



**Politechnika
Śląska**

**WYDZIAŁ CHEMICZNY
KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ,
BIOORGANICZNEJ I BIOTECHNOLOGII**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Mgr inż. Mateusz Dawid Tomczyk

Promotor: Prof. dr hab. inż. Krzysztof Walczak

Przewodnik po monotematycznym cyklu publikacji pt.

**Synteza i właściwości biologiczne modyfikowanych
interkalatorów i makrocycli**

Gliwice 2023

*Kieruję serdeczne podziękowania w stronę mojego Promotora
Pana Prof. dr hab. inż. Krzysztofa Walczaka
za opiekę podczas trwania studiów doktoranckich,
oraz za wszelką pomoc w trakcie mojej pracy naukowej.*

*Chciałbym również podziękować wszystkim, z którymi
współpracowałem podczas realizacji prac badawczych.*

*W szczególności dziękuję
Panu Prof. Nikodemowi Kuźnikowi,
Panu Prof. Jesperowi Wengłowi,
Pani Prof. Agnieszce Olejniczak,
Pani Prof. Magdalenie Łabieniec-Watale,
Pani Dr. Karolinie Matczak,
oraz mojemu serdecznemu koledze, Dr inż. Pawłowi Chulkinowi.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH MONOTEMATYCZNY CYKL.....	4
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ.....	6
1. CEL I ZAKRES BADAŃ	8
2. WPROWADZENIE DO TEMATYKI BADAWCZEJ.....	11
2.1. Oddziaływania związków chemicznych z kwasami nukleinowymi	11
2.2. Wpływ modyfikacji nukleotydów na hybrydyzację DNA.....	14
2.3. Interkalatory jako związki biologicznie aktywne	17
2.4. Makrocykle jako związki biologicznie aktywne.....	20
2.5. Koniugacja jako strategia modyfikacji właściwości związków	23
2.6. Koncepcja <i>click chemistry</i> jako dogodna strategia koniugacji	26
3. OMÓWIENIE WYNIKÓW	28
3.1. Synteza pochodnych bezwodnika 1,8-naftalowego	28
3.1.1. Synteza ω -hydroksyloalkilo-1,8-naftalimidów	28
3.1.2. Synteza 1,8-naftalimidów jako komponentów do <i>click chemistry</i>	30
3.2. Synteza pochodnych 2-hydroksy-tioksantonu	32
3.3. Synteza makrocycli i ich pochodnych.....	32
3.4. Synteza koniugatów interkalator-makrocycli.....	34
3.5. Modyfikacje kwasów nukleinowych w pozycji 2'	35
3.6. Ocena oddziaływania koniugatów z DNA	38
3.7. Ocena aktywności biologicznej otrzymanych związków	42
3.7.1. Aktywność biologiczna ω -hydroksyloalkilo-1,8-naftalimidów	42
3.7.2. Aktywność biologiczna koniugatów interkalator-makrocycli	44
4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	51
5. LITERATURA.....	53
STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	62
ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS	63

WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH MONOTEMATYCZNY CYKL

Niniejszą rozprawę doktorską stanowi monotematyczny cykl sześciu prac naukowych, opublikowanych w czasopismach z listy JCR (Journal Citation Reports):

- P.1** Gondela, A.; **Tomczyk, M. D.**; Przypis, Ł.; Walczak, K. Z*. Versatile synthesis of 2'-amino-2'-deoxyuridine derivatives with a 2'-amino group carrying linkers possessing a reactive terminal functionality. *Tetrahedron* **2016**, 72 (36), 5626–5632.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.07.061>.
IF₂₀₁₆ = 2.651, 70 pkt MEiN
- P.2** **Tomczyk, M. D.**; Byczek-Wyrostek, A.; Strama, K.; Wawszków, M.; Kasprzycki, P.; Walczak, Z. K*. Anticancer activity and topoisomerase II inhibition of naphthalimides with ω -hydroxylalkylamine side-chains of different lengths. *Medicinal Chemistry* **2019**, 15 (5), 550–560.
<https://doi.org/10.2174/1573406414666180912105851>.
IF₂₀₁₉ = 3.470, 70 pkt MEiN
- P.3** **Tomczyk, M. D.**; Zalewski, M.; Jørgensen, P. T.; Wengel, J.; Walczak, K.* Polyamino–oligonucleotide conjugates: 2'-OMe-triazole-linked 1,4,7,10-tetraazacyclododecane and intercalating dyes and their effect on the thermal stability of DNA duplexes. *Pharmaceutics* **2022**, 14 (1), 66.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010066>.
IF₂₀₂₀ = 6.321, 100 pkt MEiN
- P.4** **Tomczyk, M. D.***; Matczak, K.; Skonieczna, M.; Chulkin, P.; Denel-Bobrowska, M.; Różycka, D.; Rykowski, S.; Olejniczak, A. B.; Walczak, K.; Synthesis and *in vitro* cytotoxic activity of dye-linker-macrocycle conjugates with variable linker length and components. *Bioorganic Chemistry* **2023**, 106782,
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106782>.
IF₂₀₂₃ = 5.307, 140 pkt MEiN
- P.5** **Tomczyk, M. D.**; Walczak, K. Z. 1,8-Naphthalimide based DNA intercalators and anticancer agents. A systematic review from 2007 to 2017. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 159, 393–422.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.055>.
IF₂₀₁₈ = 4.833, 140 pkt MEiN

P.6 Tomczyk, M. D.*; Kuźnik, N.*; Walczak, K. Cyclen-based artificial nucleases: Three decades of development (1989–2022). Part a – hydrolysis of phosphate esters. *Coordination Chemistry Reviews* **2023**, *481*, 215047.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215047>.
IF₂₀₂₃ = 24.833, 200 pkt MEiN

Sumaryczny Impact Factor powyższych prac wynosi 47,415.

Sumaryczna liczba punktów MEiN tych prac wynosi 720.

Treść publikacji **P.1–P.6** znajduje się w załączniku do niniejszej rozprawy doktorskiej. Wersje elektroniczne publikacji wraz z opublikowanymi z nimi materiałami uzupełniającymi są dostępne na dołączonej płycie CD.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

1A12C4	1-Aza-12-korona-4
B/D	Brak danych
BARAC	Biarylazacyklooktynon
Boc	Funkcjonalna grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
CD	Dichroizm kołowy, <i>ang.</i> circular dichroism
Clog P	Obliczony log P
Cyklen	1,4,7,10-Tetraazacyklododekan
CT-DNA	DNA z grasicy cielęcej, <i>ang.</i> calf-thymus DNA
CuAAC	Cykloaddycja azydków i alkinów katalizowana jonami miedzi(I)
DIBO	Dibenzylcyklooktyn
DIFO	Difluorooktyn
Ds	7-(2-Tienyl)imidazo[4,5-b]pirydyna, <i>ang.</i> 7-(2-thienyl)imidazo[4,5-b]pyridine
DSB	Dwuniciowe pęknięcie DNA, <i>ang.</i> double-strand break
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DMF	Dimetyloformamid
DMSO	Dimetylosulfotlenek
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy
Elog P	Eksperymentalnie wyznaczony log P
Ekw.	Ekwiwalent
EtBr	Bromek etydyny
IE-HPLC	Jonowymienna wysokosprawna chromatografia cieczowa, <i>ang.</i> ion exchange-high performance liquid chromatography
Log P	Współczynnik podziału (P) będący stosunkiem stężeń substancji w warstwie wodnej i warstwie n-okatanolu w stanie równowagi

NBS	<i>N</i> -Bromosukcynoimid
n/n	Stosunek molowy
ON	Oligonukleotyd
P	2-Aminoimidazo[1,2- <i>a</i>]-1,3,5-triazin-4(8 <i>H</i>)on, <i>ang.</i> 2-amino-imidazo[1,2- <i>a</i>]-1,3,5-triazin-4(8 <i>H</i>)one
PAT	Transporter poliamin, <i>ang.</i> polyamine transporter
Px	2-Nitro-4-propynylopirol, <i>ang.</i> 2-nitro-4-propynylpyrrole
RGD	Sekwencja peptydowa składająca się z aminokwasów argininy, glicyny i kwasu asparaginowego (Arg-Gly-Asp)
RNA	Kwas rybonukleinowy
ROS	Reaktywne formy tlenu, <i>ang.</i> reactive oxygen species
RP-HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa z odwróconym układem faz, <i>ang.</i> reverse phase-high performance liquid chromatograph
SSB	Jednoniciowe pęknięcie DNA, <i>ang.</i> single-strand break
TBTA	Tris((1-benzylo-4-triazolilo)metylo)amina
TEAA	Octan trietyloamoniowy, <i>ang.</i> triethylammonium acetate
TFA	Kwas trifluorooctowy
TFAEt	Trifluorooctan etylu
THPTA	Tris-hydroksypropylotriazolilometyloamina
Topo II	Topoizomeraza II
T.p.	Temperatura pokojowa
T.w.	Temperatura wrzenia
v/v	Stosunek objętościowy
Z	6-Amino-5-nitro-2(1 <i>H</i>)-pirydynon, <i>ang.</i> 6-amino-5-nitro-2(1 <i>H</i>)-pyridone

1. CEL I ZAKRES BADAŃ

Kwasy nukleinowe są jedną z głównych klas związków naturalnych, które odgrywają kluczową rolę w biologii i medycynie. Dwoma najważniejszymi typami kwasów nukleinowych są kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) i kwas rybonukleinowy (RNA). Obie te makrocząsteczki są zbudowane z sekwencji nukleotydów, które składają się z cukru (2-deoksy-D-rybofuranosa lub D-rybofuranosa), zasady azotowej (adeniny, cytozyny, guaniny, tyminy lub urydyny) oraz reszty kwasu fosforowego.

W komórkach eukariotycznych DNA jest zlokalizowane w jądrze komórkowym i stanowi nośnik informacji genetycznej, która jest kluczowa dla dziedziczenia i funkcjonowania organizmów. DNA przenosi informację genetyczną na mRNA, który stanowi matrycę w syntezie białek – podstawowego budulca wszystkich komórek w żywych organizmach. W trakcie syntezy mRNA tworzy się hybryda zawierająca nić DNA i mRNA. Dzięki właściwościom hybrydyzacyjnym, czyli zdolności do tworzenia stabilnych wiązań wodorowych pomiędzy zasadami w sekwencjach DNA i/lub RNA, kwasy nukleinowe stanowią obiekt badań naukowych w biologii i medycynie, zwłaszcza w dziedzinie diagnostyki molekularnej i terapii genowej. Ważny obszar badań stanowi również modyfikacja genetyczna mikroorganizmów zmierzająca do nadekspresji metabolitów użytecznych w biotechnologii i przemyśle.

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych umożliwia identyfikację specyficznych sekwencji DNA lub RNA. Na przykład, w diagnostyce molekularnej, można użyć sond molekularnych oznaczonych fluorescencyjnie, które hybrydują z docelową sekwencją w próbce, umożliwiając wykrycie obecności lub braku konkretnej sekwencji genetycznej. Ta metoda jest powszechnie stosowana w testach na obecność wirusów, bakterii lub mutacji genetycznych.

W terapii genowej, kwasów nukleinowych, a właściwie sekwencji oligonukleotydów, można użyć do wprowadzenia lub modyfikacji określonych genów w organizmie pacjenta. Przeniesienie zdrowego genu do uszkodzonych komórek może prowadzić do naprawy genetycznej i leczenia chorób genetycznych. W przypadku terapii genowej, hybrydyzacja może być wykorzystywana do dostarczania sekwencji terapeutycznych do komórek pacjenta.

Ponadto, kwasy nukleinowe wykorzystuje się w badaniach nad nowymi lekami. Hybrydyzacja może być używana do oceny specyficzności leków, analizy interakcji leków z kwasami nukleinowymi oraz identyfikacji nowych celów terapeutycznych. Umożliwia to lepsze zrozumienie mechanizmu działania leków na poziomie molekularnym i pomaga opracować bardziej precyzyjne terapie.

Wymienione zastosowania kwasów nukleinowych można osiągnąć i/lub ulepszyć na co najmniej dwa sposoby:

1. W celu ulepszenia właściwości kwasów nukleinowych i ich zastosowań, można wprowadzać kowalencyjne modyfikacje do struktury nukleotydów. To oznacza modyfikację pierścienia purynowego lub pirymidynowego, pierścienia cukrowego lub grupy fosforanowej za pomocą małowcząsteczkowych związków organicznych. Takie modyfikacje mogą wpływać na stabilność, hybrydyzację, odporność na degradację enzymatyczną, a także specyficzne interakcje z białkami lub innymi biocząsteczkami. Ta strategia może prowadzić do lepszych sond molekularnych, lepszych substratów do sekwencjonowania DNA, stabilniejszych cząsteczek terapeutycznych i bardziej efektywnych narzędzi diagnostycznych.
2. Alternatywnie, małowcząsteczkowe związki organiczne mogą być wykorzystane jako leki, które oddziałują bezpośrednio z cząsteczkami DNA lub RNA. Są to substancje, które wykazują selektywność wobec konkretnych sekwencji lub struktur kwasów nukleinowych. Mogą one wpływać na replikację, transkrypcję, translację lub inne procesy zależne od DNA i RNA. Poprzez projektowanie i syntezę takich leków, można skuteczniej regulować procesy biologiczne związane z genetyką, leczyć choroby genetyczne, hamować rozwój nowotworów, wpływać na procesy immunologiczne i wiele innych.

Opierając się na gruntownym przeglądzie literatury dotyczącej małowcząsteczkowych związków organicznych stosowanych do modyfikacji właściwości hybrydyzacyjnych DNA jako główne cele niniejszej rozprawy doktorskiej przyjąłem zsyntezowanie modyfikowanych interkalatorów i makrocycyli oraz ocenę ich przydatności do zmiany właściwości hybrydyzacyjnych DNA i potencjalnego zastosowania w terapii przeciwnowotworowej.

Otrzymane w ramach prac badawczych związki można podzielić na następujące kategorie, w zależności od rodzaju wprowadzonych modyfikacji:

1. Koniugaty małowcząsteczkowych związków organicznych i oligonukleotydów modyfikowanych w pozycji 2', opisane w pracach **P.1** i **P.3**,
2. Pochodne bezwodnika 1,8-naftalowego obejmujące funkcjonalizację do 1,8-naftalimidów i substytucję w obrębie pierścienia naftalenowego w celu określenia wpływu modyfikacji na właściwości biologiczne i wykorzystania do koniugacji z innymi blokami budulcowymi, opisane w pracach **P.2** i **P.4**,

3. Pochodne 2-hydroksy-tioksantonu obejmujące wprowadzenie łącznie-
ków alkilowych w celu koniugacji z innymi blokami budulcowymi, opi-
sane w pracach **P.3** i **P.4**,
4. Pochodne 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu (cyklenu) obejmujące etapy
zabezpieczenia i wprowadzenia grup funkcyjnych w celu koniugacji z
innymi blokami budulcowymi, opisane w pracach **P.3** i **P.4**,
5. Pochodne 1-aza-12-korony-4 (1A12C4) obejmujące funkcjonalizację
grupy aminowej w celu koniugacji z innymi blokami budulcowymi, opi-
sane w pracy **P.4**,
6. Koniugatów interkalatorów i makrocykli w celu zbadania wpływu na od-
działywanie z DNA i właściwości biologiczne otrzymanych połączeń,
opisane w pracy **P.4**.

Podczas wykonywania prac badawczych w ramach niniejszej rozprawy można wyróżnić następujące zasadnicze etapy:

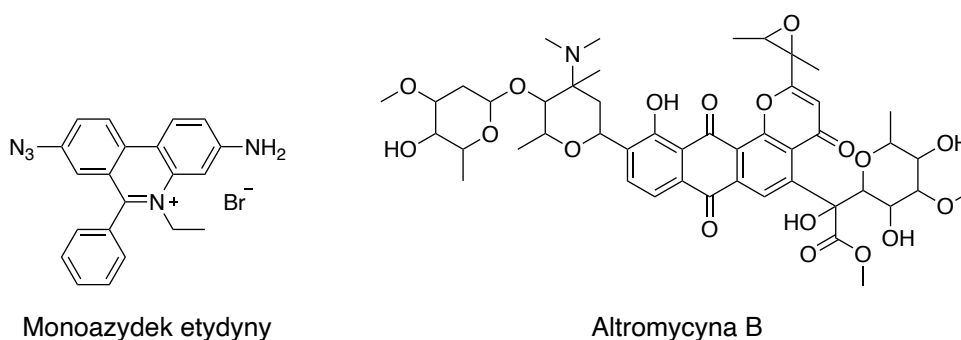
1. Syntezę bloków budulcowych – pochodnych bezwodnika 1,8-naftalo-
wego, tioksantonu, cyklenu i 1-aza-12-korony-4,
2. Wprowadzenie modyfikacji w pierścieniu cukrowym nukleotydów lub
wykorzystanie komercyjnie dostępnych nukleotydów modyfikowanych
w pozycji 2' w celu koniugacji z wybranymi blokami budulcowymi,
3. Koniugację wybranych bloków budulcowych w wybranych kombinacjach
w celu uzyskania połączeń typu interkalator-makrocykl,
4. Izolację otrzymanych związków za pomocą standardowej chromatogra-
fii żelowej lub preparatywnego HPLC,
5. Oznaczenie struktury i czystości otrzymanych związków za pomocą me-
tod spektroskopowych (NMR i MS) oraz oznaczenie ich wybranych wła-
ściwości fizykochemicznych,
6. Ocenę interakcji otrzymanych związków z DNA i/lub ich wpływu na wła-
ściwości hybrydazyjnej DNA,
7. Ocenę aktywności biologicznej wybranych związków mającą na celu
określenie ich przydatności w terapiach przeciwnowotworowych i przy-
bliżenie możliwego mechanizmu ich działania.

2. WPROWADZENIE DO TEMATYKI BADAWCZEJ

2.1. Oddziaływania związków chemicznych z kwasami nukleinowymi

Małocząsteczkowe związki organiczne mogą oddziaływać z DNA na różne sposoby, wpływając na jego strukturę, funkcję i stabilność. Oto kilka najważniejszych rodzajów oddziaływań małocząsteczkowych związków z DNA:

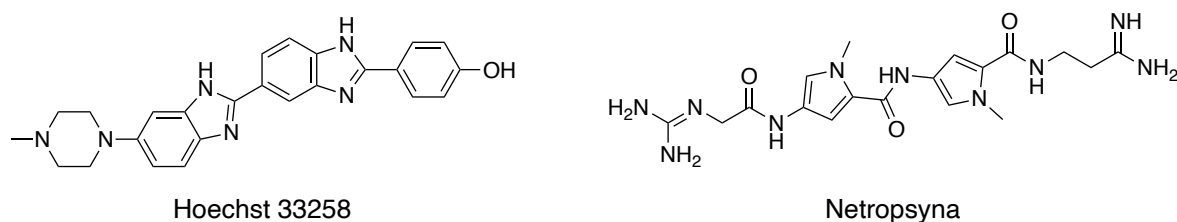
1. Tworzenie adduktów: Związki organiczne mogą tworzyć kowalencyjne addukty z DNA poprzez reakcję z jego zasadami azotowymi. Te addukty mogą wpływać na strukturę i funkcję DNA, a także prowadzić do powstania uszkodzeń w DNA. Do tej grupy związków należą m. in. altromycyna B, której mechanizm działania polega na alkilowaniu guaniny poprzedzonym interkalacją do DNA [1, 2], oraz monoazydek etydyny – analog bromku etydyny, który oddziałuje z DNA podobnie jak bromek etydyny, ale po fotolizie jego grupa azydkowa zostaje aktywowana do wysoce reaktywnego nitrenu i prowadzi do powstania wiązania kowalencyjnego z DNA (**Rys. 1**) [3].



Rys. 1. Struktury chemiczne wybranych związków tworzących z DNA wiązania kowalencyjne.

2. Oddziaływania elektrostatyczne: Niektóre związki organiczne posiadają ładunki elektryczne, które mogą oddziaływać ze zjonizowanymi ujemnie grupami fosforanowymi DNA. Dodatkowo naładowane związki organiczne mogą wiązać się z ujemnie naładowanymi fosforanami w niciach DNA, przykładem takich związków mogą być poliaminy, które w środowisku *in vivo* są całkowicie sprotonowane, przez co posiadają dodatkowo naładowane grupy amoniowe. Dzięki swojej liniowej i giętkiej strukturze, poliaminy, np. spermina, oddziałują z ujemnie naładowanym rdzeniem fosfocukrowym, „owijają” się wokół niego i częściowo neutralizują jego ładunek.
3. Wiązania wodorowe: Przykładem innych związków, które oddziałują z DNA bez wytwarzania wiązań kowalencyjnych są tzw. ligandy rowka

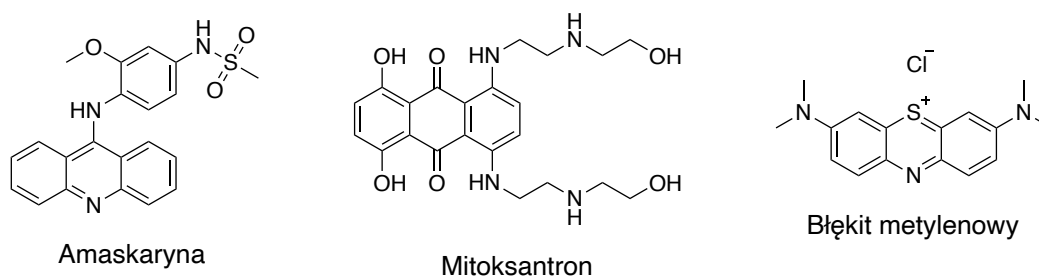
małego (*ang.* minor groove binders). Wiązanie w dużym rowku jest zjawiskiem rzadkim, ponieważ wymaga cząsteczek o większej objętości, które dostatecznie wypełniają i tworzą odpowiednio silne oddziaływania z dużym rowkiem. Wiązanie związków organicznych w małym rowku DNA wynika z tworzenia wiązań wodorowych między cząsteczką liganda a grupami akceptorowymi wiązań wodorowych na dnie i ścianach rowka. Na dnie rowka, akceptorami wiązań wodorowych są zazwyczaj atomy N3 puryny i O2 pirymidyny, a na ścianach, zwykle atomy O4' w 2'-deoksy-D-rybofuranozie [4]. Charakterystyczną cechą budowy tych związków jest pewien stopień krzywizny, który zapewnia izohelikalność z mniejszym rowkiem DNA. Ten efekt jest osiągnięty poprzez obecność kilku pojedynczych lub rzadziej podwójnych pierścieni, głównie aromatycznych, oddzielonych krótkim łącznikiem. Przykładami takich związków są popularny barwniki cytochemiczny, Hoechst 33258 oraz netropsyna (**Rys. 2**) – naturalny antybiotyk oligopeptydowy charakteryzujący się aktywnością przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą, przeciwwirusową i cytotatyczną.



Rys. 2. Struktury chemiczne wybranych związków lokalizujących się w małym rowku DNA.

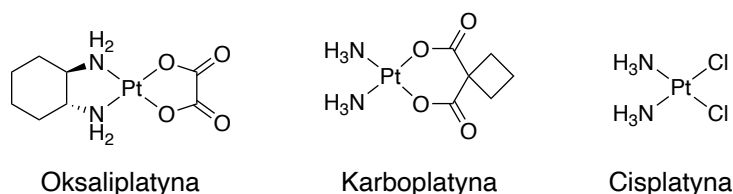
4. Interkalacja: Niektóre związki organiczne posiadają płaskie, aromatyczne pierścienie mogące wnikać pomiędzy zasady azotowe DNA. To zjawisko jest nazywane interkalacją. Interkalatory zaburzają topologię helisy DNA, wpływają na jej stabilność, a także zakłócają procesy replikacji i transkrypcji. Kompleks interkalacyjny jest stabilizowany poprzez oddziaływanie orbitali π chromoforu i zasad azotowych w DNA, co z języka angielskiego jest nazywane oddziaływaniem typu " π - π stacking". Dodatkowo, stabilizację zapewniają również oddziaływania hydrofobowe i przeniesienie ładunku. Związki interkalujące są ligandami, które zasadniczo nie wykazują specyficzności wobec zasad azotowych, ale preferują sekwencje, w których występuje przewaga niektórych par zasad. Na przykład, bromek etydyny wykazuje większe powinowactwo do par GC [5]. Specyficzną odmianą tej grupy związków są bisinterkalatory, nazywane też interkalatorami bifunkcyjnymi, zbudowane z dwóch

cząstek interkalujących połączonych za sobą łącznikiem, najczęściej giętym łańcuchem alkilowym. Do najważniejszych przykładów interkalatorów można zaliczyć wspomniany wcześniej bromek etydyny, amaskarynę – pochodną aminoakrydyny stosowaną w leczeniu ostrej białaczki i chłoniaków złośliwych [6], mitoksantron – syntetyczny antybiotyk antracyklinowy o silnych właściwościach przeciwnowotworowych [7], czy błękit metylenowy – popularny barwnik i fotouczulacz wykorzystywany w badaniach nad terapią fotodynamiczną (**Rys. 3**) [8].



Rys. 3. Struktury chemiczne wybranych interkalatorów DNA.

5. Wiązania koordynacyjne: Niektóre związki organiczne, zwłaszcza te zawierające jony metali, mają zdolność do tworzenia wiązań koordynacyjnych z DNA. Atom metalu skoordynowany w związku organicznym może wiązać się z zasadami DNA, tworząc stabilne kompleksy metalo-DNA [9]. Przykładami takich związków są oksaliplatyna i karboplatyna – leki przeciwnowotworowe będące pochodnymi cisplatyny (**Rys. 4**) [10,11]. Podstawowym mechanizmem działania kompleksów platyny jest tworzenie krzyżowych wiązań pomiędzy dwoma atomami N7 w guaninach zarówno w obrębie tej samej cząsteczki DNA jak i pomiędzy różnymi cząsteczkami DNA [12]. Powstanie nieprawidłowych wiązań zaburza strukturę DNA, przyczynia się do powstawania pęknięć DNA oraz zakłóca syntezę DNA i RNA co uniemożliwia podział komórki i ostatecznie prowadzi do jej śmierci.



