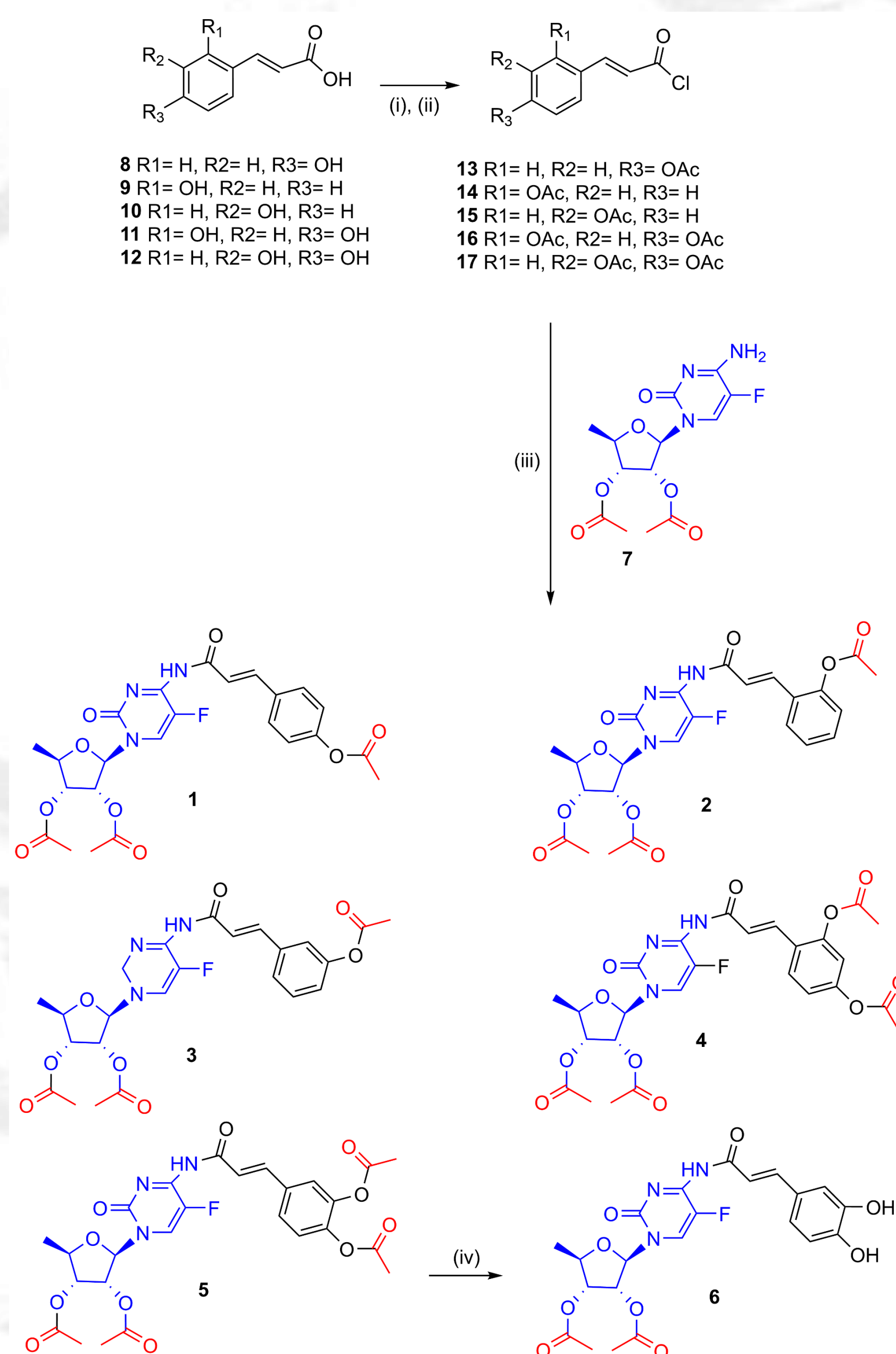


Marcin Cybulski^{1,*}, *Magdalena Zaremba-Czogalla*², *Bartosz Trzaskowski*³, *Marek Kubiszewski*¹,
*Joanna Tobiasz*¹, *Piotr Krzeczyński*¹, *Jerzy Gubernator*², *Anna Jaromin*², *Olga Michalak*¹

5-Fluorouracyl (5-FU), lek z grupy antymetabolitów, jest stosowany w leczeniu różnych rodzajów nowotworów złośliwych. Skuteczność doustnego leczenia 5-FU jest ograniczona, dlatego możliwą drogę jego podania stanowi infuzja dożylna. W ostatnich dekadach wykazano, że doustne proleki 5-FU mogą być równie skuteczne w leczeniu. Tegafur i kapecytabina są zatwierdzone w terapii raka trzustki, należącego do nowotworów o najniższych wskaźnikach przeżywalności. Badania koniugatów chemoterapeutyków stanowią jedną z obiecujących strategii poszukiwania związków o zwiększonej skuteczności. Ponadto w projektowaniu proleków wykorzystuje się m.in. ich podatność na biotransformację przez karboksyesterazę CES2 w pierwszym etapie metabolizmu. W ten sposób zaprojektowano znane leki z różnych grup terapeutycznych. Wysoka aktywność CES2 w gruczolakoraku przewodowym trzustki PDAC wiąże się ze zwiększeniem wrażliwości pacjenta na irynotekan. Wprowadzenie do struktury 5'-deoksy-5-fluorocytydyny (5-dFCR) – związku ze szlaku metabolicznego kapecytabiny – podstawników modulujących poziomy komórkowego ROS, może być jedną z metod przezwyciężenia zjawiska oporności na 5-FU. Zaprojektowano, otrzymano i zbadano metodami *in silico* oraz *in vitro* nowe koniugaty amidowe kwasów hydroksycynamonowych (HCA) oraz 5'-deoksy-5-fluorocytydyny.

