 1748

OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE AUTORSKIM


Monika Domińska (Krawczyk)

Dobór metodyki badań; opracowanie procedur i przeprowadzenie syntez chemicznych; oczyszczenie otrzymanych związków; wykonanie oraz analiza widm NMR w celu potwierdzenia struktur otrzymanych związków; oznaczenie parametrów fizykochemicznych otrzymanych związków (skręcalność właściwa, temperatura topnienia); udział w opracowaniu i interpretacji wyników; przygotowanie części chemicznej manuskryptu publikacji; korekta manuskryptu.



Marta Woźniak

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; przeprowadzenie badań biologicznych *in vitro*; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; przygotowanie manuskryptu publikacji; korekta manuskryptu; korespondencja z redakcją czasopisma.




Gabriela Pastuch-Gawolek

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



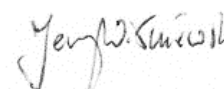
Sebastian Makuch

Dobór metodyki badań; przeprowadzenie badań biologicznych *in vitro*; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



Jerzy Wiśniewski

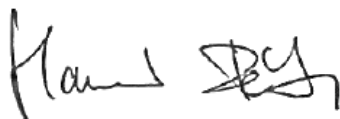
Dobór metodyki badań; przeprowadzenie analiz LC/MS oraz przygotowanie opisu w manuskrypcie; korekta manuskryptu.



OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE AUTORSKIM CD.

Tibor Krenács

Dobór metodyki badań; przeprowadzenie badań biologicznych *in vivo* oraz przygotowanie opisu w manuskrypcie; konsultacje przy interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



Peter Hamar

Dobór metodyki badań; przeprowadzenie badań biologicznych *in vivo* oraz przygotowanie opisu w manuskrypcie; konsultacje przy interpretacji wyników; korekta manuskryptu.

Andrzej Gamian

Konsultacje przy interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



Wiesław Szeja

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; konsultacje przy prowadzeniu syntez chemicznych; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; korekta manuskryptu.



Danuta Szkudlarek

Konsultacje przy interpretacji wyników histologicznych.



Siddarth Agrawal

Opracowanie koncepcji i planu badań; dobór metodyki badań; udział w opracowaniu i interpretacji wyników; przygotowanie manuskryptu publikacji; korekta manuskryptu.