Rys. 4. Wybrane kompleksy Pt(II) tworzące wiązania koordynacyjne z DNA.

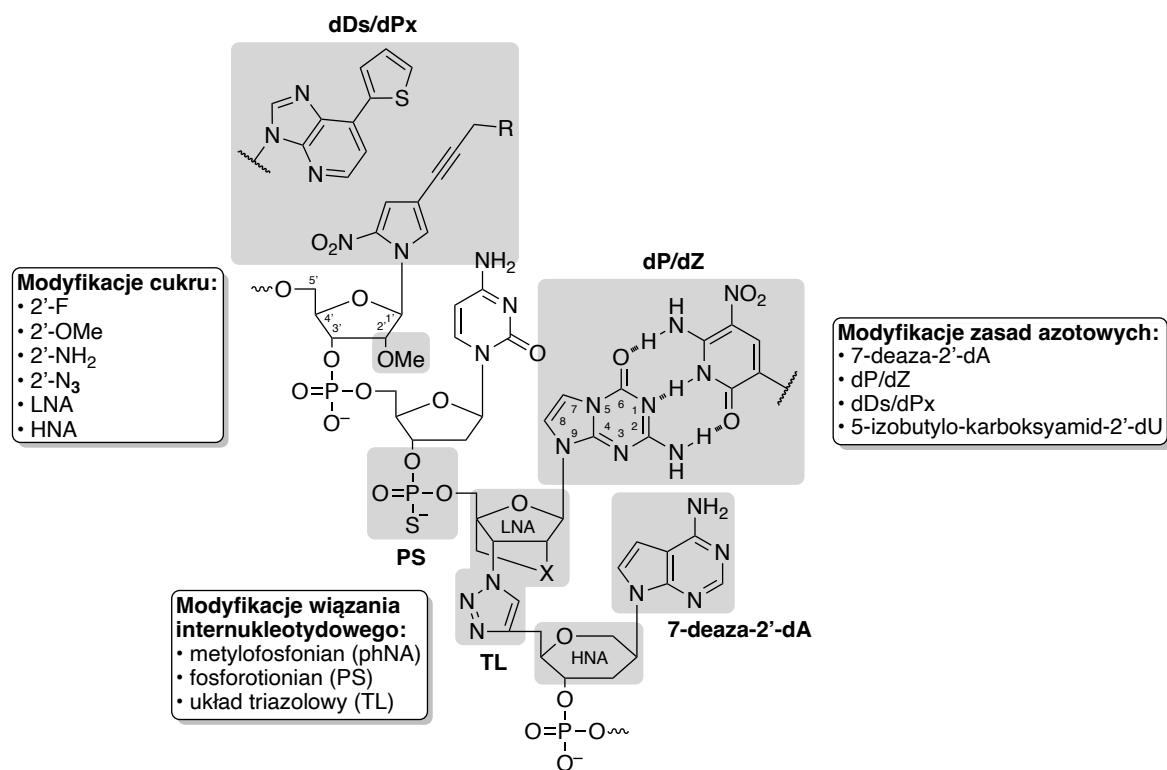
2.1. Wpływ modyfikacji nukleotydów na hybryzację DNA

Najwcześniejsze terapeutyczne zastosowanie krótkich fragmentów DNA (oligonukleotydów) opierało się na zjawisku komplementarnego parowania zasad, co umożliwiało regulację przetwarzania (translacji) mRNA i związanych z tym procesów tworzenia białka, które mają znaczenie dla postępu choroby. W ten sposób narodziła się terapia antysensowana, polegająca na wyciszaniu ekspresji genów powodujących choroby za pomocą krótkich fragmentów kwasów nukleinowych. Pierwsze próby stosowania oligonukleotydów antysensownych, znanych jako ASO (*ang.* antisense oligonucleotides), na żywych komórkach datuje się na rok 1978 [13].

Niemniej jednak, poza swoimi chronionymi organellami komórkowymi, DNA, a szczególnie RNA, są podatne na rozkład chemiczny katalizowany przez enzymy nazywane nukleazami. W rezultacie, naturalne (tzn. niemodyfikowane) oligonukleotydy praktycznie nie nadają się do zastosowania klinicznego. Historycznie właśnie te dwa czynniki skłoniły badaczy do modyfikacji kwasów nukleinowych w celu zwiększenia ich odporności na rozkład przez nukleazy oraz wydłużenia czasu obecności wstrzykniętych ASO w organizmie pacjenta. W tym celu badacze skoncentrowali się głównie na minimalnych, ale skutecznych, modyfikacjach chemicznych na końcach 3' i 5' sekwencji, gdzie wiele nukleaz rozpoczyna katalityczną hydrolizę oligonukleotydów. Ponadto zabezpieczenie tych pozycji za pomocą większych makromolekuł, takich jak glikol polietylenowy na 5' końcu, ogranicza usuwanie ASO przez nerki [14–16].

Na **Rys. 5** przedstawiono schemat ilustrujący wybrane modyfikacje chemiczne struktury DNA z wyróżnieniem modyfikacji w trzech podstawowych składnikach DNA – pierścieniach cukrowych, zasadach azotowych i w wiązaniach fosfodiesterowych. Wybrane modyfikacje obejmują proste substytucje w określonych miejscach nukleotydów, jak również bardziej zasadnicze zamiany molekularne, które mało przypominają naturalną strukturę DNA. Przykłady modyfikacji składnika cukrowego obejmują najczęściej modyfikacje w pozycji 2' polegającą na wprowadzeniu dodatkowych atomów lub grup funkcyjnych [17–19], wprowadzenie dodatkowych grup powodujących „usztynienie/blokowanie konformacyjne” pierścienia cukrowego – na przykład mostek metylenowy łączący atomy 2' tlenu z 4' węgla w zablokowanych kwasach nukleinowych, tzw. LNA (*ang.* locked nucleic acid) [20], oraz całkowite zastąpienie pierścienia D-rybofuranozowego innym układem – na przykład heksitolowy kwas nukleinowy, tzw. HNA (*ang.* hexitol nucleic acids) [21]. Inne modyfikacje obejmują substytucje atomów w grupie fosforanowej [22], lub całkowite zastąpienie wiązania fosfodiesterowego [23]. Miejsca modyfikacji w strukturach heterocyklicznych obejmują zarówno zasady pirymidynowe [24], jak i purynowe [25]. Istnieje również możliwość całkowitej substytucji nukleozasad nienaturalnymi zasadami azotowymi, które mogą tworzyć zmodyfikowane, ale komplementarne wiązania wodorowe, np. dP/dZ, lub

mogą nie wykazywać takiej zdolności, np. dDs/dPx [26, 27]. W **Tabeli 1** zestawilem wpływ wymienionych modyfikacji na właściwości fizykochemiczne i biologiczne DNA.

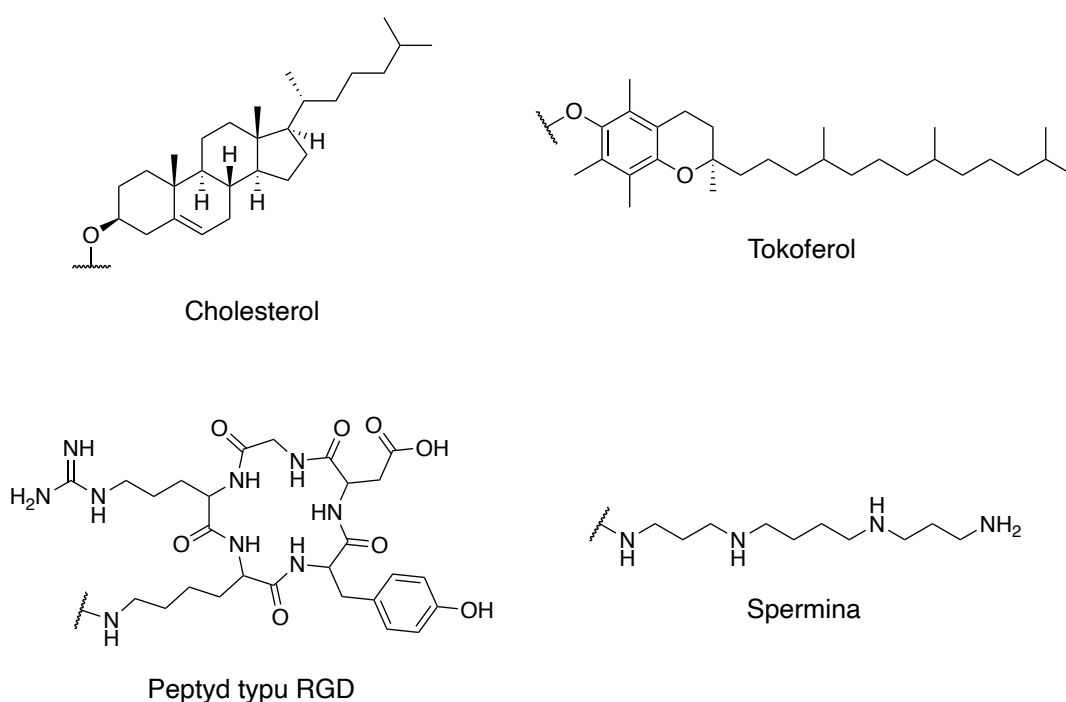


Rys. 5. Przykładowe rodzaje modyfikacji DNA w obrębie pierścienia cukrowego, zasad azotowych i wiązania fosfodiesterowego.

Tabela 1. Zestawienie wybranych modyfikacji DNA wraz z ich wpływem na właściwości fizykochemiczne i biologiczne otrzymanych dupleksów.

Fragment DNA	Modyfikacja	Odporność na nukleazy	Zgodność z polimerazami	Stabilność dupleksu	Parowanie zasad	Lit.
Cukier	2'-F	Wzrost	Zgodność	Wzrost	Zachowane	[28]
	2'-OMe	Wzrost	Zgodność	Wzrost	Zachowane	[28]
	2'-NH ₂	Wzrost	Zgodność	Spadek	Zachowane	[28]
	LNA	Wzrost	Zgodność	Wzrost	Zachowane	[29]
	HNA	Wzrost	Zgodność	Wzrost	Zachowane	[21]
Wiązanie fosfodiesterowe	TL	Wzrost	Brak	Spadek	B/D	[30]
	PS	Wzrost	Zgodność	Spadek	B/D	[31]
	phNA	Wzrost	Zgodność	Spadek	B/D	[32]
Zasady azotowe	7'-deaza-2'-dA	Wzrost	Zgodność	Spadek	Brak	[33]
	dP/dZ	B/D	Zgodność	Wzrost	Zmienione	[27]
	dDs/dPx	B/D	Zgodność	Wzrost	Brak	[26]

Innym sposobem modyfikacji DNA w celu nadania mu nowych, unikalnych właściwości jest kowalencyjne przyłączenie małych cząsteczkowych związków organicznych, tzw. koniugacja, do cząsteczki DNA. Niewystarczające właściwości farmakokinetyczne oraz słabe wchłanianie komórkowe są głównymi przeszkodami w udanej terapeutycznej aplikacji oligonukleotydów. Kowalencyjne przyłączenie różnych ligandów, które mają wpływ na biodystrybucję, wchłanianie przez komórki lub są ukierunkowane na konkretne tkanki, stanowi atrakcyjną możliwość rozwoju terapii anty-sensowanej i poszerzenia zakresu działania oligonukleotydów. W przeciwieństwie do zaawansowanych technik formułacyjnych, które często wymagają zastosowania wielu związków chemicznych i są wrażliwe na zmiany w warunkach przygotowania i przechowywania, koniugaty oligonukleotydów są dobrze zdefiniowanymi cząsteczkami, co umożliwia zastosowanie prostszych technik kontroli jakości i nadaje im większą trwałość. Wśród ligandów zaprojektowanych głównie w celu zwiększenia wchłaniania do komórek znajdują się związki lipofilowe, takie jak cholesterol, tokoferol i peptydy przenikające do komórek, takie jak cykliczne peptydy typu RGD, oraz liniowe poliaminy, takie jak spermina (**Rys. 6**) [34, 35].



Rys. 6. Wzory strukturalne przykładowych ligandów stosowanych do koniugacji z oligonukleotydami w celu poprawienia ich biodostępności i właściwości farmakokinetycznych.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej przeprowadziłem badania dotyczące kowalencyjnej modyfikacji DNA w pozycji 2' za pomocą dwóch rodzajów małych cząsteczkowych ligandów organicznych - interkalujących barwników o właściwościach fluorescencyjnych i fotodynamicznych, oraz makrocyklicznych poliamin i polieterów.

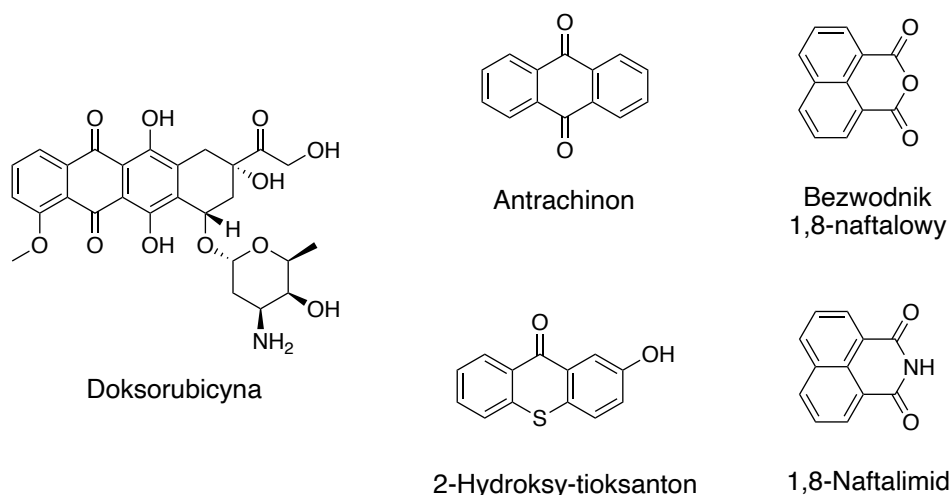
Oligonukleotydy z kowalencyjnie przyłączonymi barwnikami fluorescencyjnymi i fotosensytyzatorami mogą być wykorzystane jako sondy molekularne do identyfikacji i lokalizacji konkretnych sekwencji DNA lub RNA zarówno *in vitro*, jak i w żywych komórkach [36]. Natomiast przyłączanie grup kationowych, takich jak liniowe poliaminy, do oligonukleotydów ma na celu zwiększenie powinowactwa wiązania oligonukleotydów antysensownych poprzez redukcję odpychania ładunków między dwoma negatywnie naładowanymi nićmi dupleksu oraz zwiększenie ich stabilności *in vivo* w obecności nukleaz [37].

2.3. Interkalatory jako związki biologicznie aktywne

Po raz pierwszy koncepcję interkalacji zaproponował w 1961 r. Leonard S. Lerman z Massachusetts Institute of Technology [38]. Podczas badań nad oddziaływaniem akrydyny z CT-DNA, Lerman zauważył, że dodanie akrydyny powoduje zwiększenie długości DNA. Wyjaśnił to specyficznym sposobem wiązania akrydyny, polegającym na wsuwaniu się płaskiego, heterocyklicznego i aromatycznego układu między pary zasad w podwójnej helisie DNA. Już wtedy zauważył on związek między płaską strukturą policyklicznych, aromatycznych węglowodorów, ich zdolnością do wiązania się z DNA a silnymi właściwościami mutagennymi jakie posiadały te związki.

Dzisiaj wiemy, że interkalacja prowadzi do deformacji struktury DNA oraz zakłócenia procesów replikacji, transkrypcji i naprawy DNA. Chociaż interkalacja nie powoduje naruszenia pierwszo- i drugorzędowej struktury DNA, to dochodzi do zmiany trzeciorzędowej struktury DNA w wyniku rozciągania fragmentu DNA spowodowanego wsunięciem się ligandu. W rezultacie cząsteczka DNA ulega częściowemu wydłużeniu i zmniejszeniu kąta skręcenia podwójnej helisy DNA [39]. Interkalatory to głównie związki poliaromatyczne o płaskiej strukturze, charakteryzujące się grubością w zakresie od 2 do 3,7 Å oraz powierzchnią nie mniejszą niż 28 Å². Są one złożone z trzech lub czterech pierścieni tworzących chromofor, do którego mogą być przyłączone różnorodne grupy funkcyjne. Stabilność kompleksu interkalacyjnego wynika z nakładania się orbitali π chromoforu oraz zasad azotowych (oddziaływania typu π - π stacking), a także z obecności wiązań hydrofobowych i wiązań z przeniesieniem ładunku [40].

Interkalatory stanowią popularną grupę leków przeciwnowotworowych, a jednym z najbardziej znanych przedstawicieli jest doksorubicyna (**Rys. 7**) – antybiotyk antracyklinowy uzyskany z hodowli *Streptomyces peuceticus var. caesius*. Cząsteczka tego leku wbudowuje się w strukturę DNA i powoduje jego rozerwanie oraz fragmentację. Prowadzi to do zahamowania replikacji DNA oraz uniemożliwia transkrypcję



Rys. 7. Wzory strukturalne przykładowych interkalatorów i struktur wiodących wykorzystanych w ramach badań do rozprawy doktorskiej.

DNA na RNA i w konsekwencji hamuje syntezę białek. Efektem działania doksorubicyny jest zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych i indukowanie ich śmierci [41, 42].

Antybiotyki antracyklinowe stanowią pochodne antrachinonu (**Rys. 7**) – trójpierścieniowego związku, charakteryzującego się intensywnie żółtą barwą, który znajduje zastosowanie w produkcji wielu barwników. Istnieje wyraźny związek pomiędzy budową barwników poliaromatycznych a ich zdolnością do interkalacji – podobnie jak antybiotyki antracyklinowe, barwniki poliaromatyczne składają się ze skondensowanych pierścieni aromatycznych, takich jak benzen, naftalen, antracen, piren albo perylen. Ich struktura jest planarna lub przynajmniej częściowo planarna, co ułatwia interakcje π - π z zasadami azotowymi DNA. Ponadto, barwniki interkalujące mogą posiadać specyficzne grupy funkcyjne, które mogą zwiększać ich powinowactwo do DNA. Na przykład grupy aminowe lub grupy karbonylowe mogą tworzyć wiązania wodorowe lub oddziaływania elektrostatyczne z zasadami azotowymi DNA, co może prowadzić do zwiększenia stabilności kompleksu interkalacyjnego.

Barwniki interkalujące charakteryzują się rozbudowanym układem sprzężonych elektronów π . Ułatwia to wzbudzenie elektronów $\pi \rightarrow \pi^*$ i sprzyja promienistemu rozpraszaniu energii w procesie powrotu wzbudzonych elektronów $\pi^* \rightarrow \pi$. Kiedy te związki są poddane działaniu światła o odpowiedniej energii, to w wyniku absorpcji promieniowania ich cząsteczki ulegają wzbudzeniu do wyższego stanu elektronowego. Wówczas ich elektrony ulegają przejściu $\pi \rightarrow \pi^*$, czyli od stanu podstawowego (S_0) o niższej energii do wzbudzonego stanu singletowego (S_1) o wyższej energii. Wydajność kwantowa dla barwników interkalujących wzrasta wraz ze wzrostem liczby pierścieni w chromoforze i stopniem ich kondensacji [43]. Wsuniecie się barwnika pomiędzy pary zasad w DNA powoduje zmianę jego otoczenia chemicznego, co

może skutkować nawet 10-krotnym wzrostem intensywności fluorescencji [44, 45]. Ta właściwość barwników interkalujących pozwala na wykrycie i wizualizację sekwencji DNA, co znalazło swoje zastosowanie w produkcji sond molekularnych opartych o modyfikowane oligonukleotydy.

Opisane właściwości fizykochemiczne sprawiają, że interkalatory mają szerokie zastosowanie jako małowcząsteczkowe leki przeciwnowotworowe oraz barwniki stosowane w medycynie i biologii. Jednak ich rola nie ogranicza się jedynie do tego, ponieważ mogą pełnić funkcję bloków budulcowych do tworzenia sond molekularnych poprzez kowalencyjne przyłączanie ich do cząsteczki oligonukleotydu. Przyłączenie interkalatorów do oligonukleotydu może istotnie wpływać na jego właściwości hybrydazyjne, takie jak selektywność w rozpoznawaniu określonych sekwencji DNA, a także stabilność tworzonych dupleksów i tripleksów. Miarami tej stabilności są temperatura topnienia (T_m) oraz entalpia wiązania. Badanie wpływu interkalatorów na hybrydazję oligonukleotydu ma zasadnicze znaczenie dla zrozumienia i kontroli procesów molekularnych związanych z rozpoznawaniem sekwencji DNA. Wykorzystanie interkalatorów jako sond molekularnych otwiera drogę do projektowania bardziej precyzyjnych narzędzi diagnostycznych oraz terapeutycznych, które mogą być wykorzystywane w medycynie spersonalizowanej.

W swoich badaniach skoncentrowałem się na dwóch grupach interkalatorów: pochodnych bezwodnika 1,8-naftalowego oraz pochodnych 2-hydroksy-tioksantonu (**Rys. 7**). Przeprowadziłem modyfikacje rdzenia naftalenowego polegające na wprowadzeniu różnych podstawników w pozycje 3 i 4. Dokonałem także licznych zmian podstawników na atomie azotu układu imidowego. Głównym celem tych modyfikacji było uzyskanie bloków budulcowych do dalszej koniugacji z oligonukleotydami, co zostało opisane w pracach **P.1**, **P.3** i **P.4**, oraz z makrocyklami, co zostało opisane w pracy **P.4**. W pracy **P.1** i **P.3** wykorzystałem 1,8-naftalimidy do kowalencyjnej modyfikacji nukleozydów w pozycji 2' pierścienia cukrowego w celu zmiany ich właściwości hybrydazyjnych. Natomiast w pracy **P.4** połączyłem 1,8-naftalimidy z makrocyklami w celu modyfikacji ich właściwości biologicznych. W pracy **P.2** opisałem syntezę pochodnych 1,8-naftalimidu modyfikowanych w różnych pozycjach pierścienia naftalenowego, a także analizowałem wpływ tych modyfikacji na cytotoksyczność i inhibicję topoizomerazy II. Szczegółowy opis właściwości interkalacyjnych, przeciwnowotworowych, przeciwbakteryjnych i przeciwwirusowych interkalatorów 1,8-naftalimidowych został przedstawiony w mojej pracy przeglądowej **P.5**.

Pochodne tioksantonu wykorzystałem do przeprowadzenia kowalencyjnej modyfikacji oligonukleotydów (**P.3**) oraz do uzyskania koniugatów z makrocyklami (**P.4**). Wybór układu tioksantonowego wynikał z jego odmiennych właściwości fizykochemicznych w porównaniu do układu 1,8-naftalimidowego. Obie grupy związków są

znane ze swoich właściwości interkalacyjnych, jednak, w przeciwieństwie do 1,8-naf-talimidów, które przeważnie można uznać za związki fotostabilne, pochodne tioksan-tonu charakteryzują się wysoką fotoaktywnością, polegającą na generowaniu reak-tywnych form tlenu po wzbudzeniu światłem o odpowiedniej energii. Dzięki tym wła-ściwościom, pochodne tioksan-tonu mogą znaleźć zastosowanie w badaniach nad te-rapią fotodynamiczną.

2.4. Makrocykle jako związki biologicznie aktywne

Makrocykle, czyli organiczne związki cykliczne o dużych pierścieniach, stano-wią interesującą grupę związków, które wykazują zróżnicowane właściwości che-miczne i biologiczne. W niniejszym rozdziale skoncentrowałem się na trzech ważnych klasach makrocykli: eterach koronowych, cyklicznych poliaminach oraz makrocy-klach zawierających zarówno atomy azotu, jak i tlenu.

Etery koronowe to grupa makrocyklicznych związków syntetycznych, które za-wierają powtarzające się jednostki etylenowe połączone atomami tlenu. Ich nazwa "koronowe" pochodzi od charakterystycznego kształtu konformacji, który przypo-mina koronę. Etery koronowe są znane ze swojej zdolności do kompleksowania jonów metali, zwłaszcza kationów ziem alkalicznych. Ta unikalna zdolność kompleksowania metali sprawia, że etery koronowe są stosowane w wielu dziedzinach, takich jak che-mia supramolekularna, chemia koordynacyjna i chemia bioorganiczna. Ponadto, etery koronowe wykazują także pewne właściwości biologiczne, takie jak działanie antybakteryjne i przeciwwirusowe, dzięki czemu znajdują zastosowanie w badaniach farmaceutycznych i biomedycznych.

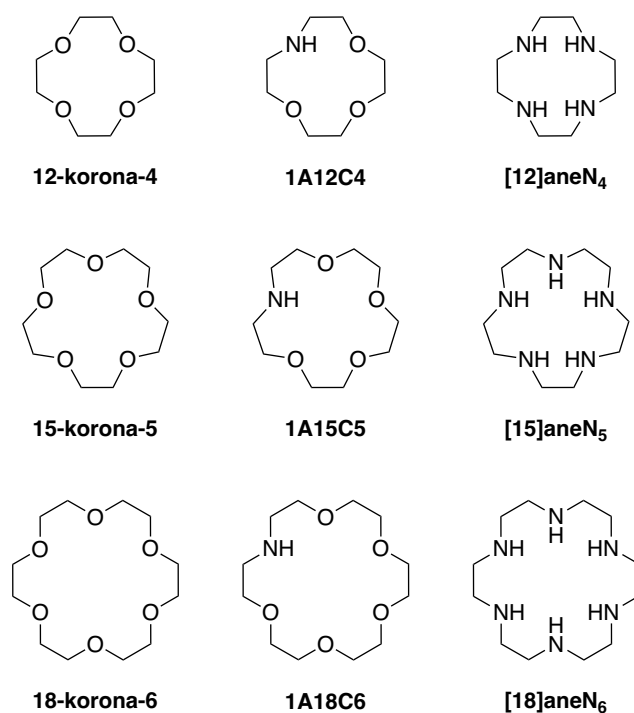
Strukturalnymi analogami eterów koronowych, w których atomy tlenu zostały zastąpione atomami azotu, są cykliczne poliaminy, znane również jako azamakrocy-kle. Ze względu na swoją strukturę, cykliczne poliaminy wykazują silne powinowac-two do jonów metali, zwłaszcza metali przejściowych, lantanowców i aktynowców, z którymi tworzą bardzo stabilne kompleksy [46]. Wykorzystuje się je szeroko w katali-zie, chemii supramolekularnej oraz w chemii koordynacyjnej.

Trzecia grupa obejmuje makrocykle o mieszanych grupach donorowych, znane jako azakorony (*ang.* aza-crowns), których właściwości chemiczne i koordynacyjne są wynikiem kombinacji cech eterów koronowych i cyklicznych poliamin. Te właściwości zależą od rodzaju i położenia odpowiednich grup donorowych. **Tabela 2** przedstawia porównanie wybranych właściwości fizykochemicznych i biologicznych makrocykli zawierających od 4 do 6 grup donorowych. Struktury omawianych makrocykli są przedstawione na **Rys. 8**.

Tabela 2. Właściwości fizykochemiczne i biologiczne wybranych makrocykli.

Związek	Log K_s		Lipofilowość		LD ₅₀ (mg kg ⁻¹) ^c
	Na ⁺	K ⁺	Elog P	Clog P	
12-korona-4	1.70 ^a	1.74 ^a	0.92	0.59	2800
1A12C4				0.11	
[12]aneN ₄			-2.62 ^d	-0.85	
15-korona-5	3.24	3.42	0.33	0.47	2100
1A15C5	1.70 ^b			0.10	
[15]aneN ₅				-1.18	
18-korona-6	4.35 ^a	4.36 ^a	0.21	0.47	1590
1A18C6	2.69 ^b			0.10	
[18]aneN ₆				-1.18	<125

Elog P - eksperymentalny log P; Clog P – wartość log P obliczona za pomocą oprogramowania SwissADME [47]; (a) oznaczono w bezwodnym metanolu w 25 °C [48]; (b) oznaczono w bezwodnym metanolu w 25 °C [49]; (c) toksyczność po wchłonięciu drogą doustną, badana na szczurach [50]; (d) [51].



Rys. 8. Wzory strukturalne wybranych makrocykli.

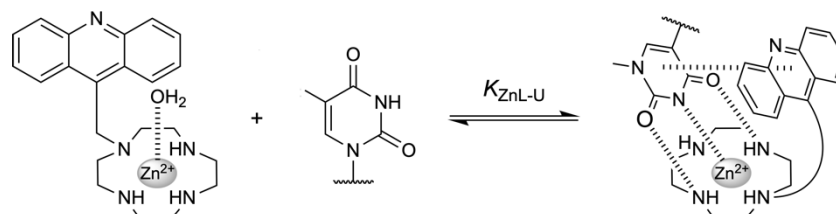
Wyjątkowa elastyczność struktury eterów koronowych umożliwia im przyjmowanie różnorodnych konformacji, od otwartych (podobnych do pierścienia) do zamkniętych (klatkowych), co pozwala im dostosować się do zmiennych warunków

środowiskowych poprzez skierowanie odpowiednich ugrupowań w stronę cząsteczek rozpuszczalnika [52]. W rezultacie większe etery koronowe charakteryzują się współczynnikiem podziału między oktanołem a wodą ($\log P$) zbliżonym do 0. Na przykład, 18-korona-8 ma wartość $\log P = 0,21$, a wartość $\log P$ wzrasta w miarę zmniejszania rozmiaru pierścienia (Tabela 2). Wartość $\log P$ jest ściśle związana z toksycznością (LD_{50}) eterów koronowych, która wzrasta, w miarę jak wartość $\log P$ zbliża się do 0, odzwierciedlając ich właściwości jonoforowe i zdolność do przenikania przez warstwę lipidową błony komórkowej. Jonofory to związki organiczne zdolne do transferu jonów przez fazę hydrofobową rozdzielającą dwie fazy wodne, czyli w układach biologicznych przede wszystkim przez błonę komórkową. Odkąd zostały odkryte, udowodniono, że wykazują one działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze, przeciwnowotworowe, przeciwmalaryczne oraz kokcydiostatyczne [53].

W przeciwieństwie do eterów koronowych, cykliczne poliaminy w środowisku *in vivo* występują w formie sprotonowanej. Ponadto, jak już wcześniej wspomniano, działają jako inhibitory PATs, co istotnie ogranicza ich zdolność do wchłaniania przez komórki. Z drugiej strony, ta grupa makrocycli tworzy bardzo stabilne kompleksy z odpowiednimi jonami metali, szczególnie z jonami metali przejściowych i lantanowców, które znajdują zastosowanie w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (MRI). Przykładem są kompleksy DOTA (1,4,7,10-tetraazacykloodekan-1,4,7,10-tetraoctaet) szeroko wykorzystywane w medycynie nuklearnej jako chelatory, czyli związki zdolne do wiązania i transportowania jonów metali, najczęściej gadolinu (^{68}Gd) i miedzi (^{64}Cu), które wykorzystuje się w obrazowaniu metodą MRI. [54, 55] Gadolin jest jodem paramagnetycznym, co oznacza, że wprowadzając go do organizmu, można uzyskać lepszą jakość obrazu w MRI. Kompleksy DOTA-Gd są stabilne, co pozwala na ich długotrwałe utrzymywanie się w krwiobiegu, co z kolei umożliwia uzyskanie wysokiej jakości obrazów tkanek i narządów.

Innym istotnym zastosowaniem cyklicznych poliamin jest ich wykorzystanie jako swoistych szkieletów dla sztucznych enzymów - małowcząsteczkowych kompleksów naśladujących działania hydrolaz, aminopeptydaz i innych enzymów, które w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle lub medycynie. Szczegółowy opis wykorzystania cyklenu w tej roli został przedstawiony w artykule przeglądowym **P.6**. Kolejnym ważnym zastosowaniem, z punktu widzenia niniejszej pracy doktorskiej, jest zdolność cyklicznych poliamin, w tym również cyklenu i jego kompleksu, Zn^{2+} -cyklen, do selektywnego rozpoznawania tymidyny w sekwencji DNA. Dzięki odpowiedniemu ułożeniu donorów i akceptorów wiązań wodorowych, Zn^{2+} -cyklen (jak również sam cyklen) tworzy silny kompleks z tyminą, co zostało przedstawione na **Rys. 9**. Tego rodzaju kompleks może znaleźć zastosowanie w modyfikacji oligonukleotydów w celu poprawy ich właściwości hybrydacyjnych i stabilności, a dodatkowo,

może być wykorzystany do nadania unikalnych funkcji modyfikowanemu oligonukleotydom, takich jak rozpoznawanie niekomplementarnej zasady (*ang.* mismatch) w sekwencji DNA.



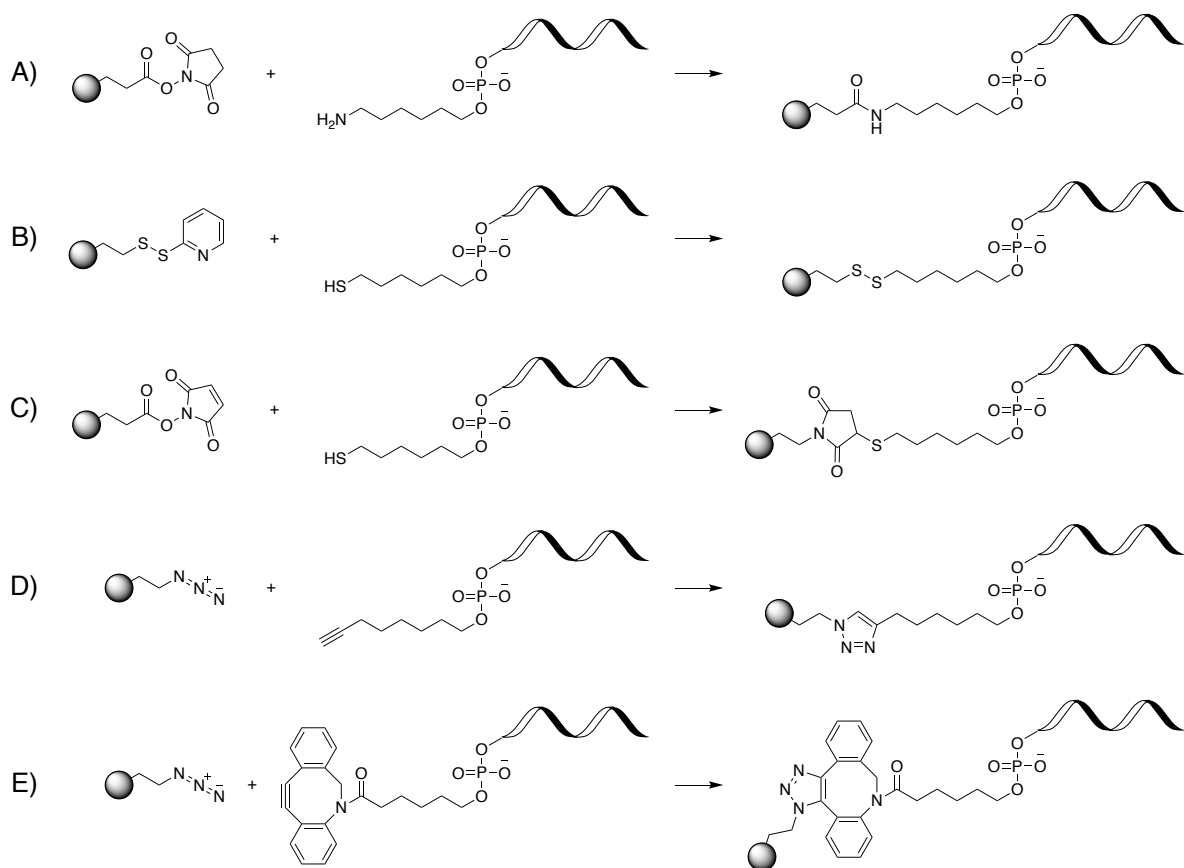
Rys. 9. Schemat rozpoznawania tymidyny (*dT*) przez Zn^{2+} -akrydynometylocyklen. Trójskładnikowy kompleks z tymidyną jest stabilizowany przez oddziaływanie jonowe między Zn^{2+} a zjonizowaną tymidyną (dT^-), wspomaganym przez dwa wiązania wodorowe pomiędzy grupami aminowym cyklu a karbonyłowymi tlenami *dT*, oraz przez interakcję π - π aromatycznych fragmentów obu cząsteczek [95, 96].

2.5. Koniugacja jako strategia modyfikacji właściwości związków

Koniugacja molekularna odnosi się do metod stosowanych w biochemii, medycynie, zaawansowanych materiałach i nanotechnologii do łączenia dwóch fragmentów – od małych cząsteczek organicznych do dużych i czasami funkcjonalnie złożonych biopolimerów. Idealne metody koniugacji mają szeroki zakres zastosowania strukturalnego, odbywają się w łagodnych warunkach (np. w środowisku wodnym), przebiegają szybko i z wysoką wydajnością, bez tworzenia produktów ubocznych, a ponadto są bioortogonalne i bezpieczne do stosowania w warunkach *in vivo*.

W przypadku koniugacji oligonukleotydów zostało opracowane wiele różnych metod łączenia [34]. Większość ligandów jest wprowadzana na końcach 3' i 5', które są technicznie najłatwiej dostępne, a następnie na grupach 2'-hydroksylowych i zasadach nukleotydowych. Wśród najważniejszych należy wymienić mostki dwusiarczkowe, wiązania amidowe oraz poprzez łącznik heterocykliczny (*ang.* linker), najłatwiej konstruowany metodą *click chemistry* (**Rys. 10**).

Wybór odpowiedniego łącznika jest niezwykle istotny dla właściwości biofizycznych i może mieć wpływ na farmakokinetykę koniugatu, a długość zastosowanego łącznika może być kluczowa dla skutecznego przyłączenia większych cząsteczek do oligonukleotydów. Dobór właściwego łącznika to zatem delikatna równowaga między unikaniem negatywnych efektów sterycznych w przypadku krótkich łączników, a nadmiernym wzrostem lipofilowości w przypadku dłuższych łączników, które szczególnie w przypadku łańcuchów alkilowych są słabo rozpuszczalne w środowisku wodnym i mają tendencję do zwiększania agregacji koniugatów. Oprócz roli w procesie



Rys. 10. Wybrane metody sprzężenia oligonukleotydów z małocząsteczkowymi ligandami organicznymi. (A) Sprzężenie amidowe za pomocą aktywowanego estru. (B) Wiązania dwusiarczkowe z ligandem aktywowanym pirydynotiolem. (C) Sprzężenie tiolowo-maleimidowe, prowadzące do stabilnych wiązań kowalencyjnych. (D) Sprzężenie liganda modyfikowanego azydkiem z oligonukleotydem modyfikowanym alkinem za pomocą metody click chemistry z udziałem katalizatora miedziowego. (E) Niekatalizowane sprzężenie click chemistry z wykorzystaniem liganda modyfikowanego azydkiem i oligonukleotydu zawierającego ugrupowanie dibenzocyklooktynowe.

syntezy koniugatów, struktura i długość łącznika mogą również wpływać na zachowanie farmakokinetyczne. Krótkie i sztywne łączniki mogą utrudniać efektywne wiązanie ligandu z receptorem, zwłaszcza w przypadku wprowadzenia wielu modyfikacji w strukturze oligonukleotydu. Dane literaturowe wskazują, że łączniki o długości sześciu do dziesięciu atomów są wystarczające, aby umożliwić wiązanie małocząsteczkowych ligandów nawet z kilkoma receptorami na powierzchni komórkowej [56, 57] Linkery o podobnej długości umożliwiają również oddziaływanie między sprzężonym ligandem a strukturą podwójnej helisy DNA.

Przykładem wpływu sprzężenia oligonukleotydów z ligandami organicznymi na właściwości fizykochemiczne i biologiczne DNA są koniugaty typu oligonukleotyd-poliamina. W tym obszarze wiele badań przeprowadził zespół profesora Jespera Wengla z Uniwersytetu Południowej Danii [37, 58]. Ich badania wykazały, że przyłączenie spermidyny w formie liniowej lub rozgałęzionej przy użyciu reakcji *click chemistry* do środkowych lub zewnętrznych pozycji oligonukleotydów prowadzi do znacznego

wzrostu stabilności dupleksu, sięgającego nawet +5,5 do +13,0 °C (w zależności od warunków eksperymentalnych). Dodatkowo, modyfikowane oligonukleotydy okazały się znacznie bardziej odporne na działanie 3'-egzonukleaz. Analiza modelowania molekularnego wskazuje, że stabilizacja dupleksu najprawdopodobniej zachodzi poprzez elektrostatyczne oddziaływania między grupami fosforanowymi szkieletu dupleksu a sprotonowanymi grupami aminowymi przyłączonego ligandu. Proponuje się, że wynikające z tego ekranowanie ładunków przyczynia się do zwiększenia temperatury denaturacji dupleksu poprzez redukcję odpychania między łańcuchami oligonukleotydowymi.

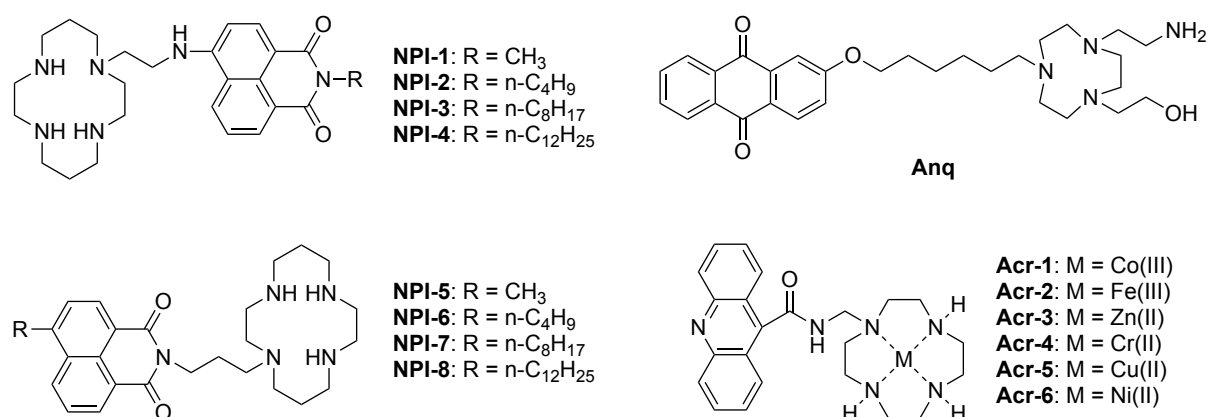
Na podobnej zasadzie można wyjaśnić zwiększenie siły oddziaływania interkalatorów z DNA po ich koniugacji z cząsteczkami poliamin. Szczegółowy opis tego zagadnienia przedstawiłem w pracy **P.4**. Dotychczasowe badania nad wpływem koniugacji interkalatorów z poliaminami skupiały się głównie na cząsteczkach liniowych lub rozgałęzionych poliamin. Wśród badanych interkalatorów najczęściej spotykane są układy 1,8-naftalimidowe, antracenowe i perylenowe, które są sprzęgane z di-, tri- i tetraaminami o różnej długości łańcucha i odstępach między grupami aminowymi. W większości przypadków koniugaty typu interkalator-poliamina charakteryzują się znacznie silniejszym oddziaływaniem z dwuniciowym DNA, co przekłada się na wzrost temperatury topnienia (T_m) kompleksu interkalacyjnego [59–63]. Stabilizacja kompleksu interkalacyjnego zazwyczaj rośnie wraz ze wzrostem liczby grup aminowych i długością poliaminy, przy czym liniowe poliaminy wykazują większą zdolność stabilizacji w porównaniu do swoich rozgałęzionych analogów.

Zaobserwowano również efekty biologiczne koniugacji interkalatorów (lub innych rodzajów cząsteczek) z poliaminami. Jednym z nich jest zmiana lokalizacji wewnątrzkomórkowej koniugatów. W porównaniu do macierzystego układu, koniugaty z poliaminami wykazują zazwyczaj wyraźną tendencję do gromadzenia się w jądrze komórkowym, co tłumaczy się zwiększonym powinowactwem koniugatów do DNA. [64] Ponadto, koniugacja z poliaminami powoduje zmianę mechanizmu transportu koniugatów do wnętrza komórki poprzez wykorzystanie transporterów poliamin, tzw. PATs (*ang.* polyamine transporters). PATs są specjalistycznymi transporterami zlokalizowanymi na błonie komórkowej, które umożliwiają pobieranie poliamin z otoczenia komórki do wnętrza. Przyłączając poliaminy do barwników interkalacyjnych, nawet tak dużych rozmiarów jak cząsteczka perylenu, możliwe jest wykorzystanie tego naturalnego mechanizmu transportu i znaczne zwiększenie pobierania takich koniugatów ze środowiska zewnątrzkomórkowego [65–68].

Co ciekawe, z przeprowadzonych testów porównawczych wchłaniania poliamin o tej samej liczbie grup aminowych (pentaaminy), ale o różnych strukturach (liniowe, rozgałęzione, zatłoczone i cykliczne) wynika, że spośród wszystkich testowa-

nych poliamin, tylko te o strukturze cyklicznej nie były transportowane do wnętrza komórki [69]. Dalsze badania nad cyklicznymi poliaminami wykazały, że działają one jako inhibitory PATs [70].

Mimo że istnieje szerokie spektrum literatury dotyczącej interakcji koniugatów interkalator- liniowa poliamina z DNA i ich wchłaniania przez komórki, właściwości koniugatów z cyklicznymi poliaminami pozostają stosunkowo słabo zrozumiane. Wszystkie znalezione w literaturze koniugaty interkalator-cykliczna poliamina, takie jak **NPI1–NPI8** [71], **Anq** [72] i **Acr1–Acr6** [73], zostały przedstawione na **Rys. 11**. Badania dowodzą, że tego typu koniugaty wykazują silne oddziaływanie z DNA, co prowadzi do zmian w widmach dichroizmu kołowego (CD, *ang.* circular dichroism) oraz wypierania bromku etydyny z jego kompleksu z DNA. Siła interakcji koniugatów z DNA wzrasta po skompleksowaniu jonu metalu przez cykliczną poliaminę, co prawdopodobnie wynika z pojawienia się dużego i trwałego ładunku dodatniego w obrębie liganda oraz zwiększonego elektrostatycznego oddziaływania z łańcuchem bocznym DNA, który jest naładowany ujemnie.



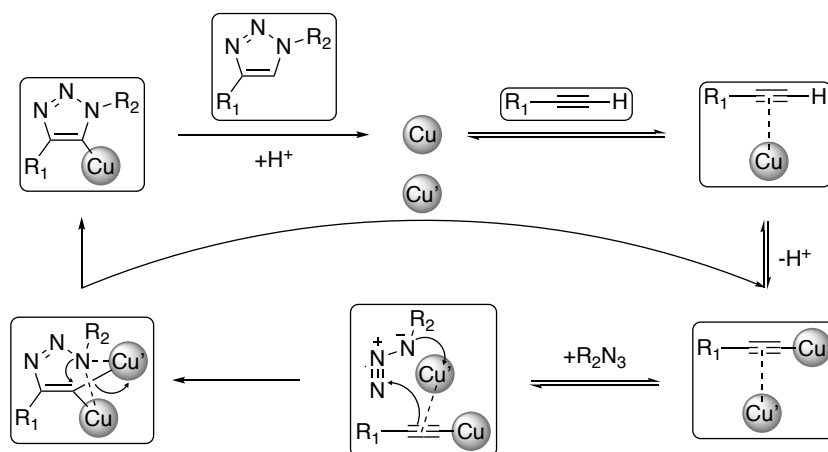
Rys. 11. Wzory strukturalne znanych koniugatów interkalator-cykliczna poliamina.

2.6. Koncepcja *click chemistry* jako dogodna strategia koniugacji

Koncepcja *click chemistry* to termin, który został wprowadzony przez K. B. Sharplessa w 2001 roku i odnosi się do zbioru reakcji chemicznych o wyjątkowo szybkim przebiegu, selektywności i kompatybilności [74]. *Click chemistry* stało się popularnym narzędziem w chemii organicznej, ze względu na jej dogodność, skuteczność i wszechstronność w koniugacji związków organicznych, białek, polimerów, nanocząstek i innych materiałów.

Jedną z najbardziej znanych reakcji *click chemistry* jest reakcja azydki z alkinem (terminalnym lub wewnętrznym). Ta 1,3-dipolarna cykloaddycja katalizowana jonami Cu(I) prowadzi do powstania stabilnego pierścienia 1,2,3-triazolu, co umożliwia łączenie różnych struktur organicznych w sposób kontrolowany (bioortogonalny)

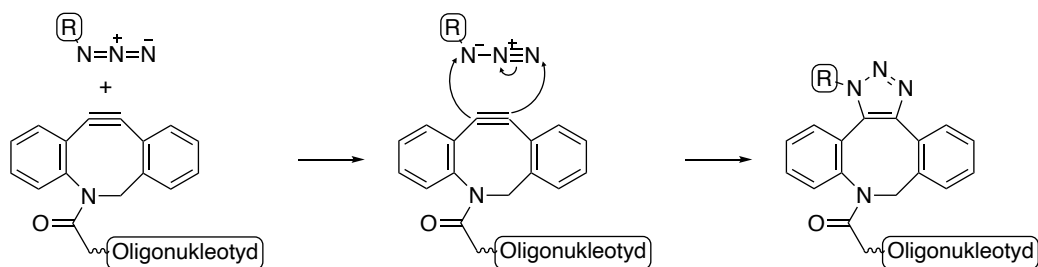
i efektywny (**Rys. 12**). Reakcje *click* mogą również obejmować inne rodzaje reakcji, takie jak reakcje cycloaddycji Dielsa-Aldera, reakcje kondensacji aldehydów z amiami, reakcje Michaela i wiele innych. Jednak to reakcja CuAAC tak doskonale wpisała się w definicję K. B. Sharplessa, że stała się niemal praktycznie synonimem samego pojęcia *click chemistry*.



Rys. 12. Mechanizm dwu-miedziowego cyklu katalitycznego CuAAC. Choć pierwszy zaproponowany mechanizm reakcji obejmował jon miedzi(I) w roli katalizatora, to najnowsze badania izotopowe i kinetyczne sugerują, że mechanizm przebiega z udziałem dwóch atomów miedzi [97].

Click chemistry może być stosowana zarówno w układach chemicznych, jak i biologicznych. W przypadku układów chemicznych najczęściej wykorzystuje się tradycyjną odmianę CuAAC, która korzysta z katalizatora miedziowego. Jest to powszechne, ponieważ pozwala na zastosowanie tańszych substratów, a katalizator miedziowy można łatwo usunąć po zakończeniu reakcji, co pozwala uniknąć jego potencjalnego wpływu na dalsze procesy chemiczne i badania biologiczne. W przypadku układów biologicznych, gdzie istnieje potrzeba minimalizowania toksyczności dla organizmów żywych, można zastosować substraty niewymagające stosowania katalizatora.

W ostatnich latach coraz większe znaczenie w chemii koniugacyjnej nabierają metody niekatalityczne, które umożliwiają wykonywanie reakcji *click* bez użycia jonów miedzi. Jednym z głównych powodów rozwoju tych metod było dążenie do eliminacji potencjalnej cytotoksyczności miedzi w układach biologicznych. Zamiast używać Cu(I) do aktywacji alkinu, jak w tradycyjnej reakcji CuAAC, wykorzystuje się sterycznie naprężone pochodne oktynu, takie jak difluorooktyn (DIFO), dibenzylocykloooktyn (DIBO) i biarylazacykloooktynon (BARAC), w których napięcie pierścienia znacząco destabilizuje alkin [75–77]. Ta destabilizacja stanowi siłę napędową reakcji SPAAC (*ang.* strain-promoted azide-alkyne cycloaddition), w której cykloalkin dąży do złagodzenia napięcia pierścienia przez reakcje z azydem i utworzenie stabilnego



Rys. 13. Mechanizm reakcji SPAAC pomiędzy ligandem posiadającym ugrupowanie azydowe a oligonukleotydem sfunkcjonalizowanym za pomocą DIBO. Pod względem mechanizmu jest to reakcja cykloaddycji [3+2].

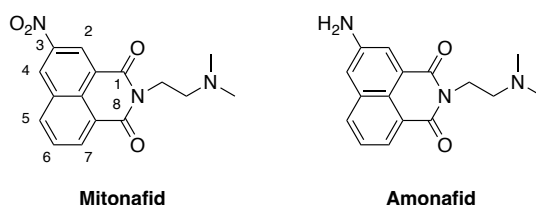
pierścienia triazolu (**Rys. 13**). Mimo że szybkość tego typu reakcji jest nieco wolniejsza niż w przypadku CuAAC, to ze względu na zachowanie bioortogonalności (reakcja chemiczna, która może zachodzić wewnątrz żywych układów bez zakłócania ich naturalnych procesów biochemicznych) oraz znacznie mniejszą toksyczność substratów, z powodzeniem wykorzystuje się je do znakowania biocząsteczek w warunkach *in vivo*.

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

3.1. Synteza pochodnych bezwodnika 1,8-naftalowego

3.1.1. Synteza ω -hydroksyloalkilo-1,8-naftalimidów

Modyfikacje bezwodnika 1,8-naftalowego można przeprowadzić w dwóch fragmentach – o obrębie ugrupowania bezwodnikowego oraz w pierścieniu naftalenyowym. Przykładem dobrze poznanych pochodnych bezwodnika 1,8-naftalenyowego są amonafid i mitonafid, które zostały otrzymane w latach 70 i były intensywnie badane przez ponad dekadę pod kątem ich potencjalnego zastosowania w terapiach przeciwnowotworowych [78–81]. Struktury tych pochodnych wraz z numeracją pozycji została przedstawione na **Rys. 14**.

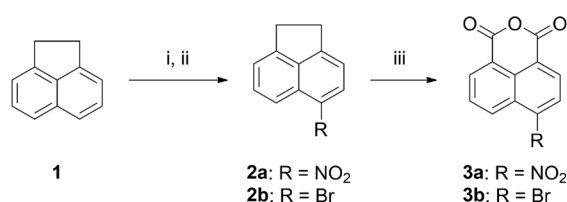


Rys. 14. Struktury mitonafidu i amonafidu.

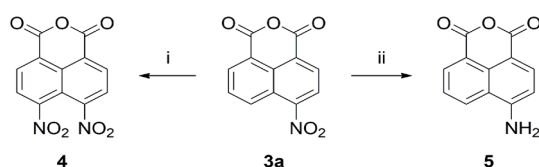
Reakcje ugrupowania bezwodnikowego zazwyczaj obejmują podwójną kondensację z pierwszorzędowymi aminami, co prowadzi do utworzenia pochodnych imidowych. Ten rodzaj modyfikacji jest najczęściej spotykany i można go wykorzystać do

wprowadzenia cząsteczki łącznika, który umożliwia połączenie 1,8-naftalimidów z innymi cząsteczkami chemicznymi lub biocząsteczkami. Takie reakcje przebiegają w łagodnych warunkach z wysoką wydajnością, a produkty reakcji są łatwe do wyizolowania z mieszaniny reakcyjnej za pomocą standardowej chromatografii kolumnowej. Drugim rodzajem modyfikacji jest aromatyczna substytucja elektrofilowa w pierścieniu naftalenowym. Pozycja podstawienia zależy od wyjściowego substratu. Aby uzyskać pochodne modyfikowane w pozycjach 3 i 6, wyjściowym związkiem jest bezwodnik 1,8-naftalenowy. Pochodne modyfikowane w tych pozycjach za pomocą bromu lub grupy nitrowej są komercyjnie dostępne, a ich właściwości fizykochemiczne i biologiczne zostały szczegółowo opisane w literaturze [82]. Przykłady pochodnych modyfikowanych w pozycjach 4 i 5 są znacznie rzadsze. Aby uzyskać takie pochodne, wykorzystuje się acenaften (**1**), w którym występuje indukcyjny efekt kierujący podstawiki w pozycję *para*. Następnie modyfikowany acenaften utlenia się otrzymując odpowiednio podstawiony bezwodnik 1,8-naftalenowy (**Rys. 15**) [83].

Pracę syntetyczną rozpocząłem od otrzymania monopodstawionych pochodnych **3a–b** (**Rys. 15**). Szczegółowy opis wszystkich etapów syntezy, wraz z informacjami dotyczącymi warunków reakcji, metod oczyszczania związków, wydajności reakcji oraz analizy strukturalnej cząsteczek, został przedstawiony w publikacji **P.2**. W kolejnym etapie syntezy wykorzystałem pochodną **3a** jako substrat do reakcji nitrowania, przeprowadzonej za pomocą mieszaniny nitrującej. W rezultacie uzyskałem 4,5-dipodstawioną pochodną **4** (**Rys. 16**). Grupę nitrową w związku **3a** zredukowałem, otrzymując pochodną aminową **5** (**Rys. 16**).

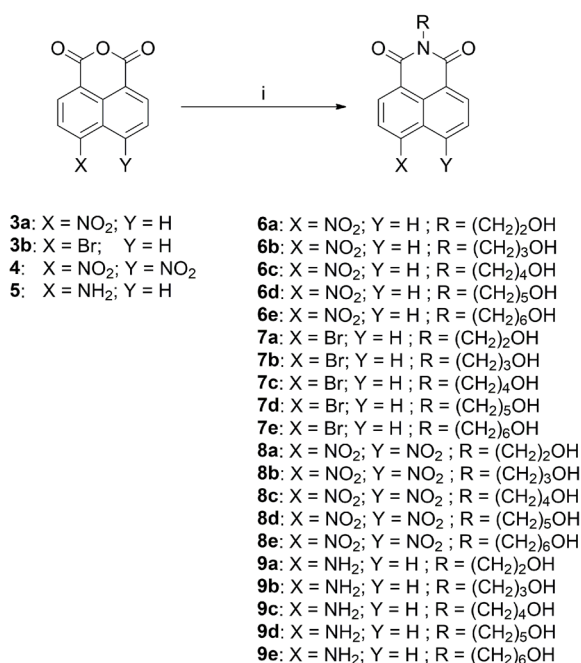


Rys. 15. Schemat syntezy związków **2a–b** i **3a–b**. Reagenty: (i) HNO_3 (65%), AcOH (100%), t.p., 3 godz.; (ii) NBS, bezwodny DMF, t.p., 3 godz.; (iii) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, AcOH (95%), 90 °C, 4 godz.



Rys. 16. Schemat syntezy związków **4** i **5**. Reagenty: (i) HNO_3 (65%), H_2SO_4 (98%), 0–20 °C, następnie 60 °C, 2 godz.; (ii) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5 ekw.), EtOH (96%), t.w., 4 godz.

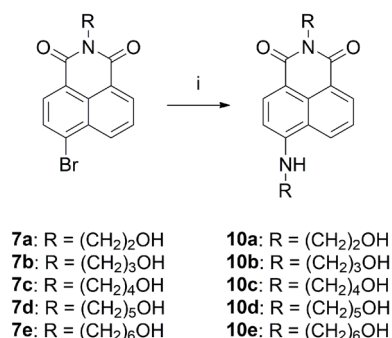
W kolejnym etapie syntezy wykorzystałem opisane powyżej pochodne bezwodnika 1,8-naftalenowego do przeprowadzenia kondensacji z ω -aminoalkoholami, co pozwoliło uzyskać pochodne 1,8-naftalimidowe **6a–9e** (Rys. 17). Te pochodne zostały następnie wykorzystane jako substraty wyjściowe w reakcji aromatycznej substytucji nukleofilowej w pierścieniu naftalenowym za pomocą ω -aminoalkoholi o takiej samej długości łańcucha, jak wprowadzone do ugrupowania imidowego. Przykładowo, z 4-bromo-1,8-naftalimidów **7a–e** otrzymałem monopodstawione pochodne **10a–e** (Rys. 18). Z kolei z 4,5-dinitronaftalimidów **8a–e** uzyskałem mieszaninę dipodstawionych pochodnych (w mieszaninie poreakcyjnej obecne były obie pochodne), z której za pomocą chromatografii kolumnowej wyizolowałem produkty monosubstytucji – związki **11a–e** oraz produkty substytucji obu grup nitrowych – związki **12a–e** (Rys. 19). W kolejnym etapie badań określiłem właściwości cytotoksyczne pochodnych **6a–12e** wobec komórek rakowych i prawidłowych oraz właściwości inhibicyjne wobec topoizomerazy II (topo II). Szczegółowe wyniki badań biologicznych znajdują się w P.2.



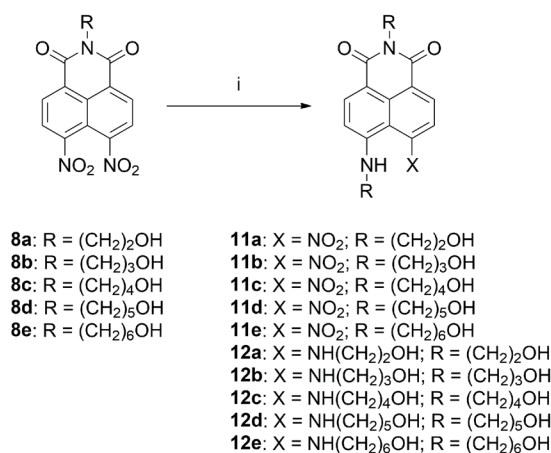
Rys. 17. Schemat syntezy pochodnych **6a–9e**. Reagenty: (i) odpowiednia ω -aminoalkoholami (1 ekw.), EtOH (96%), t.w., 4 godz.

3.1.2. Synteza 1,8-naftalimidów jako komponentów do *click chemistry*

W ramach prac P.3 i P.4 otrzymałem kilka pochodnych 1,8-naftalimidów, które zostały wykorzystane jako bloki budulcowe do reakcji *click chemistry* oraz koniugacji z oligonukleotydami lub makrocyczlami z ugrupowaniami propargilowymi. Schemat i warunki reakcji zostały przedstawione na Rys. 20, a szczegółowy opis metodyki

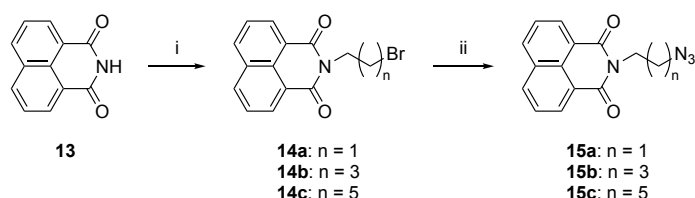


Rys. 18. Schemat syntezy związków **10a–e**. Reagenty: (i) odpowiednia ω -aminoalkoholami (1 ekw.), bezwodny DMF, 90 °C, 4 godz.



Rys. 19. Schemat syntezy związków **11a–12e**. Reagenty: (i) odpowiedni ω -aminoalkohol (2,5 ekw.), EtOH (96%), t.w., 4 godz.

syntezy, oczyszczania i analizy strukturalnej wszystkich produktów reakcji znajduje się w wymienionych pracach. W tym celu wykorzystałem 1,8-naftalimid (**13**), który najpierw przekształciłem w jego sól – 1,8-naftalimidek sodu poprzez reakcję z NaH w bezwodnym DMF, a następnie, w reakcji z nadmiarem odpowiednich dibromoalkanów, otrzymałem serię ω -bromoalkilo-1,8-naftalimidów (**14a–c**). Te pochodne, w reakcji z nadmiarem NaN₃ dały ω -azydoalkilo-1,8-naftalimidy (**15a–c**).



Rys. 20. Schemat syntezy związków **14a–15e**. Reagenty: NaH (1,2 ekw.), bezwodny DMF, t.p., 1 godz., dodanie dibromoalkanu (4 ekw.) w jednej porcji, t.p., 24 godz.; (ii) NaN₃ (2 ekw.), DMSO, t.p., 24 godz.

3.2. Synteza pochodnych 2-hydroksy-tioksantonu

W moich badaniach wykorzystałem również drugi barwnik interkalujący – tioksanton, heterocykliczny związek będący siarkowym analogiem ksantonu. Jedną z pochodnych tioksantonu, hikanton, została zatwierdzona przez FDA w 1975 r. jako środek leczniczy w terapii Schistosomatozy - grupy chorób pasożytniczych wywołanych przez przywry z rodzaju *Schistosoma*. Wkrótce potem okazało się, że zarówno sam tioksanton, jak i wiele jego pochodnych, działają jako silne inhibitory topoizomerazy I. Dzięki swoim właściwościom interkalacyjnym do DNA, hikanton znalazły również zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.

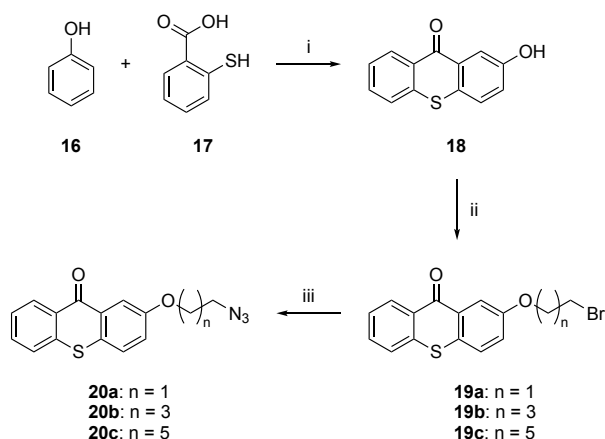
Aby możliwe było połączenie tioksantonu z innymi cząsteczkami, konieczna jest obecność grupy, która łatwo ulega funkcjonalizacji i pozostaje stabilna w różnych warunkach środowiskowych. Należy jednak pamiętać, że tioksanton jest związkiem fotoaktywnym, a niektóre grupy funkcyjne, takie jak grupa karboksylowa, mogą ulegać rozpadowi pod wpływem naświetlenia [84, 85]. W związku z tym wybrałem grupę hydroksylową jako dogodną do wprowadzenia, funkcjonalizacji i stabilną w badaniach fotodynamicznych. Grupa hydroksylowa jest stosunkowo łatwa do wprowadzenia w pozycję 2. Aby otrzymać 2-hydroksy-tioksanton (**18**), przeprowadziłem reakcję fenolu (**16**) z kwasem tiosalicylowym (**17**), która przebiega poprzez kolejne reakcje aromatycznej substytucji elektrofilowej i kończy się wewnątrzcząsteczkową cyklizacją Friedela-Craftsa, prowadzącą do powstania trójcyklicznego rdzenia tioksantonowego (**Rys. 21**).

W kolejnym etapie syntezy poddałem grupę 2-hydroksylową reakcji z nadmiarem odpowiedniego dibromoalkanu, co pozwoliło uzyskać serię pochodnych ω -bromoalkilowych **19a–c** (**Rys. 21**). Następnie atom bromu na końcu łańcucha zastąpiłem grupą azydkową poprzez reakcję z NaN_3 co dało pochodne ω -azydoalkilowe **20a–c** (**Rys. 21**).

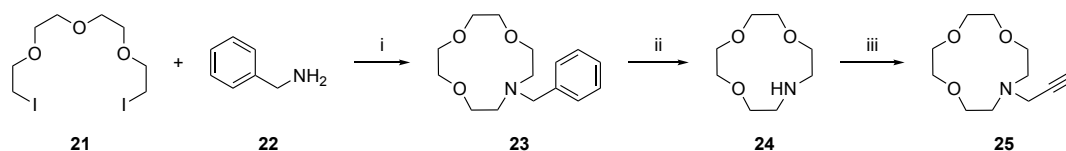
3.3. Synteza makrocykli i ich pochodnych

W pracy wykorzystałem układy makrocykliczne, które zostały poddane serii reakcji w celu wprowadzenia grupy propargilowej i grupy azydkowej do ich struktury. Te modyfikacje umożliwiły mi sprzęgnięcie tych układów z oligonukleotydami (**P.3**) oraz barwnikami interkalującymi (**P.4**).

W celu syntezy 1-aza-12-korony-4 zastosowałem strategię cyklizacji [2:1] opisaną wcześniej przez Calverley i Dale'a [86]. Na początku, 1,11-dijodo-3,6,9-trioksaundekane (**21**) został poddany reakcji z benzylaminą (**22**) w warunkach wysokiego rozcieńczenia, dając *N*-zabezpieczony produkt pośredni **23** (**Rys. 22**). Usunięcie grupy



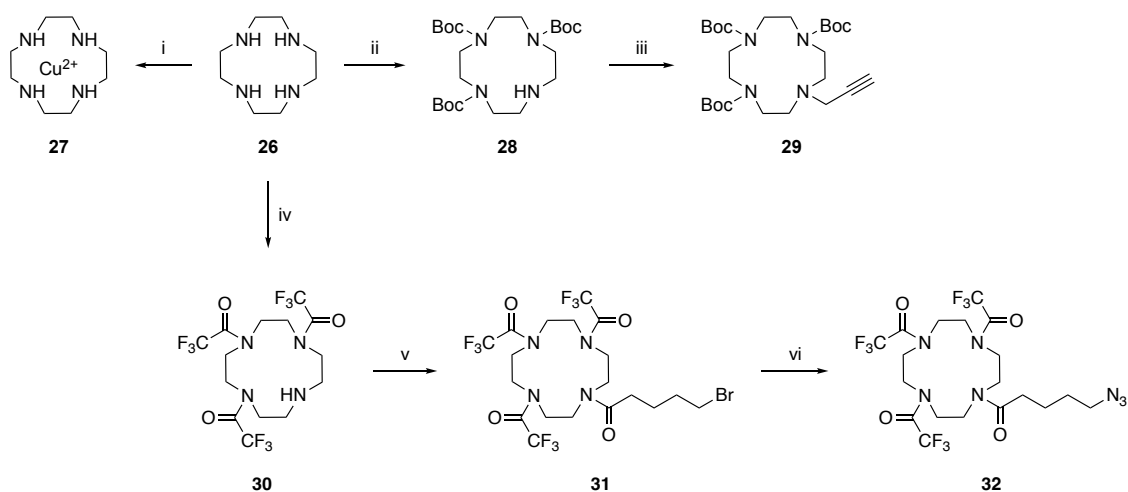
Rys. 21. Schemat syntezy 2-hydroksy-tioksantonu i jego pochodnych. Reagenty: (i) Kwas tiosalicylowy (1 ekw.), fenol (3 ekw.), H_2SO_4 (96%), 90 °C, 18 godz.; (ii) dibromoalkanu (4 ekw.) w jednej porcji, t.p., 24 godz.; (iii) NaN_3 (2 ekw.), DMSO, t.p., 24 godz.



Rys. 22. Schemat syntezy związków 23–25. Reagenty: (i) benzyloamina (1,1 ekw.), K_2CO_3 (3 ekw.), MeCN, t.w., 24 godz.; (ii) katalizator: 5% Pd/C, H_2 (3 bary), EtOH, t.p., 8 godz., (iii) bromek propargilu (r-r 80% w toluenie, 1,1 ekw.), K_2CO_3 (1,5 ekw.), MeCN, t.w., 8 godz.

benzylowej w katalizowanej wodorolizie daje 1-aza-12-korona-4 (24). Związek 24 został dalej sfunkcjonalizowany w reakcji z bromkiem propargilu, a następnie wyizolowany z mieszaniny poreakcyjnej za pomocą chromatografii kolumnowej, dając końcowy związek 25. Szczegółowy opis warunków reakcji, metod izolacji i analizy strukturalnej wszystkich produktów reakcji znajduje się w pracy P.4.

W syntezie pochodnych cyklenu wykorzystałem komercyjnie dostępny cyklen (26). Schemat reakcji oraz warunki eksperymentalne zostały przedstawione na Rys. 23, natomiast szczegółowy opis metody syntezy, metody izolacji oraz analizy strukturalnej wszystkich produktów reakcji znajduje się w pracach P.3 i P.4. W wyniku reakcji cyklenu z $CuCl_2$ w etanolu otrzymałem kompleks Cu^{2+} -cyklen (27), który wytrącił się jako barwny osad. Dzięki specyficznej budowie cząsteczki cyklenu, która charakteryzuje się bliskim rozmieszczeniem czterech grup aminowych, można selektywnie zabezpieczyć 3 z 4 grup aminowych przy użyciu stosunkowo dużych grup zabezpieczających, takich jak Boc i TFA, nawet przy zastosowaniu więcej niż 3-krotnego nadmiaru odczynnika zabezpieczającego. Zarówno zabezpieczona pochodna 28, jak i 30, umożliwiają dalszą funkcjonalizację w obrębie wolnej grupy aminowej. Dzięki temu łatwo



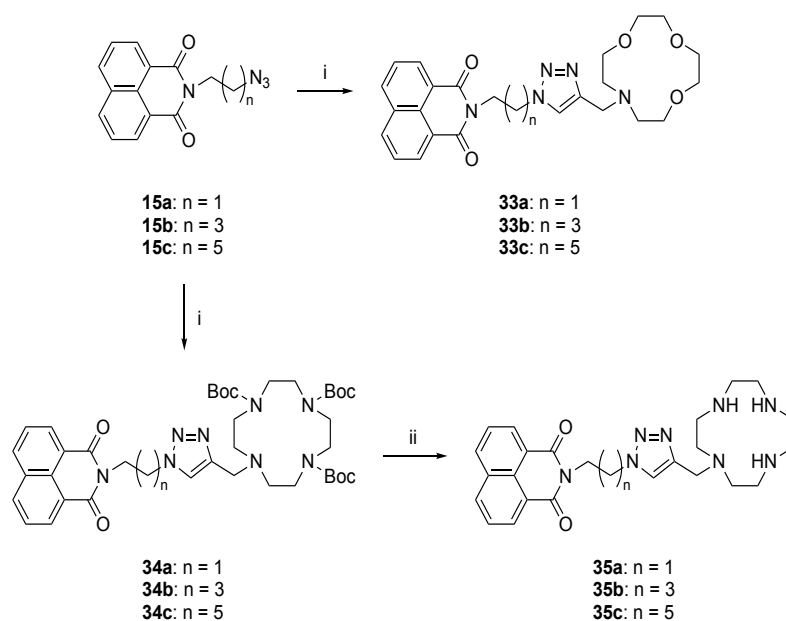
Rys. 23. Schemat syntezy związków **27–32**. Reagenty: (i) CuCl_2 (2 ekw.), EtOH , t.p., 24 godz.; (ii) 2M *r-r* Boc_2O w THF (3,5 ekw.) wkraplany przez 4 godz., Et_3N (3,5 ekw.), CHCl_3 , t.p., 24 godz.; (iii) bromek propargilu (*r-r* 80% w toluenie, 1,1 ekw.), K_2CO_3 (1,5 ekw.), MeCN , t.w., 8 godz.; (iv) TFAEt (4 ekw.), Et_3N , MeOH , t.p., 24 godz.; (v) chlorek 5-bromopentanoilu (1,1 ekw.), K_2CO_3 , bezwodny CH_2Cl_2 , 0 °C, 40 min.; (vi) NaN_3 (2 ekw.), DMSO , t.p., 24 godz.

mogłem uzyskać monofunkcjonalizowane pochodne **29** i **32**, odpowiednie do wykorzystania w syntezie *click chemistry*, na przykład w reakcji CuAAC.

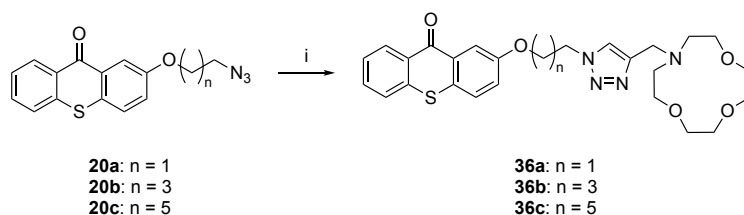
3.4. Synteza koniugatów interkalator-makrocykl

Wykorzystując otrzymane wcześniej bloki budulcowe, przeprowadziłem syntezę koniugatów typu interkalator-makrocykl. Schemat reakcji oraz warunki eksperymentalne zostały przedstawione na **Rys. 24** i **Rys. 25**. Szczegółowy opis metodyki syntezy, metod izolacji oraz analizy strukturalnej wszystkich produktów reakcji znajduje się w pracach **P.3** i **P.4**.

Strategia syntezy koniugatów opiera się na wykorzystaniu jako jednego z komponentów interkalatorów, pochodnych 1,8-naftalimidu (**15a–c**, **Rys. 24**) i 2-hydroksy-tioksantonu (**20a–c**, **Rys. 25**), do których zostały przyłączone linkery o różnej długości, tj. 1,2-etylenowy, 1,4-butelenowy i 1,6-heksylenowy, z terminalną grupą azydkową. Drugim komponentem są makrocykle zawierające ugrupowanie propargilowe. Obie te jednostki zostały skonjugowane w reakcji CuAAC, co doprowadziło do otrzymania pośrednich produktów koniugatów z cyklenem (**34a–c**) oraz końcowych koniugatów z 1-aza-12-koroną-4 (**33a–c** i **36a–c**). W przypadku pośrednich produktów (**34a–c**), grupy zabezpieczające Boc zostały usunięte w kwasowych warunkach, dając ostateczne produkty koniugacji (**35a–c**).



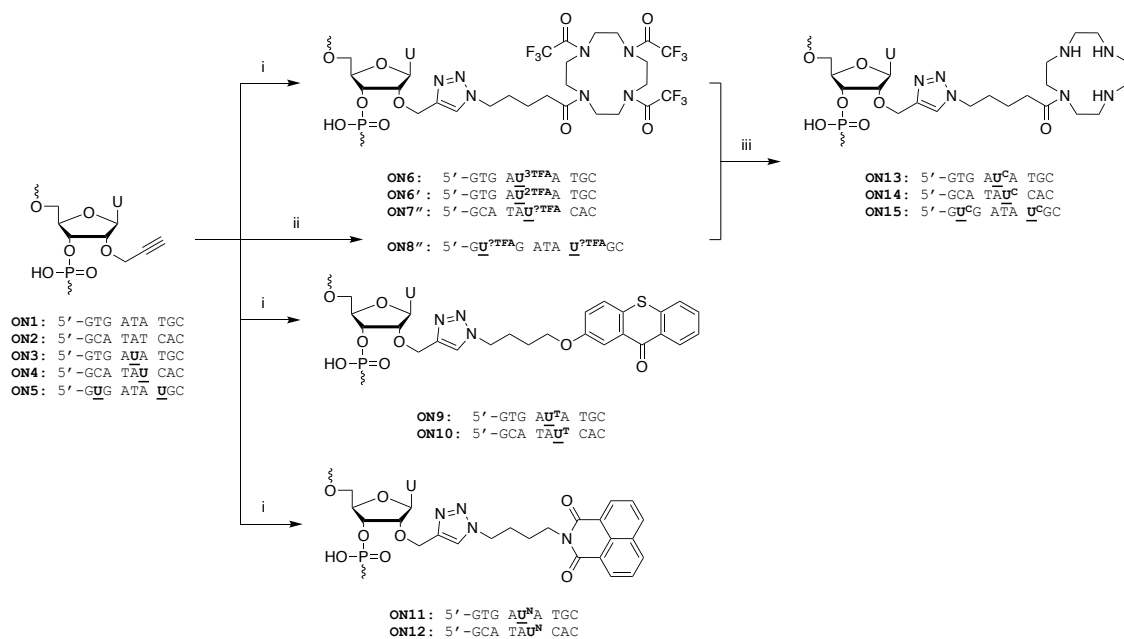
Rys. 24. Schemat syntezy koniugatów 1,8-naftalimidu i 1-aza-12-korony-4, **33a–c**, oraz koniugatów 1,8-naftalimidu i cyklenu, **34a–c**. Reagenty: (i) pochodna azydkowa (1 ekw.), pochodna propargilowa (1 ekw.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 ekw.), askorbinian sodu (0,2 ekw.), mieszanina THF-woda (7:3, v/v), t.p., 24 godz.; (ii) TFA (50 ekw.), CH_2Cl_2 , t.p., 24 godz.



Rys. 25. Schemat syntezy koniugatów 2-hydroksy-tioksantonu i 1-aza-12-korony-4, **36a–c**. Reagenty: (i) pochodna azydkowa (1 ekw.), pochodna propargilowa (1 ekw.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 ekw.), askorbinian sodu (0,2 ekw.), mieszanina THF-woda (7:3, v/v), t.p., 24 godz.

3.5. Modyfikacje kwasów nukleinowych w pozycji 2'

W pracy **P.3** przedstawiłem strategię syntezy, modyfikacji, oczyszczania i analizy oligonukleotydów **ON1–5** oraz ich koniugatów. Schemat reakcji oraz warunki eksperymentalne zostały przedstawione na **Rys. 26**. Syntezę rozpocząłem od otrzymania oligonukleotydów **ON1–5**, spośród których **ON3**, **ON4** i **ON5** zawierały urydynę modyfikowaną w pozycji 2' za pomocą ugrupowania propargilowego. Ta modyfikacja umożliwiła późniejsze zastosowanie strategii *click chemistry* do modyfikacji tych oligonukleotydów. Otrzymane wcześniej bloki budulcowe, które zawierały ugrupowanie azydkowe w terminalnej pozycji łącznika, tj. pochodna cyklenu **32** (**Rys. 23**),



Rys. 26. Schemat post-syntetycznej strategii sprzężenia 2'-modyfikowanych oligonukleotydów **ON1–5** z pochodnymi azydkowymi. Reagenty: (i) CuSO_4 -TBTA, askorbinian sodu (1:1:2,5, n/n), pochodna azydkowa (100-krotny nadmiar molowy), bufor TEAA/DMSO, Ar, wspomaganie mikrofalowe, 90 °C, 2 godz.; (ii) CuSO_4 -THPTA, askorbinian sodu (1:1:2,5, n/n), pochodna azydkowa (200-krotny nadmiar molowy), bufor TEAA/DMSO, Ar, wspomaganie mikrofalowe, 90 °C, 2 godz.; (c) $r\text{-r-NH}_3$ (35%), 55 °C, 12 godz.; 3TFA – cyklen zabezpieczony trzema grupami CF_3CO ; 2TFA – cyklen zabezpieczony dwoma grupami CF_3CO ; ?TFA – mieszanina produktów o nieokreślonej liczbie grup zabezpieczających CF_3CO .

pochodna tioksantonu **20b** (Rys. 21) oraz pochodna 1,8-naftalimidu **15b** (Rys. 20), zostały skonjugowane z oligonukleotydami **ON3–5** w reakcji CuAAC wspomaganiej mikrofalami. W kontekście efektywności sprzężenia małowcząsteczkowych związków chemicznych z oligonukleotydami **ON3** i **ON4**, zawierającymi ugrupowanie 2'-O-propargilowe w jednym miejscu łańcucha, istnieją dwa istotne parametry, które wpływają na wydajność reakcji – wspomaganie mikrofalowe i zastosowanie kompleksu CuSO_4 -TBTA. Brak któregoś z tych elementów skutkowało brakiem reakcji sprzężenia. W przypadku sprzężenia oligonukleotydu **ON5**, zawierającego ugrupowanie 2'-O-propargilowe w dwóch miejscach łańcucha, zastosowanie kompleksu CuSO_4 -TBTA nie powodowało efektywnej katalizy reakcji, z kolei zastosowanie kompleksu CuSO_4 -THPTA, powodowało efektywną katalizę reakcji CuAAC.

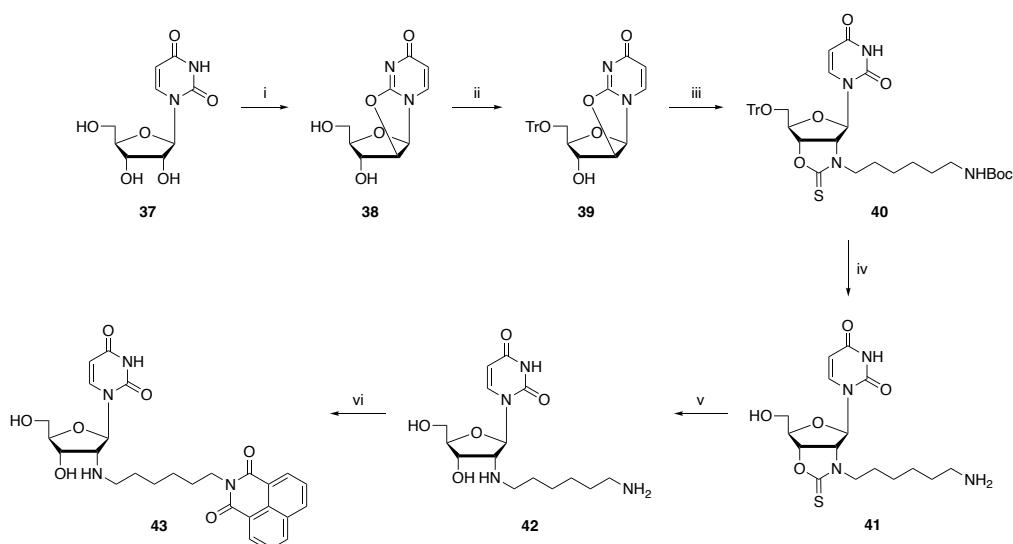
W przypadku reakcji sprzężenia interkalatorów z **ON3** i **ON4**, prowadzących do koniugatów **ON9–12**, produkty tych reakcji znacząco różniły się od wyjściowych oligonukleotydów pod względem lipofilowości. Ich efektywna izolacja była możliwa już przy wykorzystaniu tylko RP-HPLC z półpreparatywną kolumną C18. Natomiast próba izolacji koniugatów cykleny, **ON13–15**, jedynie przy użyciu RP-HPLC prowadziła zawsze do otrzymania mieszaniny produktów. W związku z tym, w przypadku otrzymywania koniugatów cykleny, zastosowałem metodę, w której grupy zabezpieczające

(trifluorooctanowe) pozostawiono na czas izolacji przy użyciu RP-HPLC. Dzięki temu możliwa była efektywna izolacja pośrednich produktów sprzęgania **ON6**, **ON6'**, **ON7''** i **ON8''**. Następnie, po odbezpieczeniu grup trifluorooctanowych w obecności wodnego roztworu NH₃ i izolacji przy użyciu IE-HPLC (chromatografia jonowymienna), uzyskano końcowe koniugaty **ON13–15** o wysokiej czystości.

W wyniku sprzęgania oligonukleotydu **ON3** z pochodną **32** zaobserwowałem powstawanie dwóch produktów sprzęgania – produktu głównego, **ON6**, charakteryzującego się obecnością wszystkich trzech grup zabezpieczających TFA w obrębie pierścienia cyklicznego oraz produktu ubocznego, **ON6'**, w którym jedna z grup trifluorooctanowych uległa odbezpieczeniu. Oba produkty wykazywały wyraźnie odseparowane frakcje podczas oczyszczania RP-HPLC. Zebranie tych frakcji osobno i odbezpieczenie obu produktów pośrednich oddzielnie prowadziło do uzyskania tego samego produktu końcowego, tj. koniugatu **ON13**. Ze względu na te wyniki, dla pozostałych reakcji sprzęgania pochodnej **32** z **ON4** i **ON5**, zastosowałem strategię izolacji polegającą na zebraniu wszystkich frakcji półproduktów razem (zarówno zabezpieczonych całkowicie, jak i niecałkowicie) i następnie wspólne odbezpieczenie grup trifluorooctanowych i oczyszczenie końcowego produktu metodą IE-HPLC.

W ramach swoich badań opracowałem również drugą metodę modyfikacji nukleozydów w pozycji 2'. Polegała ona na otrzymaniu 2,2'-anhydrourydyny (**38**) z urydyny (**27**) w reakcji z karbonianem difenylu [87], a następnie wprowadzeniu 1,8-naftalimidu poprzez linker 1,6-diaminoheksylenowy. Schemat reakcji oraz warunki eksperymentalne zostały przedstawione na **Rys. 27**, a szczegółowy opis metodyki syntezy, metod izolacji oraz analizy strukturalnej wszystkich produktów reakcji znajduje się w pracy **P.1**.

Grupę 5'-OH w 2,2'-anhydrourydynie zabezpieczyłem za pomocą chlorku trytylu według opisanej metody (grupa trytylowa ze względu na jej duże rozmiary zabezpiecza selektywnie tylko pozycję 5') [88]. Powstała pochodna **39** została następnie poddana reakcji z linkerem pochodną 1,6-diaminoheksanu, w którym jedna z grup aminowych była zabezpieczona grupą Boc, a druga przekształcona w izotiocyjanianową. W ten sposób otrzymałem pośredni produkt **40**, który zawiera charakterystyczny pierścień oksazolo-2(3*H*)-tionu. Ponieważ obie zastosowane grupy zabezpieczające (Tr i Boc) są labilne w środowisku kwaśnym, można je odbezpieczyć w jednym etapie, uzyskując pochodną **41**. Następnie, w środowisku zasadowym, otwiera się pierścień oksazolo-2(3*H*)-tionu. Wolna grupa aminowa obecna w pochodnej **42** może zostać poddana reakcji z bezwodnikiem 1,8-naftalenowym (lub jego pochodnymi, których opis znajduje się w pracy **P.1**), co prowadzi do uzyskania końcowego produktu **43**.

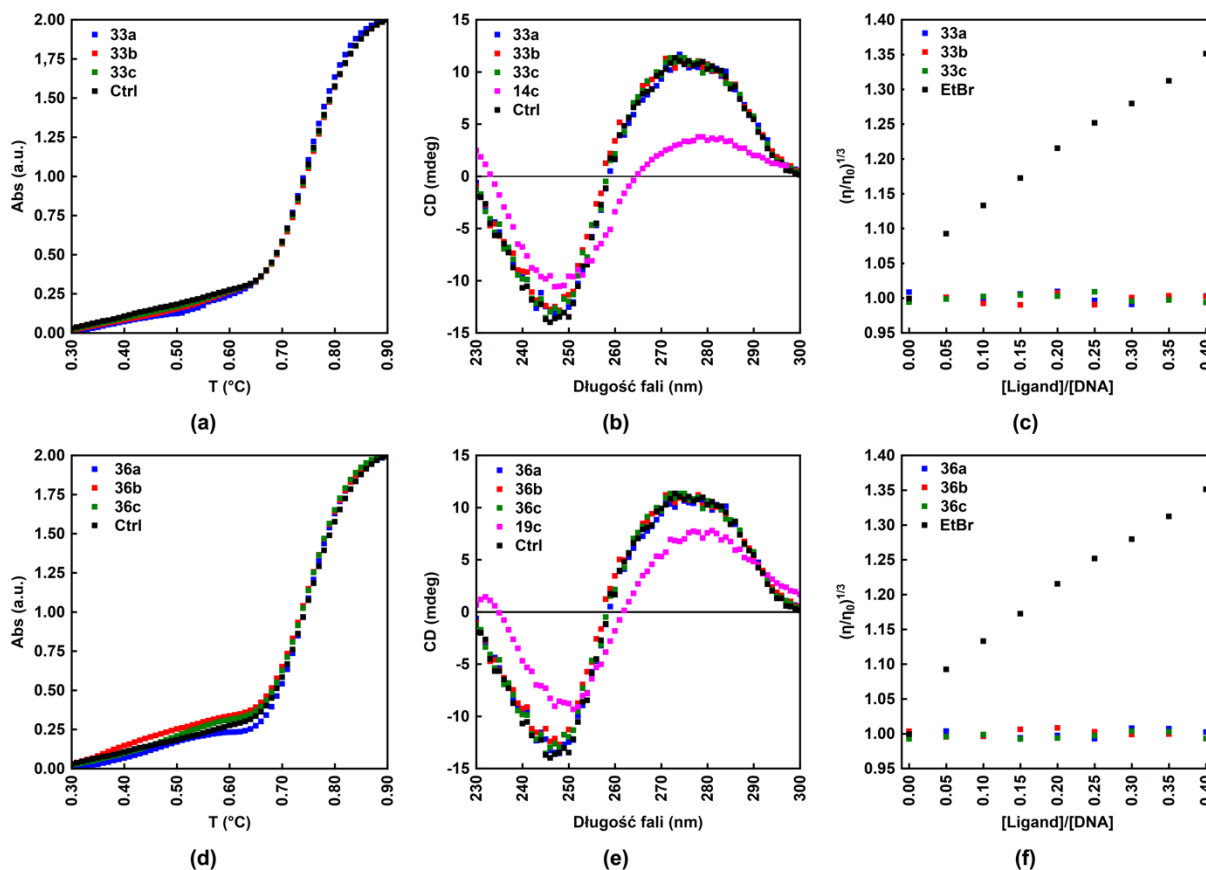


Rys. 27. Schemat modyfikacji urydyny w pozycji 2' poprzez pochodną oksazolo-2(3H)-tio-nową. Reagenty: (i) $(\text{PhO})_2\text{CO}$ (1 ekw.), NaHCO_3 (1 ekw.), DMF, 80 °C, 2 godz.; (ii) TrCl (1 ekw.), DMSO-pirydyna (9:1, v/v), 80 °C, 2 godz.; (iii) $\text{BocNH}-(\text{CH}_2)_6\text{-NCS}$ (2 ekw.), DBU (2 ekw.), MeCN, t.p., Ar; (iv) HCl (35%, 5 ekw.), CH_2Cl_2 , t.p.; (v) NaOH (20 ekw.), EtOH- H_2O (5:1, v/v), t.w., 2 godz.; (vi) DMAP (2,5 ekw.), pirydyna, EtOH, t.w., 18 godz.

3.6. Ocena oddziaływania koniugatów z DNA

W kolejnym etapie badań dokonałem oceny oddziaływania otrzymanych ma-łocząsteczkowych związków chemicznych i ich koniugatów z DNA. Początkowo sku-piłem się na zbadaniu wpływu modyfikacji struktury dwóch wyjściowych układów in-terkalujących – 1,8-naftalimidu i 2-hydrokso-tioksantonu – na ich oddziaływanie z DNA. Do tego celu wykorzystałem pochodną 1,8-naftalimidu o strukturze **14c**, czyli *N*-(6-bromoheksylo)-1,8-naftalimid, jako wzorca do badań nad oddziaływaniem z DNA. W ramach pracy **P.4** opisałem trzy rodzaje eksperymentów: (a) pomiar tempe-ratury topnienia DNA, (b) pomiar dichroizmu kołowego oraz (c) pomiar lepkości DNA, które miały na celu ocenę oddziaływania koniugatów barwników i makrocykli z DNA. Wyniki tych eksperymentów znajdują się na **Rys. 28 (Rys. 6 w P.4)**

Zazwyczaj proste wiązanie w rowku i interakcje elektrostatyczne cząsteczek li-ganda z DNA powodują nieznaczne (lub żadne) zakłócenie położenia i intensywności pasm związanych z układem zasad i helikalnością DNA, podczas gdy interkalacja zna-cząco zmienia intensywność zarówno pasma dodatniego (około 275 nm) jak i ujem-nego (około 245 nm) w widmie CD [89, 90]. Badania wykazały, że dodanie związku **14c** do CT-DNA spowodowało zmniejszenie ujemnego pasma przy 245 nm oraz jeszcze bardziej znaczące zmniejszenie dodatniego pasma przy 275 nm w widmie CD (**Rys. 28b**). Wyniki te wskazują na zdolność tej pochodnej do interkalacji do CT-DNA przy zachowaniu formy B-DNA. W ramach tego samego eksperymentu przetestowałem również koniugaty 1,8-naftalimidu i 1-aza-4-korony-12 (**33a–c**) oraz 1,8-naftalimidu



Rys. 28. Krzywe topnienia dla roztworów DNA-CT (20 μM) i (a) 33a–c oraz (b) 36a–c w buforze kokadylanowym (20 mM; pH 7,0; [ligand]/[DNA] = 0,30). Widma CD DNA-CT (200 μM) w obecności i nieobecności (c) 33a–c i 14c, oraz (d) 36a–c i 19c w buforze Tris–HCl (5 mM; NaCl 50 mM; pH 7,0 w 25 $^{\circ}\text{C}$; [ligand]/[DNA] = 0,30). Wpływ stężenia (e) 33a–c, (f) 36a–c oraz EtBr na względną lepkość DNA-CT (200 μM) w buforze Tris–HCl (5 mM; NaCl 50 mM; pH 7,0 przy 25 $^{\circ}\text{C}$; [ligand]/[DNA] = 0,00, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40). Wszystkie podane wartości są średnią z trzech niezależnych eksperymentów.

i cyklu (35a–c), jednak żadna z tych grup koniugatów nie wykazała zmian w widmie CD, co sugeruje brak właściwości interkalacyjnych tych pochodnych. W celu potwierdzenia tej hipotezy przeprowadziłem dwa dodatkowe eksperymenty, jednak zarówno wyniki pomiaru temperatury topnienia CT-DNA (Rys. 28a), jak i lepkości CT-DNA (Rys. 28c) w obecności koniugatów 1,8-naftalimidu nie różniły się od wyników uzyskanych dla samego CT-DNA. Można więc wnioskować, że koniugacja 1,8-naftalimidu z wybranymi makrocyklami powoduje zmianę sposobu oddziaływania 1,8-naftalimidu z DNA lub całkowicie pozbawia go tych właściwości.

Korzystając z tej samej metodologii badań, doszedłem do podobnych wniosków w przypadku pochodnych 2-hydroksy-tioksantonu. Jako wzorca dla tej grupy koniugatów użyłem pochodnej 19c, czyli 2-((6-bromoheksylo)oksy)-tioksantonu. Podobnie jak w przypadku wzorca dla 1,8-naftalimidów, pochodna 19c w obecności CT-DNA również spowodowała zmiany w widmie CD, świadczące o jej właściwościach interkalacyjnych (Rys. 28e), aczkolwiek o mniejszym stopniu niż w przypadku

pochodnej **14c**. Również jak w przypadku 1,8-naftalimidów, koniugacja 2-hydroksytioksantonu z 1-aza-4-koroną-12 prowadziła do utraty właściwości interkalacyjnych przez otrzymane koniugaty (**36a–c**), co potwierdzają badania zmiany temperatury topnienia (**Rys. 28d**) i lepkości CT-DNA (**Rys. 28f**).

Wbudowanie cząsteczek 1,8-naftalimidu i tioksantonu bezpośrednio w strukturę DNA, jak ma to miejsce w przypadku koniugatów **ON9–12** (**Rys. 26**), doprowadziło do stabilizacji termicznej podwójnej helisy utworzonej z komplementarnych oligonukleotydów. **Rys. 29** przedstawia podsumowanie efektów stabilizacyjnych i destabilizacyjnych dupleksów DNA w zależności od rodzaju, ilości i pozycji wprowadzonych modyfikacji do komplementarnych oligonukleotydów.

	ON1	ON9	ON11	ON13	ON15
ON2	5'-G T G A T A T G C 3'-C A C T A T A C G DU1: ref. 32.5 °C	5'-G T G A U ^F A T G C 3'-C A C T A T A C G DU2: +3.0 °C	5'-G T G A U ^N A T G C 3'-C A C T A T A C G DU3: +3.0 °C	5'-G T G A U ^C A T G C 3'-C A C T A T A C G DU4: -4.0 °C	5'-G U ^C G A T A U ^C G C 3'-C A C T A T A C G DU5: -13.0 °C
ON10	5'-G T G A T A T G C 3'-C A C U ^F A T A C G DU6: +4.5 °C	5'-G T G A U ^F A T G C 3'-C A C U ^F A T A C G DU7: +9.0 °C	5'-G T G A U ^N A T G C 3'-C A C U ^N A T A C G DU8: +10.0 °C	5'-G T G A U ^C A T G C 3'-C A C U ^F A T A C G DU9: +1.0 °C	5'-G U ^C G A T A U ^C G C 3'-C A C U ^F A T A C G DU10: -4.0 °C
ON12	5'-G T G A T A T G C 3'-C A C U ^N A T A C G DU11: +6.0 °C	5'-G T G A U ^F A T G C 3'-C A C U ^N A T A C G DU12: +5.0 °C	5'-G T G A U ^N A T G C 3'-C A C U ^N A T A C G DU13: +7.0 °C	5'-G T G A U ^C A T G C 3'-C A C U ^N A T A C G DU14: +1.0 °C	5'-G U ^C G A T A U ^C G C 3'-C A C U ^N A T A C G DU15: -9.0 °C
ON14	5'-G T G A T A T G C 3'-C A C U ^C A T A C G DU16: -5.5 °C	5'-G T G A U ^F A T G C 3'-C A C U ^C A T A C G DU17: -2.5 °C	5'-G T G A U ^N A T G C 3'-C A C U ^C A T A C G DU18: -0.5 °C	5'-G T G A U ^C A T G C 3'-C A C U ^C A T A C G DU19: -5.0 °C	5'-G U ^C G A T A U ^C G C 3'-C A C U ^C A T A C G DU20: -18.0 °C
MM1	5'-G T G A T A T G C 3'-C A C T C T A C G DU21: ref. 17.0 °C	5'-G T G A U ^F A T G C 3'-C A C T C T A C G DU22: +7.5 °C	5'-G T G A U ^N A T G C 3'-C A C T C T A C G DU23: +6.0 °C	5'-G T G A U ^C A T G C 3'-C A C T C T A C G DU24: -4.0 °C	N/O
MM2	5'-G T G A T A T G C 3'-C A C T T T A C G DU25: ref. 17.5 °C	5'-G T G A U ^F A T G C 3'-C A C T T T A C G DU26: +7.0 °C	5'-G T G A U ^N A T G C 3'-C A C T T T A C G DU27: +5.5 °C	5'-G T G A U ^C A T G C 3'-C A C T T T A C G DU28: +1.0 °C	N/O
MM3	5'-G T G A T A T G C 3'-C A C T G T A C G DU29: ref. 23.0 °C	5'-G T G A U ^F A T G C 3'-C A C T G T A C G DU30: +5.0 °C	5'-G T G A U ^N A T G C 3'-C A C T G T A C G DU31: +7.0 °C	5'-G T G A U ^C A T G C 3'-C A C T G T A C G DU32: -5.0 °C	N/O

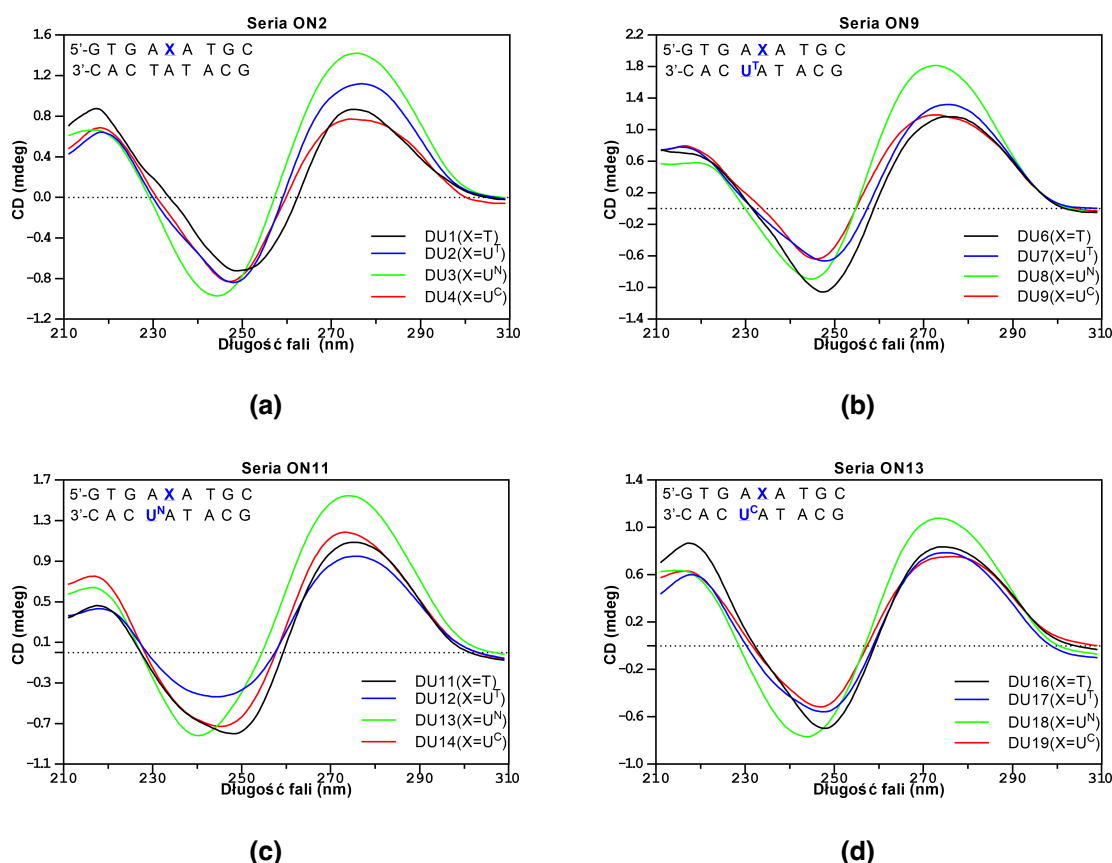
Rys. 29. Zestawienie struktur dupleksów i zmiany temperatury topnienia (ΔT_m) modyfikowanych dupleksów w porównaniu z odpowiednimi kontrolami. Kolumny przedstawiają oznaczenia dla nici 5', rzędy przedstawiają oznaczenia dla nici 3'. Wartości ΔT_m są średnią z trzech pomiarów. DU1 stanowi referencję dla DU2–20, DU21 stanowi referencję dla DU22–24, DU25 stanowi referencję dla DU26–28, DU29 stanowi referencję dla DU30–32. Warunki: 2,5 μ M każdej nici, 5,8 mM bufor $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,0), zawierający 100 mM NaCl i 0,10 mM EDTA. Wartości T_m odzwierciedlają średnią z dwóch pomiarów. N/O – nie określono.

Obecność pojedynczej cząsteczki 1,8-naftalimidu w dupleksach DU3 i DU11 spowodowała wzrost ich temperatury topnienia (ΔT_m) odpowiednio o +3 i +6 °C w porównaniu z macierzystym (niemodyfikowanym) dupleksem DU1 ($T_m = 32,5$ °C). Wprowadzenie dwóch cząsteczek 1,8-naftalimidu do DU13 prowadzi do $\Delta T_m = +7$ °C.

Wprowadzając pojedyncze cząsteczki tioksantonu w strukturę DU2 ($\Delta T_m = +3$ °C) i DU6 ($\Delta T_m = +4,5$ °C), zaobserwowałem podobne efekty stabilizacyjne związane z pozycją modyfikacji w duplesie – modyfikacja sąsiadująca z parą GC prowadziła do większej stabilizacji duplesu. Ciekawym spostrzeżeniem jest synergiczny efekt stabilizacji w duplesie DU7 ($\Delta T_m = +9$ °C), w którym obecne są dwie cząsteczki tioksan-

tonu. Jeszcze bardziej interesujące jest duże zróżnicowanie stabilizacji w dupleksach **DU12** ($\Delta T_m = +5$ °C) i **DU8** ($\Delta T_m = +10$ °C), które zawierają jedną cząsteczkę 1,8-naftalimidu i tioksantonu na przeciwnych niciach, różniącą się pozycją modyfikacji.

Chociaż dokładne przyczyny opisanych różnic w stabilizacji dupleksów nie zostały przez mnie w pełni wyjaśnione, podjąłem badania mające na celu zgłębienie ogólnego mechanizmu stabilizacji modyfikowanych dupleksów. Ze względu na to, że zarówno 1,8-naftalimid, jak i tioksanton są znane jako interkalatory, przeprowadziłem eksperymenty mające na celu potwierdzenie interkalacyjnego oddziaływania barwników obecnych w modyfikowanych dupleksach. **Rys. 30** (**Rys. 2** w **P.3**) przedstawia widma CD dla większości otrzymanych dupleksów (z wyjątkiem dupleksów zawierających dwie cząsteczki cyklicznego ze względu na ich niską temperaturę topnienia). Jak wynika z **Rys. 30**, obecność cząsteczek 1,8-naftalimidu w **DU3** oraz tioksantonu w **DU2** powoduje zmianę intensywności obu pasm CD przy zachowaniu struktury B-DNA, co wskazuje na występowanie zjawiska interkalacji. Podobne efekty można zaobserwować dla pozostałych dupleksów modyfikowanych tymi barwnikami.



Rys. 30. Widma CD zarejestrowane w t.p. dla: (a) **DU1–4**, (b) **DU6–9**, (c) **DU11–14** i (d) **DU16–19**. Eksperymenty przeprowadzono w buforze fosforanowym: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 5,8 mM (pH 7,0), zawierającym 100 mM NaCl i 0,10 mM EDTA. Stężenie komplementarnych oligonukleotydów 2,5:2,5 μM .

Wnioski płynące z tych badań wskazują, że siła efektu stabilizującego wynikającego z koniugacji oligonukleotydów z cząsteczkami 1,8-naftalimidu i tioksantonu zależy zarówno od pozycji wprowadzonych modyfikacji – modyfikacja U sąsiadującej z parą GC powoduje większą stabilizację dupleksu niż modyfikacja U sąsiadującej z parą AT – jak również od ilości wprowadzonych modyfikacji. Warto jednak zauważyć, że efekty stabilizacyjne nie są w pełni addytywne, a w przypadku wprowadzenia więcej niż jednej modyfikacji zależą od dodatkowych czynników i są trudne do przewidzenia, co zostało szerzej opisane w **P.3**. Istotnym czynnikiem odpowiedzialnym za stabilizację modyfikowanych dupleksów jest interkalacja barwników do DNA.

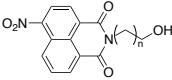
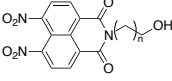
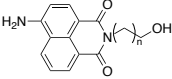
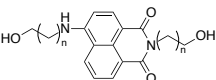
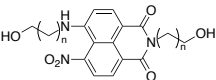
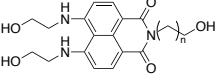
Efekty związane z wprowadzeniem cząsteczki cyklenu do dupleksów wykazują odmienny charakter. Zazwyczaj taka modyfikacja prowadzi do obniżenia stabilności termicznej otrzymanych dupleksów o około -4 do -5 °C na jedną wprowadzoną cząsteczkę cyklenu (**Rys. 29**). Praca **P.3** stanowi pierwszy na świecie przykład kowalencyjnej modyfikacji oligonukleotydów za pomocą cyklicznej poliaminy. Jak wynika z **Rys. 30**, wprowadzenie cyklenu do dupleksów nie powoduje zauważalnych zmian w ich widmach CD. Praca **P.3** zawiera przegląd literatury, w której wykazałem, że również wprowadzenie liniowych poliamin w pozycjach 2' i 4' pierścienia D-rybofuranozy zwykle niekorzystnie wpływa na stabilność (lub nie wykazuje żadnego efektu) modyfikowanych dupleksów, podczas gdy wprowadzenie poliamin na końcach 3' i 5' oligonukleotydów powoduje wzrost stabilności termicznej takich dupleksów. Jedynym wyjątkiem, w którym wprowadzenie cyklenu spowodowało zauważalną stabilizację ($\Delta T_m = +1,0$ °C), był dupleks **DU28**. W przypadku tego dupleksu występuje pojedyncze niedopasowanie zasad TT (lub UT) w tym samym miejscu, w którym znajduje się modyfikacja U^c. Możemy przypuszczać, że niedopasowanie TT w tym obszarze struktury DNA powoduje powstanie luki, co umożliwia oddziaływanie cyklenu z tyminą, które mogą utworzyć sparowany, trzeciorzędowy kompleks. Wyniki innych badań oraz szczegółowy opis oddziaływań w kompleksie cyklenu z tyminą zostały przedstawione w przeglądowej pracy **P.6**.

3.7. Ocena aktywności biologicznej otrzymanych związków

3.7.1. Aktywność biologiczna ω -hydroksyloalkilo-1,8-naftalimidów

Badania nad aktywnością biologiczną rozpocząłem od analizy wpływu podstawników w strukturze 1,8-naftalimidu na jego właściwości antyproliferacyjne. Szczegółowe wyniki tych badań zostały opisane w pracy **P.2**. **Tabela 2** przedstawia podsumowanie aktywności antyproliferacyjnej na dwóch liniach komórek nowotworowych oraz jednej linii komórek prawidłowych. Z tabeli wynika, że pochodne o tych

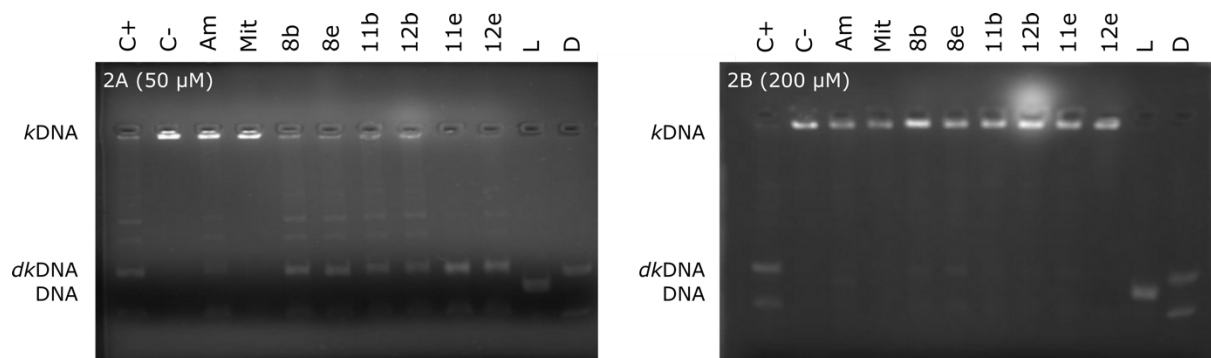
Tabela 2. Podsumowanie wyników badań aktywności antyproliferacyjnej wybranych pochodnych 1,8-naftalimidu przeciwko ludzkim komórkom nowotworowym jelita grubego HCT 116, komórkom nowotworu płuc A549 oraz prawidłowym komórkom nabłonka oskrzelowego BEAS-2B.

Struktura grupy pochodnych	HCT 116 wt IC ₅₀ (μM)	A549 IC ₅₀ (μM)	BEAS-2B IC ₅₀ (μM)
 6a-e	2,9–6,7	3,8–9,8	1,4–8,3
 8a-e	0,5–2,3	2,2–3,5	0,8–2,5
 9a-e^a	39,5–65,4 (9e : 50)	>100	>50 (9b : 52,6)
 10a-e^a	29,0–46,9 (10a-b : >50)	55,8–91,7 (10a-b : >50)	55,5–103,4 (10a-b : >50)
 11a-e	1,1–2,1	1,1–2,4	1,0–2,1
 12a-e^a	>100 (12b : 64,3)	>100 (12b : 64,1)	>100 (12b : 44,3)

a – Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność (<50 μM) dla pochodnych **9d-e**, **10a-b**, **12a** i **12c-e** nie udało się wyznaczyć wartości IC₅₀.

samych podstawników w pierścieniu naftalenowym, ale różnej długości łańcuchach ω-hydroksyloalkilowych, wykazują bardzo zbliżoną aktywność antyproliferacyjną, mieszczącą się w tym samym rzędzie wielkości. Długość podstawników ω-hydroksyloalkilowych nie jest więc głównym czynnikiem decydującym o aktywności antyproliferacyjnej. Jednakże rodzaj i ilość grup wprowadzonych do pierścienia naftaleno-ego mają istotne znaczenie. Łatwo zauważyć, że pochodne zawierające co najmniej jedną grupę nitrową (**6a-e**, **8a-e**, **11a-e**) wykazują znacznie większą aktywność w porównaniu do pochodnych zawierających grupy aminowe (**9a-e**) oraz pochodnych zawierających wyłącznie grupy ω-hydroksyloalkilowe (**10a-e**, **12a-e**).

Wcześniejsze badania wykazały, że Amonafid i Mitonafid są silnymi inhibitarami topo II [78–81]. Ze względu na mechanizm działania, inhibitory topo II można podzielić na dwie grupy: „trucizny topoisomerazy” (np. etopozyd, mitoksantron, NK-



Rys. 31. Dekatenację kDNA oceniano poprzez monitorowanie pojawiania się zdekatenuowanego dkDNA w obecności badanych związków w różnych stężeniach. "C+" oznacza kDNA w obecności topo II jako kontrolę pozytywną, "C-" oznacza kDNA w nieobecności topo II jako kontrolę negatywną, "Am" oznacza Amonafid, "Mit" oznacza Mitonafid, "L" oznacza marker liniowej formy DNA, a "D" oznacza marker zdekatenuowanej formy dkDNA. (po lewej) Hamowanie dekatenuacji kDNA za pośrednictwem topo II przez badane związki w stężeniu 50 µM lub (po prawej) w stężeniu 200 µM.

314) oraz inhibitory katalizy topoizomerazy (np. MST-16) [91, 92]. "Trucizny topoizomerazy" powodują stabilizację trzeciorzędowych kompleksów topo II:DNA prowadzących do podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs). W przypadku inhibitorów katalizy topoizomeraz, obserwuje się podobny efekt, ale dopiero po dłuższej ekspozycji na te związki [93]. Inhibitory katalizy topoizomeraz stanowią grupę związków o zróżnicowanej strukturze, a ich mechanizm działania opiera się na interkalacji do DNA i oddziaływaniu z topoizomerazą w różnych etapach cyklu katalitycznego [91].

Na podstawie badań przeprowadzonych w ramach pracy **P.2**, oceniłem zdolność wybranych pochodnych 1,8-naftalimidu (**8b**, **8e**, **11b**, **11e**, **12b** i **12e**), które posiadają cechy strukturalne Amonafidu i Mitonafidu, do hamowania aktywności topo II. Wyniki tych badań zostały przedstawione na **Rys. 31** (**Rys. 2** w **P.2**). Wynika z niego, że przy stężeniu 50 µM badane związki nie wykazywały zdolności do hamowania topo II. Jednak przy zwiększeniu stężenia tych związków do 200 µM zaobserwowano pełne zahamowanie aktywności topoizomerazy II, ale nie stwierdzono obecności podwójnych pęknięć DNA. Na podstawie tych obserwacji można wnioskować, że otrzymane związki należą do grupy słabych inhibitorów katalizy topo II.

3.7.2. Aktywność biologiczna koniugatów interkalator-makrocykli

Metodologia i wyniki badań dotyczących aktywności biologicznej koniugatów interkalatorów i makrocykli otrzymanych poprzez sprzężanie za pomocą metody click chemisty zostały szczegółowo opisane w pracy **P.4**. Badania rozpoczęto od oceny cytotoksyczności wszystkich końcowych koniugatów wobec panelu trzech linii komórek nowotworowych i czterech linii prawidłowych. W niniejszej pracy wyniki tych badań zostały podsumowane w **Tabeli 3**. Ze względu na brak istotnych różnic w aktywności

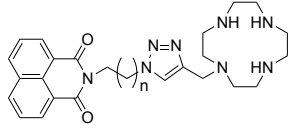
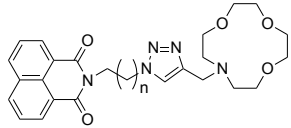
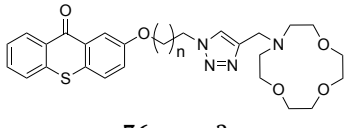


koniugatów w zależności od badanych linii komórkowych, wyniki tych badań przedstawiłem w formie zakresu aktywności wobec panelu komórek nowotworowych lub prawidłowych, bez szczegółowego wskazywania linii komórkowych. Pełne i szczegółowe wyniki tych badań zostały przedstawione na **Rys. 6** w **P.4.** oraz podsumowane w **Tabeli 1** w **P.4.**

Jak już zauważyłem, określone koniugaty wykazywały podobną aktywność wobec różnych linii wśród danego panelu komórkowego, a nawet podobną aktywność między panelem nowotworowym i prawidłowym. Pierwszym wnioskiem, który można wyciągnąć, jest zatem brak wyraźnej selektywności otrzymanych koniugatów wobec komórek nowotworowych. Jednak w przeciwieństwie do omówionych w poprzednim rozdziale pochodnych ω -hydroksyloalkilo-1,8-naftalimidowych, aktywność cytotoksyczna koniugatów interkalator-makrocycli wyraźnie zależy od długości wprowadzonego łańcucha alkilowego pełniącego rolę łącznika między tymi dwoma ugrupowaniami.

Drugim wnioskiem, który wynika z analizy wyników z **Tabeli 3**, jest zauważalny wzrost aktywności cytotoksycznej wraz ze wzrostem długości łącznika alkilowego. Efekt ten jest szczególnie widoczny dla koniugatów 1-aza-12-korony-4, **33a-c** (**Rys. 29**) i **36a-c** (**Rys. 25**). Pochodna **33a**, charakteryzująca się najkrótszym – etylenowym łącznikiem, praktycznie nie wykazywała aktywności cytotoksycznej wobec badanych linii komórkowych ($IC_{50} > 500 \mu M$). Natomiast wydłużenie łącznika do butylenowego w **33b** i heksylenowego w **33c** spowodowało pojawienie się umiarkowanej aktywności cytotoksycznej. Choć różnica w aktywnościach nie jest duża, można również zauważyć, że pochodne z łącznikiem heksylenowym są nieco bardziej aktywne od pochodnych z łącznikiem butylenowym. Analogiczna zależność ma miejsce w przypadku koniugatów tioksantonu, **36a-c**.

Kolejnym wnioskiem jest znacznie wyższa aktywność koniugatów tioksantonu i 1-aza-12-korony-4, **36a-c** w porównaniu do analogicznych koniugatów 1,8-naftalimidu, **33a-c**. Wyraźny wpływ rodzaju interkalatora na aktywność cytotoksyczną jest obserwowany w obu panelach komórkowych. Oprócz rodzaju interkalatora, duży wpływ na aktywność cytotoksyczną ma również rodzaj skoniugowanego makrocyclu. Koniugaty 1,8-naftalimidu i cyklenu, **35a-c**, zwłaszcza pochodne z łącznikiem etylenowym i butylenowym, wykazują znikomą aktywność cytotoksyczną ($IC_{50} > 500 \mu M$). Jedynie pochodna **35c** z łącznikiem heksylenowym osiągała $IC_{50} < 500 \mu M$ wobec niektórych linii komórkowych, jednak w porównaniu do analogicznego koniugatu 1-aza-12-korony-4, **33c**, była 3 do 5-krotnie mniej aktywna. W pracy **P.4**, bazując na doniesieniach z literatury, argumentuje się te różnice w cytotoksyczności między koniugatami cyklenu i 1-aza-korony-4 jako wynikające z różnicy w zdolności tych dwóch grup

Tabela 3. Aktywności antyproliferacyjna wybranych koniugatów przeciwko komórkom prawidłowym: Vero (małpie komórki nerki), LLC-MK2 (nerka małpy), NCTC 929 (mysie fibroblasty), MRC-5 (fibroblasty ludzkie); oraz komórkom nowotworowym: HeLa (komórki raka szyjki macicy), A549 (ludzki niedrobnokomórkowy rak płuc), HepG2 (ludzki rak wątroby).

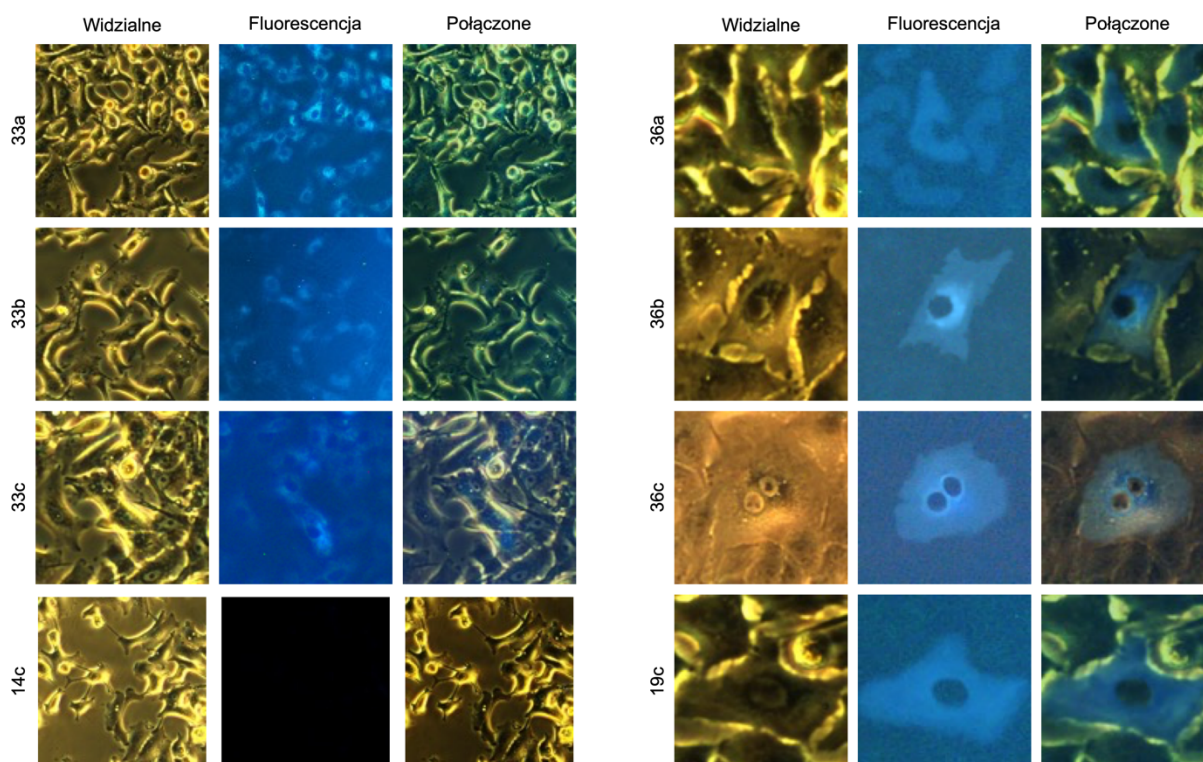
Struktura grupy pochodnych	Panel komórek nowotworowych IC ₅₀ (μM)	Panel komórek prawidłowych IC ₅₀ (μM)
 <p>35a: n = 2 35b: n = 4 35c: n = 6</p>	<p>35a: >500 35b: >500 35c: 162,9–416,8^a</p>	<p>35a: >500 35b: >500 35c: 156,7–269,2^a</p>
 <p>33a: n = 2 33b: n = 4 33c: n = 6</p>	<p>33a: >500^b 33b: 54,8–195,1 33c: 47,9–69,7</p>	<p>33a: >500 33b: 120,2–202,8 33c: 63,4–121,5</p>
 <p>36a: n = 2 36b: n = 4 36c: n = 6</p>	<p>36a: 72,8–162,0 36b: 6,91–19,2 36c: 7,15–13,6</p>	<p>33a: 91,0–179,5 33b: 11,76–42,7 33c: 1,36–10,5</p>
 <p>26</p>	63,5–159,1	42,6–123,8
 <p>27</p>	>500	>500

a – Pochodna **35c** nie była aktywna (IC₅₀ > 500 μM) wobec linii LLC-MK2 i A549. *b* – Pochodna **33a** była aktywna (IC₅₀ = 244,4 μM) jedynie wobec linii Vero.

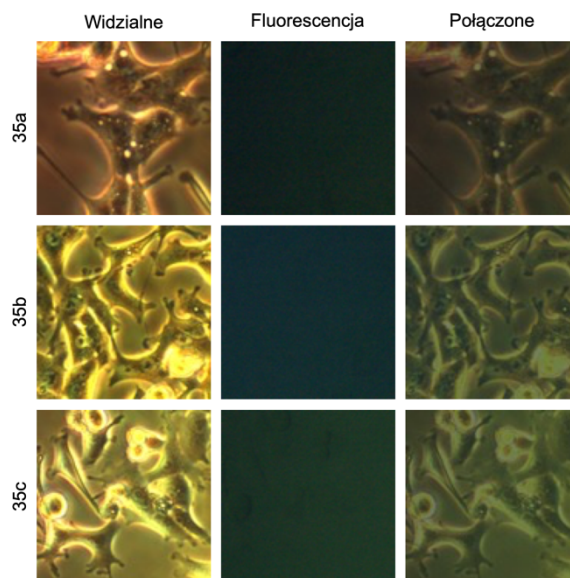
makrocykli do przekraczania błony komórkowej. W warunkach fizjologicznych (pH 7.4), cyklen występuje w formie sprotonowanej (Elog P = -2.62, Clog P = -0.85), co stanowi jeden z powodów jego ograniczonej zdolności do przekraczania błony komórkowej, podczas gdy 1-aza-12-korona-4 charakteryzuje się Clog P = 0.11.

Aby potwierdzić te przypuszczenia, w kolejnym etapie badań skorzystałem z faktu, że koniugaty obydwu interkalatorów wykazują silne właściwości fluorescencyjne, umożliwiające obserwację ich wchłaniania i lokalizacji wewnątrzkomórkowej.

Właściwości spektroskopowe badanych koniugatów również zostały opisane w pracy **P.4**. Wyniki badań z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego zostały przedstawione w postaci fotomikrografii na **Rys. 32** (**Rys. 4** w **P.4**) i **Rys. 33** (**Rys. 5** w **P.4**). W przypadku koniugatów **35a–c** zaobserwowano praktycznie brak wchłaniania komórkowego, o czym świadczy brak fluorescencji komórek po usunięciu medium hodowlanego. Z kolei inkubacja komórek z koniugatami 1-aza-12-korony-4, **33a–c** i **36a–c** prowadzi do wyraźnej fluorescencji komórek po usunięciu medium hodowlanego. Nie zaobserwowano jednak zdolności tych związków do lokalizacji w specyficznych organelach komórkowych. Przeprowadziłem również porównanie wpływu koniugacji makrocycłu na wchłanianie komórkowe cząsteczek 1,8-naftalimidu i tioksantonu, posiadających sam łańcuch heksylenowy, odpowiednio **14c** i **19c**. Z fotografii przedstawionych na **Rys. 32** wynika, że pochodna 1,8-naftalimidu **14c** nie jest wchłaniana przez komórki, podczas gdy pochodna tioksantonu **19c** jest wchłaniana przez komórki i równomiernie dystrybuowana w cytozolu. Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że koniugacja poliaromatycznych barwników z cykliczną poliaminą, w tym przypadku cyklenem, prowadzi do poważnego ograniczenia lub całkowitego braku wchłaniania komórkowego otrzymanych koniugatów, podczas gdy koniu-



Rys. 32. Przykładowe fotografie komórek A549 inkubowanych z: (po lewej) **33a–c** i **14c**, (po prawej) **33a–c** i **19c** w stężeniu $10\ \mu\text{M}$ przez 2 godz. Lewy panel pokazuje obrazy pola widzanego pod mikroskopem, środkowy panel pokazuje fluorescencję widzianą pod mikroskopem, a prawy panel pokazuje połączone obrazy wszystkich kanałów na tych samych komórkach. Komórki analizowano za pomocą odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego przy powiększeniu $150\times$.



Rys. 33. Przykładowe fotografie komórek A549 inkubowanych z **35a–c** i **14c** w stężeniu $10\ \mu\text{M}$ przez 2 godz. Lewy panel pokazuje obrazy pola widzianego pod mikroskopem, środkowy panel pokazuje fluorescencję widzianą pod mikroskopem, a prawy panel pokazuje połączone obrazy wszystkich kanałów na tych samych komórkach. Komórki analizowano za pomocą odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego przy powiększeniu $150\times$.

gacja z eterami koronowymi (lub ich aminowymi pochodnymi, takimi jak 1-aza-12-korona-4) prowadzi do poprawy zdolności koniugatów do przedostawania się do wnętrza komórki. Taka strategia może zostać zastosowana w celu zwiększenia wchłaniania koniugatów barwników organicznych oraz cząsteczek leków przez komórki.

Kolejną cechą badanych koniugatów (oraz układu macierzystego **19c**) jest brak ich lokalizacji w jądrze komórkowym, gdzie znajduje się większość materiału genetycznego komórki. Z opisanego w pracy **P.4** przeglądu literatury wynika, że chromofory posiadające zdolność oddziaływania z DNA, np. poprzez interkalację, preferencyjnie gromadzą się w jądrze komórkowym, co można łatwo zaobserwować za pomocą mikroskopii konfokalnej. Zatem brak lokalizacji koniugatów **33a–c** i **36a–c** w jądrze komórkowym może świadczyć o braku oddziaływania z DNA. Aby potwierdzić te przypuszczenia, przeprowadziłem serię badań mających na celu określenie zdolności koniugatów 1-aza-12-korony-4 oraz ich układów macierzystych, **14c** i **19c**, do interkalacji. Wyniki tych badań przedstawione są na **Rys. 33** (**Rys. 5** w **P.4**). Z tych badań wynika, że żaden z koniugatów 1-aza-12-korony-4 nie posiada zdolności do termicznej stabilizacji CT-DNA (czyli zwiększenia jego T_m), nie powoduje zmian w widmach dichroizmu kołowego CT-DNA, oraz nie prowadzi do wzrostu lepkości CT-DNA. Takie wyniki świadczą o braku zdolności badanych koniugatów do interkalacji do CT-DNA. W przeciwieństwie do badanych koniugatów, ich układy macierzyste, **14c** i **19c**, powodowały charakterystyczne zmiany w widmie CD, które świadczą o interkalacji z CT-DNA. Wnioskiem, jaki można wyciągnąć z tych badań, jest ograniczenie zdolności

koniugatów 1,8-naftalimidu i tioksantonu do interkalacji spowodowane przyłączeniem do nich cząsteczki 1-aza-12-korony-4.

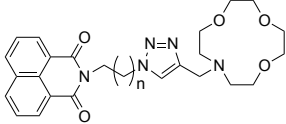
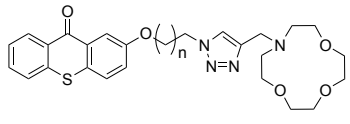
W ramach pracy **P.4** podjąłem również próbę wyjaśnienia możliwych przyczyn różnicy w cytotoksyczności pomiędzy koniugatami 1,8-naftalimidu **33a–c** a koniugatami tioksantonu **36a–c**. Mając na uwadze, że pochodne tioksantonu mają zdolność do generowania reaktywnych form tlenu (ROS) pod wpływem naświetlania, przeprowadziłem badania mające na celu określenie różnicy w cytotoksyczności otrzymanych koniugatów wobec komórek linii A549 w warunkach bez naświetlania (tzw. warunki ciemne) i po naświetleniu diodami LED (tzw. warunki jasne). Na podstawie badań spektroskopowych przedstawionych na **Rys. 2** w **P.4** ustaliłem, że maksimum wzbudzenia dla koniugatów 1,8-naftalimidu (**33a–c**) wynosi 350 nm, a dla koniugatów tioksantonu (**36a–c**) 410 nm. Dostępne urządzenia do naświetlania płytek 96-dołkowych umożliwiały zastosowanie światła LED o długości fali 340 i 400 nm, a więc bardzo zbliżonego do wartości optymalnych. Warto zaznaczyć, że długość łącznika między cząsteczkami chromoforu a makrocyklem nie miała wpływu na położenie maksimum wzbudzenia i emisji. Pełne i szczegółowe wyniki badań dotyczących cytotoksyczności w zależności od warunków naświetlania przedstawione są na **Rys. 7** w **P.4**, a podsumowanie znajduje się w **Tabeli 2** w **P.4**. Z tych badań wynika, że koniugaty 1,8-naftalimidu nie wykazują istotnych różnic w cytotoksyczności w warunkach ciemnych i jasnych. Natomiast aktywność cytotoksyczna koniugatów tioksantonu ulega zmianie pod wpływem naświetlania komórek w obecności badanych związków, prowadząc do zauważalnego obniżenia wartości IC_{50} , nawet przy stosunkowo małych dawkach energii świetlnej (20 J/cm^2).

Chociaż duży poziom reaktywnych form tlenu (ROS) może prowadzić do uszkodzeń wielu różnych struktur i organelli komórkowych, to jednym z najbardziej wrażliwych i narażonych miejsc na takie uszkodzenia jest materiał genetyczny znajdujący się w jądrze komórki. Cząsteczki ROS, takie jak rodniki hydroksylowe ($\bullet\text{OH}$), są zdolne do dyfuzji na krótki dystans do jądra komórkowego i powodowania uszkodzeń DNA [98]. W ramach pracy **P.4** przeprowadziłem porównanie poziomu dwóch rodzajów uszkodzeń DNA - pojedynczych (SSBs) i podwójnych (DSBs) pęknięć nici DNA w komórkach linii A549 poddanych działaniu koniugatów 1-aza-12-korony-4, **33a–c** i **36a–c**, oraz różnym warunkom hodowli – bez naświetlania i z naświetlaniem. Do badań techniką FHA (*ang.* fast halo assay) wykorzystałem materiał biologiczny pochodzący z badań cytotoksyczności w warunkach ciemnych i jasnych, opisanych w tej samej pracy. Eksperyment FHA to technika stosowana w biologii komórkowej do oceny uszkodzeń DNA w pojedynczych komórkach. Metoda ta pozwala na szybkie i precyzyjne określenie stopnia uszkodzenia DNA poprzez analizę tworzenia tzw. "halo" wokół jądra komórkowego. Szczegółowy opis metodologii tego eksperymentu

znajduje się w pracy **P.4**. Wyniki eksperymentu zostały przedstawione w **Tabeli 2** w **P.4**, oraz w **Tabeli 4** w niniejszej pracy; reprezentatywne zdjęcia uszkodzeń DNA znajdują się w suplemencie do **P.4** (**Rys. S67–84**).

Pierwszym wnioskiem, który można wyciągnąć po zapoznaniu się z wynikami z **Tabeli 4**, jest znaczna różnica w całkowitym poziomie uszkodzeń DNA (suma) spowodowanych przez koniugaty 1,8-naftalimidu (**33a–c**) w porównaniu do koniugatów tioksantonu (**36a–c**). Inkubacja komórek z koniugatami **33a–c** spowodowała wzrost uszkodzeń DNA o około 30–70%, przy czym nie zaobserwowano dodatkowego wzrostu poziomu uszkodzeń DNA po naświetleniu komórek. W porównaniu do koniugatów z 1-aza-12-koroną-4, macierzysty układ **14c** nie powodował zauważalnego wzrostu uszkodzeń DNA, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami na mikroskopie konfokalnym dotyczącymi braku wchłaniania tego związku przez komórki.

Tabela 4. Podsumowanie wyników badań cytotoksyczności w warunkach ciemnych i jasnych.

Struktura grupy pochodnych	Uszkodzenia DNA (NDF)						
	Warunki ciemne			Warunki jasne			
	DSBs	SSBs	Suma	DSBs	SSBs	Suma	
 33a: n = 2 33b: n = 4 33c: n = 6 14c: n = 6 Ctrl: n = 6	33a:	1,30	0,32	1,64	1,24	0,48	1,72
	33b:	1,20	0,19	1,39	1,29	0,25	1,54
	33c:	1,54	0,01	1,55	1,39	0,14	1,53
	14c:	1,10	0,10	1,20	1,10	0,01	1,11
	Ctrl:	1,00	0,10	1,10	1,02	0,08	1,10
 36a: n = 2 36b: n = 4 36c: n = 6 19c: n = 6 Ctrl: n = 6	36a:	2,48	2,50	4,98	2,95	3,02	5,98
	36b:	2,52	1,43	3,95	2,93	2,58	5,51
	36c:	3,52	2,40	5,92	4,51	3,46	7,97
	19c:	1,52	1,41	2,94	1,51	2,01	3,52
	Ctrl:	1,15	0,13	1,02	1,15	0,03	1,19

Komórki inkubowano z badanymi związkami w ciemności przez 2 godz., następnie poddano naświetleniu diodami LED o odpowiedniej długości fali przez czas potrzebny do dostarczenia energii 20 J/cm². Dla związków **33a–c** i **14c** użyto długości fali 340 nm, dla związków **36a–c** i **19c** użyto długości fali 400 nm. Następnie komórki były dalej inkubowane w ciemności przez 46 godz. **Ctrl** – kontrola, komórki hodowane bez podania związków.

Inkubacja komórek z koniugatami tioksantonu, **36a–c**, w warunkach ciemnych spowodowała nawet 5-krotny wzrost poziomu uszkodzeń DNA. Po naświetleniu komórek poziom uszkodzeń wzrósł jeszcze bardziej, osiągając prawie 8-krotną wartość kontroli. Oprócz wzrostu poziomu podwójnych pęknięć DNA, zaobserwowano przede wszystkim duży wzrost pojedynczych pęknięć DNA, świadczący o uszkodzeniach

spowodowanych obecnością ROS. Naświetlenie komórek również spowodowało głównie wzrost uszkodzeń typu SSB, natomiast poziom DSBs pozostał prawie niezmienny, co dodatkowo potwierdza przypuszczenia, że fotoindukowane generowanie ROS jest główną przyczyną zwiększonego poziomu uszkodzeń DNA przez koniugaty tioksantonu.

4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W ramach mojej pracy doktorskiej skoncentrowałem się na syntezie i badaniu właściwości biologicznych dwóch klas związków: interkalatorów DNA (pochodnych 1,8-naftalimidu i tioksantonu) oraz makrocykli (pochodnych cyklenu i 1-aza-12-korony-4). Przeprowadziłem odpowiednie syntezy chemiczne, dzięki którym otrzymałem kilka zróżnicowanych serii małowymiarowych pochodnych tych dwóch grup związków, a także ich koniugatów z większymi biocząsteczkami, takimi jak oligonukleotydy. Dodatkowo, przeprowadziłem syntezy polegające na połączeniu obu grup związków poprzez łańcuchy alkilowe o różnej długości. Wszystkie opisane w niniejszej pracy związki zostały po raz pierwszy otrzymane i poddane wstępnej analizie pod kątem ich właściwości biologicznych.

Motywacją przewodnią wszystkich przeprowadzonych eksperymentów było zbadanie wpływu modyfikacji i koniugacji małowymiarowych związków chemicznych na ich zdolność do oddziaływania z DNA poprzez interkalację oraz na ich właściwości biologiczne, takie jak aktywność antyproliferacyjna, wchłanianie i lokalizacja wewnątrzkomórkowa. Ważnym aspektem mojej pracy doktorskiej są również dwie obszerne prace przeglądowe, w których dokładnie omówiłem zagadnienia związane z aktywnością biologiczną dwóch grup związków pojawiających się w niniejszej pracy: pochodnych 1,8-naftalimidu (**P.5**) i cyklenu (**P.6**).

Na podstawie przeprowadzonych badań, można wyciągnąć następujące ogólne wnioski dotyczące wpływu modyfikacji struktury na właściwości otrzymywanych związków:

1. Z prac **P.2** i **P.4** wynika, że istotny wpływ na zwiększenie aktywności antyproliferacyjnej pochodnych 1,8-naftalimidu ma wprowadzenie grupy nitrowej do pierścienia naftalenowego. Natomiast wprowadzenie podstawników ω -hydroksyalkilowych (zarówno w pierścieniu naftalenowym, jak i pozycji imidowej) nie powoduje znaczących zmian w aktywności antyproliferacyjnej. Długość wprowadzonych podstawników ω -hydroksyalkilowych również nie wykazuje istotnego wpływu na aktywność antyproliferacyjną. Natomiast obecność grupy aminowej w

pierścieniu naftalenu prowadzi do znacznego spadku aktywności antyproliferacyjnej.

2. Z pracy **P.4** wynika również, że samo przyłączenie łańcucha alifatycznego (np. heksylowego) do cząsteczki interkalatora nie gwarantuje znaczącej poprawy jego wchłaniania przez komórki (zobacz wyniki dla **14c**). Natomiast koniugacja z odpowiednią cząsteczką, posiadającą zdolność do penetracji błony komórkowej, może znacząco wspomóc transport koniugatów do wnętrza komórki. Badania wykazały, że do tego celu można wykorzystać koniugację z eterami koronowymi lub ich bliskimi analogami, takimi jak 1-aza-12-korona-4. Do tego celu nie nadają się natomiast cykliczne poliaminy takie jak cyklen, których przyłączenie do cząsteczki interkalatora ogranicza (lub całkowicie hamuje) jego wchłanianie komórkowe.
3. Badanie przedstawione w pracy **P.4** wykazały również, że koniugacja obu grup interkalatorów z cyklenem i 1-aza-12-koroną-4 pozbawia otrzymane koniugaty zdolności do interkalacji do DNA. Efekt ten widoczny jest nie tylko w badaniach z użyciem DNA, ale również na poziomie komórkowym – poprzez brak lokalizacji otrzymanych koniugatów w jądrze komórkowym.
4. Dodatkowym potwierdzeniem destabilizującego efektu cyklenu na oddziaływanie jego koniugatów z DNA są wyniki badań nad hybrydyzacją kowalencyjnie modyfikowanych oligonukleotydów przedstawione w pracy **P.3**. Przyłączenie jednej cząsteczki cyklenu do pozycji 2' powodowało spadek T_m dupleksu o średnio 4,5 °C. Wyjątkiem były sekwencje, w których w miejscu wprowadzenia cyklenu występowało niedopasowanie zasad typu TT, w takich przypadkach dochodziło do niewielkiej stabilizacji dupleksu ($\Delta T_m = +1,0$ °C). Prawdopodobną przyczyną obserwowanego efektu stabilizującego jest zdolność cyklenu do tworzenia selektywnych drugorzędowych kompleksów z tyminą poprzez komplementarne pary wiązań wodorowych. Podstawy tego efektu zostały opisane szerzej w pracy przeglądowej **P.6**. Z kolei kowalencyjne przyłączenie 1,8-naftalimidu i tioksantonu do pozycji 2' prowadziło do stabilizacji dupleksu w wyniku interkalacji wprowadzonych cząsteczek.
5. Wyniki badań opisanych w **P.4** wskazują również na istotny wpływ rodzaju interkalatora na aktywność biologiczną otrzymanych koniugatów. Koniugaty oparte na 1,8-naftalimidach nie wykazują zdolności do generowania uszkodzeń DNA w reakcji na działanie światła o odpowiedniej

długości fali. Ze względu na ich stabilność i silną fluorescencję, są one obiecującymi barwnikami mogącymi znaleźć zastosowanie w sondach molekularnych o potencjalnych zastosowaniach diagnostycznych. Z kolei koniugaty tioksantonu wykazują zdolność do fotoindukowanego uszkodzenia DNA, dzięki czemu mogą znaleźć zastosowanie w terapii fotodynamicznej.

Wyniki moich badań, zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej, mają szeroki zakres zastosowań w dziedzinie chemii organicznej i medycznej, szczególnie w opracowywaniu nowych strategii w zwalczaniu chorób nowotworowych i genetycznych. Oprócz szczegółowego opisu metod syntezy, modyfikacji i izolacji nowych związków chemicznych i oligonukleotydów, moje badania przyczyniły się do lepszego zrozumienia wpływu koniugacji na właściwości biologiczne badanych grup związków. Szczegółowy opis syntez i właściwości biologicznych otrzymanych związków stanowi wartościową podstawę dla dalszych badań prowadzonych przez innych naukowców i zespoły badawcze.

Wyniki moich badań mogą również znaleźć zastosowanie w opracowywaniu selektywnie działających sond molekularnych poprzez wprowadzanie nowych modyfikacji DNA. Dodatkowo, wyniki mojej pracy mogą być użyteczne w opracowywaniu strategii poprawy wchłaniania cząsteczek leków i sond molekularnych przez komórki, poprzez ich koniugację z cząsteczkami 1-aza-12-korona-4, bądź ograniczenie wchłaniania koniugatów przez komórki za pomocą koniugacji z cząsteczkami cyklenu. Reasumując, przeprowadzony cykl badań dowodzi, że strategia koniugacji małowcząsteczkowych związków organicznych daje duże możliwości modyfikacji ich właściwości biologicznych i właściwości większych biocząsteczek, takich jak DNA.

5. LITERATURA

- [1] M. Hansen, L. Hurley, Altromycin B threads the DNA helix interacting with both the major and the minor grooves to position itself for site-directed alkylation of guanine N7, *J. Am. Chem. Soc.*, tom 117, nr 9, str. 2421–2429, 1995.
- [2] D. Sun, M. Hansen, J. J. Clement, L. H. Hurley, Structure of the altromycin B (N7-guanine)-DNA adduct. A proposed prototypic DNA adduct structure for the pluramycin antitumor antibiotics, *Biochem.*, tom 32, nr 32, str. 8068–8074, 1993.
- [3] P. H. Bolton, D. R. Kearns, Spectroscopic properties of ethidium monoazide: a fluorescent photoaffinity label for nucleic acids, *Nucleic Acids Res.*, tom 5, nr 12, str. 4891–4903, 1978.
- [4] P. B. Dervan, Molecular recognition of DNA by small molecules, *Bioorg. Med. Chem.*, tom 9, nr 9, str. 2215–2235, 2001.

- [5] L. Lerman, Structural considerations in the interactions of DNA and acridines, *J. Mol. Biol.*, tom 3, str. 18–30, 1961.
- [6] A. C. Ketrone, W. A. Denny, D. E. Graves, N. Osheroff, Amsacrine as a topoisomerase II poison: Importance of drug–DNA interactions, *Biochem.*, tom 51, nr 8, str. 1730–1739, 2012.
- [7] T. D. Shenkenberg, D. D. Von Hoff, Mitoxantrone: A new anticancer drug with significant clinical activity, *Ann. Intern. Med.*, tom 105, nr 1, str. 67–81, 1986.
- [8] M. Hossain, G. S. Kumar, DNA intercalation of methylene blue and quinacrine: New insights into base and sequence specificity from structural and thermodynamic studies with polynucleotides, *J. Mol. BioSyst.*, tom 5, nr 11, str. 1311–1322, 2009.
- [9] L. J. Boerner, J. M. Zaleski, Metal complex–DNA interactions: From transcription inhibition to photoactivated cleavage, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, tom 9, nr 2, str. 135–144, 2005.
- [10] E. Raymond, S. J. Faivre, J. M. Woynarowski, S. G. Chaney, Oxaliplatin: Mechanism of action and antineoplastic activity, *Semin. Oncol.*, tom 25, nr 2, str. 4–12, 1988.
- [11] U. Śliwińska-Hill, M. Szumęłda, Biologiczne podstawy terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem leków platynowych. Oddziaływanie z cytochromem c, *Nowotwory Journal of Oncology*, tom 66, str. 136–150, 2016.
- [12] S. Altmann, K. Choroba, M. Skonieczna, D. Zygadło, M. Raczyńska-Szajgin, A. Maroń, J. G. Małecki, A. Szłapa-Kula, M. Tomczyk, A. Ratuszna, B. Machura, A. Szurko, Platinum(II) coordination compounds with 4'-pyridyl functionalized 2,2':6',2''-terpyridines as an alternative to enhanced chemotherapy efficacy and reduced side-effects, *J. Inorg. Biochem.*, tom 201, str. 110809–110826, 2019.
- [13] P. Zamecnik, M. Stephenson, Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, tom 75, str. 280–284, 1978.
- [14] C. Dass, E. Saravolac, Y. Li, L. Sun, Cellular uptake, distribution, and stability of 10–23 deoxyribozymes, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, tom 12, str. 289–299, 2002.
- [15] J. Ortigao, H. Rosch, M. Montenarh, A. Frohlich, H. Seliger, Oligonucleotide analogs with terminal 3',3'-and 5',5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral replication., *Antisense Res. Dev.*, tom 1, nr 4, str. 380, 1991.
- [16] E. Ng, D. Shima, P. Calias, E. J. Cunningham, D. Guyer, A. Adamis, Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease, *Nat. Rev. Drug Discov.*, tom 5, str. 123–132, 2006.
- [17] V. B. Pinheiro, A. I. Taylor, C. Cozens, M. Abramov, M. Renders, S. Zhang, J. C. Chaput, J. Wengel, S.-Y. Peak-Chew, S. H. Mclaughlin, P. Herdewijn, P. Holliger, Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution, *Science*, tom 336, nr 6079, p. 341–344., 2012.

- [18] M. Dellafiore, J. Montserrat, A. Iribarren, Modified nucleoside triphosphates for in vitro selection techniques, *Front. Chem.*, tom 4, str. 18, 2016.
- [19] A. Friedman, D. Kim, R. Li, Highly stable aptamers selected from a 20-fully modified fGmH RNA library for targeting biomaterials, *Biomater.*, tom 36, str. 110–123, 2015.
- [20] M. Petersen, C. B. Nielsen, K. E. Nielsen, G. A. Jensen, K. Bondensgaard, S. K. Singh, V. K. Rajwanshi, A. A. Koshkin, B. M. Dahl, J. Wengel, J. P. Jacobsen, The conformations of locked nucleic acids (LNA), *J. Mol. Recogn.*, tom 13, nr 1, str. 44–53, 2000.
- [21] E. Ereemeeva, A. Fikatas, L. Margamuljana, M. Abramov, D. Schols, E. Groaz, P. Herdewijn, Highly stable hexitol based XNA aptamers targeting the vascular endothelial growth factor, *Nucleic Acids Res.*, tom 47, nr 10, str. 4927–4939, 2019.
- [22] V. Sharma, R. Sharma, S. Singh, Antisense oligonucleotides: Modifications and clinical trials, *Med. Chem. Commun.*, tom 5, nr 10, str. 1454–1471, 2014.
- [23] A. Varizhuk, D. Kaluzhny, R. Novikov, A. Chizhov, I. Smirnov, A. Chuvilin, O. Tatarinova, G. Fisunov, G. Pozmogova, V. Florentiev, Synthesis of triazole-linked oligonucleotides with high affinity to DNA complements and an analysis of their compatibility with biosystems, *J. Org. Chem.*, tom 78, nr 12, str. 5964–5969, 2013.
- [24] S. Wolk, R. Shoemaker, W. Mayfield, A. Mestdagh, N. Janjic, Influence of 5-N-carboxamide modifications on the thermodynamic stability of oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.*, tom 43, nr 19, str. 9107–9122, 2015.
- [25] C. Buhr, R. Wagner, D. Grant, B. Froehler, Oligodeoxynucleotides containing C-7 propyne analogs of 7-deaza-20-deoxyguanosine and 7-deaza-20-deoxyadenosine, *Nucleic Acids Res.*, tom 24, nr 15, str. 2974–2980, 1996.
- [26] M. Kimoto, I. Hirao, Unique thermal stability of unnatural hydrophobic Ds bases in double-stranded DNAs, *ACS Synth. Biol.*, tom 6, nr 10, p. 1944–1951, 2017.
- [27] P. Sheng, Z. Yang, Y. Kim, Y. Wu, W. Tan i S. Benner, Design of a novel molecular beacon: Modification of the stem with artificially genetic alphabet, *Chem. Commun.*, tom 41, str. 5128–5130, 2008.
- [28] J. Ruckman, L. S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W. L. Gillette, D. D. Henninger, L. Claesson-Welsh, N. Janjic, 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165): Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain, *J. Biol. Chem.*, tom 273, nr 32, str. 20556–20567, 1998.
- [29] V. Pinheiro, P. Holliger, New materials from synthetic genetic polymers, *Trends Biotechnol.*, tom 32, nr 6, str. 321–328, 2014.
- [30] B. Peel, G. Hagen, K. Krishnamurthy, J. Desaulniers, Conjugation and evaluation of small hydrophobic molecules to triazole-linked siRNAs, *ACS Med. Chem. Lett.*, tom 6, nr 2, str. 117–122, 2015.

- [31] S. Venkiteswaran, V. Vijayanathan, A. Shirahata, T. Thomas, T. Thomas, Antisense recognition of the HER-2 mRNA: Effects of phosphorothioate substitution and polyamines on DNA.RNA, RNA.RNA, and DNA.DNA duplex stability, *Biochem.*, tom 44, nr 1, str. 303–312, 2005.
- [32] S. Arangundy-Franklin, A. Taylor, B. Porebski, V. Genna, S. Peak-Chew, A. Vaisman, R. Woodgate, M. Orozco, P. Holliger, A synthetic genetic polymer with an uncharged backbone chemistry based on alkyl phosphonate nucleic acids, *Nat. Chem.*, tom 11, str. 533–542, 2019.
- [33] M. Ganguly, F. Wang, M. Kaushik, M. P. Stone, L. A. Marky, B. Gold, A study of 7-deaza-2'-deoxyguanosine–2'-deoxycytidine base pairing in DNA, *Nucleic Acids Res.*, tom 24, str. 2974–2980, 1996.
- [34] J. Winkler, Oligonucleotide Conjugates for Therapeutic Applications, *Therapeutic Delivery*, tom 4, nr 7, str. 791–809, 2013.
- [35] Y. Singh, P. Murat, E. Defrancq, Recent developments in oligonucleotide conjugation, *Chem. Soc. Rev.*, tom 39, str. 2054–2070, 2010.
- [36] F. R. Beierlein, M. P. Palomo, D. I. Sharapa, O. Zozulia, A. Mokhir, T. Clark, DNA-dye-conjugates: Conformations and spectra of fluorescence probes, *PLOS ONE*, tom 11, nr 7, str. e0160229, 2016.
- [37] M. B. Danielsen, N. J. Christensen, P. T. Jørgensen, K. J. Jensen, J. Wengel, C. Lou, Polyamine-Functionalized 2'-Amino-LNA in Oligonucleotides: Facile Synthesis of New Monomers and High-Affinity Binding towards ssDNA and dsDNA, *Chem. Eur. J.*, tom 27, nr 4, str. 1416–1422, 2021.
- [38] L. Lerman, Structural considerations in the interactions of DNA and acridines, *J. Mol. Biol.*, tom 3, pp. 18–30, 1961.
- [39] M. J. Waring, Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: Evidence for molecular models involving intercalation, *J. Mol. Biol.*, tom 54, nr 2, str. 247–279, 1970.
- [40] U. Pindur, M. Haber, K. Sattler, Antitumor Active Drugs as Intercalators of Deoxyribonucleic Acid (Molecular Models of intercalation Complexes), *J. Chem. Educ.*, tom 70, nr 4, str. 263–272, 1993.
- [41] C. Carvalho, R. X. Santos, S. Cardoso, S. Correia, P. J. Oliveira, M. S. Santos, P. I. Moreira, Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect, *Curr. Med. Chem.*, tom 16, nr 25, str. 3267–3285, 2009.
- [42] R. B. Weiss, The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?, *Semin. Oncol.*, tom 19, nr 6, str. 670–686, 1992.
- [43] Y. Yamaguchi, Y. Matsubara, T. Ochi, T. Wakamiya, Z.-I. Yoshida, How the π Conjugation Length Affects the Fluorescence Emission Efficiency, *J. Am. Chem. Soc.*, tom 130, nr 42, str. 13867–13869, 2008.
- [44] T. Endo, C. Ueda, H. Kajita, N. Okuda, S. Tanaka, H. Hisamoto, Enhancement of the fluorescence intensity of DNA intercalators using nano-imprinted 2-dimensional photonic crystal, *Microchim. Acta*, tom 180, str. 929–934, 2013.

- [45] N. Ataci, N. Arsu, Studies of the binding mode of TXNHCH₂COOH with calf thymus DNA by spectroscopic methods, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, tom 169, pp. 128–133, 2016.
- [46] N. Kuźnik, K. Walczak, M. D. Tomczyk, Cyclen-based artificial nucleases: Three decades of development (1989–2022). Part a – Hydrolysis of phosphate esters, *Coord. Chem. Rev.*, tom 481, str. 215047, 2023.
- [47] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.*, tom 7, str. 42717, 2017.
- [48] G. W. Gokel, D. M. Goli, C. Minganti, L. Echegoyen, Clarification of the hole-size cation-diameter relationship in crown ethers and a new method for determining calcium cation homogeneous equilibrium binding constants, *J. Am. Chem. Soc.*, tom 105, nr 23, str. 6786–6788, 1983.
- [49] K. A. Arnold, J. Mallen, J. E. Trafton, B. D. White, F. R. Fronczek, L. M. Gehrig, R. D. Gandour, G. W. Gokel, Ring-sidearm cooperativity in cation inclusion complexes of 12-membered ring lariat ethers: effect of sidearm chain length and a clarification of long-sidearm binding strengths, *J. Org. Chem.*, tom 53, nr 24, str. 5652–5657, 1988.
- [50] S. C. Gad, C. Reilly, K. Siino, F. A. Gavigan, G. Witz, Thirteen cationic ionophores: Their acute toxicity, neurobehavioral and membrane effects, *Drug Chem. Toxicol.*, tom 8, nr 6, str. 451–468, 1985.
- [51] A. V. Rudraraju, P. N. A. Amoyaw, T. J. Hubin, M. O. F. Khan, Determination of log P values of new cyclen based antimalarial drug leads using RP-HPLC, *Pharmazie.*, tom 69, nr 9, str. 655–662, 2014.
- [52] J. W. Steed, First- and second-sphere coordination chemistry of alkali metal crown ether complexes, *Coord. Chem. Rev.*, tom 215, nr 1, str. 171–221, 2001.
- [53] B. Pressman, Biological applications of ionophores, *Annu. Rev. Biochem.*, tom 45, str. 501–530, 1976.
- [54] J. C. Bousquet, S. Saini, D. D. Stark, P. F. Hahn, M. Nigam, J. Wittenberg, J. T. Ferrucci, Gd-DOTA: characterization of a new paramagnetic complex, *Radiology*, tom 166, nr 3, str. 693–698, 1988.
- [55] K. Tamura, H. Kurihara, K. Yonemori, H. Tsuda, J. Suzuki, Y. Kono, N. Honda, M. Kodaira, H. Yamamoto, M. Yunokawa, C. Shimizu, K. Hasegawa, Y. Kanayama, S. Nozaki, T. Kinoshita, Y. Wada, S. Tazawa, K. Takahashi, Y. Watanabe, Y. Fujiwara, ⁶⁴Cu-DOTA-Trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer, *J. Nucl. Med.*, tom 54, nr 11, str. 1869–1875, 2013.
- [56] O. Nakagawa, X. Ming, L. Huang, R. L. Juliano, Targeted intracellular delivery of antisense oligonucleotides via conjugation with small-molecule ligands, *J. Am. Chem. Soc.*, tom 132, nr 26, str. 8848–8849, 2010.
- [57] O. Khorev, D. Stokmaier, O. Schwardt, B. Cutting, B. Ernst, Trivalent, Gal/GalNAc-containing ligands designed for the asialoglycoprotein receptor, *Bioorg. Med. Chem.*, tom 16, nr 9, str. 5216–5231, 2008.

- [58] C. Lou, S. V. Samuelsen, N. J. Christensen, B. Vester, J. Wengel, Oligonucleotides containing aminated 2'-amino-LNA nucleotides: Synthesis and strong binding to complementary DNA and RNA, *Bioconjugate Chem.*, tom 28, nr 4, str. 1214–1220, 2017.
- [59] Z. Xu, W. Cheng, K. Guo, J. Yu, J. Shen, J. Tang, W. Yang, M. Yin, Molecular Size, Shape, and Electric Charges: Essential for Perylene Bisimide-Based DNA Intercalator to Localize in Cell Nuclei and Inhibit Cancer Cell Growth, *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, tom 7, nr 18, str. 9784–9791, 2015.
- [60] A. V. Slita, N. A. Kasyanenko, O. V. Nazarova, I. I. Gavrilova, E. M. Eropkina, A. K. Sirotkin, T. D. Smirnova, O. I. Kiselev, E. F. Panarin, DNA-polycation complexes Effect of polycation structure on physico-chemical and biological properties, *J. Biotechnol.*, tom 127, nr 4, str. 679–693, 2007.
- [61] M. Franceschin, C. M. Lombardo, E. Pascucci, D. D'Ambrosio, E. Micheli, A. Bianco, G. Ortaggi, M. Savino, The number and distances of positive charges of polyamine side chains in a series of perylene diimides significantly influence their ability to induce Gquadruplex structures and inhibit human telomerase, *Bioorg. Med. Chem.*, tom 16, nr 5, str. 2292–2304, 2008.
- [62] E. Micheli, C. M. Lombardo, D. D'Ambrosio, M. Franceschin, S. Neidle, M. Savino, Selective Gquadruplex ligands: The significant role of side chain charge density in a series of perylene derivatives, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, tom 19, nr 14, str. 3903–3908, 2009.
- [63] Z. Tian, Y. Huang, Y. Zhang, L. Song, Y. Qiao, X. Xu, C. Wang, Spectroscopic and molecular modeling methods to study the interaction between naphthalimide-polyamine conjugates and DNA, *J. Photochem. Photobiol. B*, tom 158, str. 1–15, 2016.
- [64] S. G. König, R. Krämer, Polyamine-modified nearinfrared cyanine dyes for targeting the nuclei and nucleoli of cells, *Dyes Pigm.*, tom 145, str. 80–94, 2017.
- [65] R. A. Gardner, J.-G. Delcros, F. Konate, F. Breitbeil, B. Martin, M. Sigman, M. Huang, O. Phanstiel, N1-Substituent effects in the selective delivery of polyamine conjugates into cells containing active polyamine transporters, *J. Med. Chem.*, tom 47, nr 24, str. 6055–6069, 2004.
- [66] C. Wang, J.-G. Delcros, J. Biggerstaff, O. Phanstiel, Molecular requirements for targeting the polyamine transport system: Synthesis and biological evaluation of polyamine anthracene conjugates, *J. Med. Chem.*, tom 46, nr 13, str. 2672–2682, 2003.
- [67] C. Wang, J.-G. Delcros, L. Cannon, F. Konate, H. Carias, J. Biggerstaff, R. A. Gardner, O. Phanstiel, Defining the molecular requirements for the selective delivery of polyamine conjugates into cells containing active polyamine transporters, *J. Med. Chem.*, tom 46, nr 24, str. 5129–5138, 2003.
- [68] O. Phanstiel, N. Kaur, J.-G. Delcros, Structure-activity investigations of polyamine-anthracene conjugates and their uptake via the polyamine transporter, *Amino Acids*, tom 33, nr 2, str. 305–313, 2007.

- [69] N. Umezawa, Y. Horai, Y. Imamura, M. Kawakubo, M. Nakahira, N. Kato, A. Muramatsu, Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa, T. Higuchi, Structurally diverse polyamines: Solid-phase synthesis and interaction with DNA, *ChemBioChem*, tom 16, nr 12 str. 1811–1819, 2015.
- [70] A. Dobrovolskaite, R. A. Gardner, J.-G. Delcros, O. Phanstiel, Development of polyamine lassos as polyamine transport inhibitors, *ACS Med. Chem. Lett.*, tom 13, nr 2, str. 319–326, 2022.
- [71] S. Tan, D. Sun, J. Lyu, X. Sun, F. Wu, Q. Li, Y. Yang, J. Liu, X. Wang, Z. Chen, H. Li, X. Qian, Y. Xu, Antiproliferative and apoptosis-inducing activities of novel naphthalimide-cyclam conjugates through dual topoisomerase (topo) I/II inhibition, *Bioorg. Med. Chem.*, tom 23, nr 17, str. 5672–5680, 2015.
- [72] M. Fang, L. Wei, Z. Lin, G.-Y. Lu, Synthesis and DNA cleavage properties of triazacrown derivatives, *Chin. J. Chem.*, tom 32, nr 2, str. 142–150, 2014.
- [73] J. A. Krauser, A. L. Joshi, I. O. Kady, Metal complexes of modified cyclen as catalysts for hydrolytic restriction of plasmid DNA, *J. Inorg. Biochem.*, tom 104, nr 8, str. 877–884, 2010.
- [74] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, tom 40, nr 11, str. 2004–2021, 2001.
- [75] J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, tom 130, nr 34, str. 11486–11493, 2008.
- [76] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, tom 47, nr 12, str. 2253–2255, 2008.
- [77] C. G. Gordon, J. L. Mackey, J. C. Jewett, E. M. Sletten, K. N. Houk, C. R. Bertozzi, Reactivity of Biarylazacyclooctynones in Copper-Free Click Chemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, tom 134, nr 22, str. 9199–9208, 2012.
- [78] Y. Hsiang, J. Jiang i L. Liu, Naphthalimides induce G2 arrest through the ATM-activated Chk2-executed pathway in HCT116 cells, *Neoplasia*, tom 11, nr 11, str. 1226–1234, 2009.
- [79] R. Rosell, J. Carles, A. Abad, N. Ribelle, A. Barnadas, A. Benavides, M. Miguel, Phase study of mitonafide in 120 hour continuous, *Invest. New Drugs*, tom 10, nr 3, str. 171–175, 1992.
- [80] E. Díaz-Rubio, M. Martín, J. López-Vega, A. Casado, A. Benavides, Phase I study of mitonafide with a 3-day administration schedule: early interruption due to severe central nervous system toxicity, *Invest. New Drugs*, tom 12, nr 4, str. 277–281, 1994.
- [81] A. Miller, D. Case, M. Harmon, P. Savage, G. Lesser, D. Hurd, S. Melin, Phase I study of lenalidomide in solid tumors, *Thorac. Oncol.*, tom 2, nr 5, str. 445–449, 2007.

- [82] M. D. Tomczyk, K. Z. Walczak, 1,8-Naphthalimide Based DNA Intercalators and Anticancer Agents. A Systematic Review from 2007 to 2017, *Eur. J. Med. Chem.*, tom 159, str. 393–422, 2018.
- [83] A. Khosravi, S. Moradian, K. Gharanjig, F. Taromi, Synthesis and spectroscopic studies of some naphthalimide based disperse azo dyestuffs for the dyeing of polyester fibres, *Dye. Pigment.*, tom 69, nr 1–2, str. 79–92, 2006.
- [84] D. K. Balta, G. Temel, M. Aydin, N. Arsu, Thioxanthone based water-soluble photoinitiators for acrylamide photopolymerization, *Eur. Polym. J.*, tom 46, nr 6, str. 1374–1379, 2010.
- [85] X. Dong, P. Hu, W. Shen, Z. Li, R. Liu, X. Liu, Carbanion as a Superbase for Catalyzing Thiol–Epoxy Photopolymerization, *Polymers*, tom 9, nr 9, str. 400, 2017.
- [86] M. J. Calverley, D. Johannes, 1,4,7-Trioxa-10- azacyclododecane and Some N-Substituted Derivatives, *Acta Chem. Scand. B*, tom 36b, str. 241–241, 1982.
- [87] D. P. Sebesta, S. S. O'Rourke, R. L. Martinez, W. A. Pieken, D. P. C. McGee, 2'-Deoxy-2'-alkoxylaminouridines: Novel 2'-substituted uridines prepared by intramolecular nucleophilic ring opening of 2,2'-O-anhydrouridines, *Tetrahedron*, tom 52, nr 46, str. 14385–14402, 1996.
- [88] M. M. Faul, B. E. Huff, S. E. Dunlap, S. A. Frank, J. E. Fritz, S. W. Kaldor, M. E. LeTourneau, M. A. Staszak, J. A. Ward, J. A. Werner, L. L. Winneroski, Synthesis of 2',3'-dideoxy-3'-hydroxymethylcytidine; a unique antiviral nucleoside, *Tetrahedron*, tom 53, nr 24, str. 8085–8104, 1997.
- [89] R. P. Paitandi, S. Mukhopadhyay, R. S. Singh, V. Sharma, S. M. Mobin, D. S. Pandey, Anticancer activity of iridium(III) complexes based on a pyrazole-appended quinoline-based BODIPY, *Inorg. Chem.*, tom 50, nr 20, str. 12232 – 12247, 2017.
- [90] N. Cheng, Y. Chen, J. Yu, J.-J. Li, Y. Liu, Enhanced DNA Binding and Photocleavage Abilities of β -Cyclodextrin Appended Ru(II) Complex through Supramolecular Strategy, *Bioconjugate Chem.*, tom 29, nr 6, str. 1829 – 1833, 2018.
- [91] A. K. Larsen, A. E. Escargueil, A. Skladanowski, Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy, *Pharmacol. Ther.*, tom 99, nr 2, str. 167–181, 2003.
- [92] T. Plech, B. Kaproń, A. Paneth, M. Wujec, R. Czarnomysy, A. Bielawska, K. Bielawski, N. Trotsko, E. Kuśmierz, P. Paneth, Search for human DNA topoisomerase II poisons in the group of 2,5-disubstituted-1,3,4-thiadiazoles, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, tom 30, nr 6, str. 1021–1026, 2015.
- [93] L. Wang, D. A. Eastmond, Catalytic inhibitors of topoisomerase II are DNA-damaging agents: induction of chromosomal damage by merbarone and ICRF-187, *J. Environ. Mol. Mutagen.*, tom 39, nr 4, str. 348–356, 2001.
- [94] W. M. Dai, C. W. Chow, L. Zhou, A. Ishii, C. W. Lau, Q. Li, W. Hamaguchi, S. Nishimoto, Bifunctional 2-naphthyl propargylic sulfones exhibiting high DNA

- intercalating and alkylating activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, tom 9, nr 19, pp. 2789–2794, 1999.
- [95] N. C. Okoye, J. E. Baumeister, F. N. Khosroshahi, H. M. Hennkens, S. S. Jurisson, Chelators and metal complex stability for radiopharmaceutical applications, *Radiochim. Acta*, tom 107, nr 9, pp. 1087–1120, 2019.
- [96] M. Shionoya, T. Ikeda, E. Kimura, M. Shiro, Novel "multipoint" molecular recognition of nucleobases by a New Zinc(II) Complex of Acridine-Pendant Cyclen (Cyclen = 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane), *J. Am. Chem. Soc.*, tom 116, nr 9, str. 3848–3859, 1994.
- [97] J. E. Hein, V. V. Worrell, Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(i) acetylides, *Chem. Soc. Rev.*, tom 39, str. 1302–1315, 2010.
- [98] U. S. Srinivas, B. W. Q. Tan, B. A. Vellayappan, A. D. Jeyasekharan, ROS and the DNA damage response in cancer, *Redox Biol.*, tom 25, str. 101084, 2019.

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

„Synteza i właściwości biologiczne modyfikowanych interkalatorów i makrocykli”

Mgr inż. Mateusz Dawid Tomczyk

Promotor: Prof. dr hab. inż. Krzysztof Walczak

Modyfikacje struktury chemicznej związków organicznych stanowią jedną z najbardziej efektywnych strategii w tworzeniu nowych związków o aktywności biologicznej. Ta strategia polega najczęściej na wprowadzaniu małych modyfikacji do badanej cząsteczki i analizie ich wpływu na różne właściwości biologiczne, takie jak aktywność antyproliferycyjna, selektywność w działaniu na komórki nowotworowe, zmiana wchłaniania i lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Wyniki takich badań są istotne dla opracowywania nowych i bardziej skutecznych leków przeciwnowotworowych, terapii genetycznych oraz metod obrazowania zmian chorobowych

Badania przeprowadzone w tej rozprawie doktorskiej dotyczą syntezy i oceny wybranych właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych małowcząsteczkowych pochodnych bezwodnika 1,8-naftalenowego, tioksantonu, cykленu i 1-aza-12-korony-4, a także ich koniugatów z oligonukleotydami. Wszystkie otrzymane pochodne charakteryzuje wprowadzenie łączyń alkilowych zakończonych grupą azydkową lub propargilową, które zostały wykorzystane w strategii *click chemistry*, umożliwiającej połączenie poszczególnych bloków budulcowych i biocząsteczek za pomocą reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydo-alkinowej katalizowanej miedzią(I). Struktury i właściwości fizykochemiczne otrzymanych związków zostały scharakteryzowane przy użyciu różnych technik, takich jak spektrometria HRMS, spektroskopia NMR, IR, UV-Vis oraz spektroskopia emisyjna. Przeprowadzono również ocenę podstawowych właściwości biologicznych otrzymanych związków, w tym ocenę aktywności antyproliferycyjnej wobec linii komórkowych nowotworowych i prawidłowych, (przy uwzględnieniu efektu fotodynamicznego); ponadto oceniono zdolność do inhibicji topoizomerazy II, uszkodzenia DNA komórkowego oraz oddziaływania koniugatów z DNA i stabilizacji podwójnej helisy.

Wyniki przeprowadzonych badań umożliwiły zrozumienie wpływu poszczególnych modyfikacji chemicznych na aktywność biologiczną badanych grup związków. Stwierdzono, które modyfikacje przyczyniają się do wzrostu, obniżenia lub nie mają istotnego wpływu na aktywność antyproliferycyjną. Dodatkowo, wykazano skuteczność koniugacji pochodnych 1,8-naftalimidu i tioksantonu z odpowiednimi makrocyklami jako strategii modyfikacji ich właściwości biologicznych, zwłaszcza w zakresie wchłaniania komórkowego. Obserwowano poprawę wchłaniania w przypadku koniugacji z 1-aza-12-koroną-4, a pogorszenie w przypadku koniugacji z cyklenem, co miało wpływ na aktywność antyproliferycyjną otrzymanych koniugatów. Badania pozwoliły również na określenie wpływu koniugacji badanych związków na komplementarność i stabilizację podwójnej helisy DNA. Wyniki tej pracy doktorskiej mogą znaleźć zastosowanie w dziedzinie chemii medycznej przy projektowaniu nowych substancji o potencjalnym zastosowaniu w terapiach przeciwnowotworowych i genetycznych.

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

"Synthesis and biological properties of modified intercalators and macrocycles"

MSc Eng. Mateusz Dawid Tomczyk
Supervisor: Prof. Krzysztof Walczak PhD, DSc.

Chemical structure modifications of organic compounds are one of the most effective strategies for creating new compounds with biological activity. This strategy often involves introducing small modifications to the investigated molecule and analyzing their impact on various biological properties, such as antiproliferative activity, selectivity towards cancer cells, changes in cellular uptake, and intracellular localization. The results of such studies are crucial for the development of new and more effective anticancer drugs, gene therapies, and imaging methods for disease detection.

The research presented in this doctoral thesis focuses on the synthesis and evaluation of selected physicochemical and biological properties of small molecule derivatives of 1,8-naphthalimide, thioxanthone, cyclen, and 1-aza-12-crown-4, as well as their conjugates with oligonucleotides. All obtained derivatives are characterized by the introduction of alkyl linkers terminated with an azide or propargyl group, which were utilized in the click chemistry strategy enabling the connection of building blocks and biomolecules through copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar azido-alkyne cycloaddition reaction. The structures and physicochemical properties of the obtained compounds were characterized using various techniques, including HRMS spectrometry, NMR, IR, UV-Vis and emission spectroscopy. The basic biological properties of the obtained compounds were also assessed, including their antiproliferative activity against cancer and normal cell lines (considering the photodynamic effect), as well as their ability to inhibit topoisomerase II, induce DNA damage, interact with DNA, and stabilize the double helix.

The results of the conducted research provided an understanding of the impact of specific chemical modifications on the biological activity of the investigated compound groups. It was determined which modifications contribute to an increase, decrease, or have no significant effect on antiproliferative activity. Furthermore, the effectiveness of conjugating derivatives of 1,8-naphthalimide and thioxanthone with appropriate macrocycles as a strategy to modify their biological properties, particularly cellular uptake, was demonstrated. Improved cellular uptake was observed in the case of conjugation with 1-aza-12-crown-4, while conjugation with cyclen led to a decrease in cellular uptake, affecting the antiproliferative activity of the obtained conjugates. The studies also allowed for determining the influence of conjugation on the complementarity and stabilization of the DNA double helix. The results of this doctoral thesis can find practical applications in the field of medicinal chemistry for the design of new biologically active substances with potential applications in anticancer and genetic therapies.