Synteza koniugatów

Peracetylowane związki **1-5**, potencjalnie podatne na biotransformację przez enzym CES2, otrzymano z 5'-deoksy-2',3'-di-O-acetylo-5-fluorocytydyny (**7**) i odpowiednich chlorków kwasów acetyloksycynamonowych **13-17** (Rysunek 1). Reakcję kondensacji przeprowadzono w chlorku metylenu, w obecności pirydyny, w temp. od -20°C do -10°C, z wydajnościami 30–50%. Związek **5** został wybrany jako modelowy substrat do badań hydrolizy grup acetylowych. Reakcja w chloroformie z K₂CO₃ oraz z katalityczną ilością metanolu doprowadziła do uzyskania semiacetylowanego **6** z wydajnością 42%. Struktury wszystkich związków potwierdzono za pomocą analizy HRMS oraz widm ¹H, ¹³C, 2D NMR. Analiza NMR wykazała brak dwóch grup acetylowych w koniugacie **6**, w jego fragmencie pochodzącym od kwasu kawowego.



Rysunek 1. Warunki reakcji: i) pirydyna, DMAP, (CH₃CO)₂O; (ii) SOCl₂, DCM; (iii) DCM, pirydyna, -20 do -5°C, następnie do r.t.; (iv) bezw. K₂CO₃/CHCl₃/kat. MeOH

Badania biologiczne in vitro

Aktywność cytotoksyczną związków **1-6** zbadano za pomocą testu MTT względem metastatycznej linii raka trzustki AsPC-1, linii pierwotnej BxPC-3 oraz normalnych komórek NHDF [2]. Związki wykazały podobną, umiarkowaną aktywność wobec AsPC-1 w zakresie IC₅₀ 37–133 μM (Tabela 1, Rysunek 1). Związek **6**, z niezabezpieczonymi w części kwasu kawowego grupami hydroksylowymi, wykazywał najniższą aktywność względem linii komórkowej AsPC-1. Testowane koniugaty skuteczniej oddziaływały na linię pierwotną BxPC-3 (IC₅₀ 14–45 μM). Peracetylowany koniugat **5** i jego semiacetylowany analog **6** wykazywały podobną aktywność wobec komórek BxPC-3 (odpowiednio IC₅₀= 31,6 μM oraz 23,1 μM) i AsPC-1 (IC₅₀= 90,1 μM oraz 132,6 μM).

Literatura

- [1] Cybulski, M. et al., RSC Adv. 2024, 14, 13129.
[2] Mosmann, T., J Immunol Methods. 1983, 65, 55.

Afilacje autorów

- ¹ Łukasiewicz-Institut Chemii Przemysłowej, ul. Rydygiera 8, Warszawa
² Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii, ul. Joliot-Curie 14a, Wrocław
³ Uniwersytet Warszawski, Centrum Nowych Technologii, ul. Banacha 2c, Warszawa

* marcin.cybulski@ichp.lukasiewicz.gov.pl

Do oceny selektywności związków użyto normalnych ludzkich fibroblastów (NHDF). Badane związki wykazały niską selektywność wobec AsPC-1 (SI w przedziale 1–2), a wyższą w przypadku BxPC-3. Pochodne kwasu kawowego **6** i kwasu *para*-kumarowego **1** charakteryzowały się najwyższym indeksem selektywności (SI ponad 7).

Tabela 1. IC₅₀ oraz wskaźniki selektywności (SI) związków **1-6** wobec linii PDAC określone za pomocą testu MTT.

Związek	IC ₅₀ (μM)		IC ₅₀ (μM)	SI	
	AsPC-1	BxPC-3		AsPC-1	BxPC-3
1	57,15±2,06	13,60±2,48	96,49±5,79	1,69	7,10
2	69,26±4,00	26,93±1,64	98,54±10,46	1,42	3,66
3	37,00±3,20	20,18±2,43	60,04±3,17	1,62	2,98
4	81,47±3,60	45,09±4,20	116,17±2,71	1,43	2,58
5	90,07±4,53	31,59±0,82	121,30±4,32	1,35	3,83
6	132,60±5,67	23,16±1,25	163,40±4,33	1,23	7,06
kapecytabina	>200	>200	>200	-	-
5-fluorouracyl (5-FU)	52,39±11,56	12,74±2,73	>200	-	-

Obliczenia in silico

Wyznaczono parametry ADMET. Związki nie zachowywały dwóch z pięciu reguł Lipinskiego ze względu na przekroczony limit masy molowej 500 Da, oraz zbyt dużą liczbę donorów/akceptorów wiązań wodorowych. W badaniu przewidywanej toksyczności przy użyciu ProTox-II67 wykazano wysokie szacunkowe wartości LD₅₀.

Dokowanie molekularne struktury kapecytabiny do karboksyesterazy CES2 ujawniło dwie potencjalne możliwości jej oddziaływania z Ser228 (Rysunek 2) należąca do triady katalitycznej CES2. Założono, że związki **1-6**, podobnie jak kapecytabina, mogą przybierać pozy pozwalające na ich oddziaływanie z Ser228 poprzez wiązanie wodorowe z resztami octanowymi dezoksyrybozy (Rysunek 2c, Tabela 2).

Rysunek 2. Przewidywane miejsce wiązania CES2 oraz pozy: **a)** kapecytabiny (poza 1), **b)** kapecytabiny (poza 2), **c)** związku **5**.

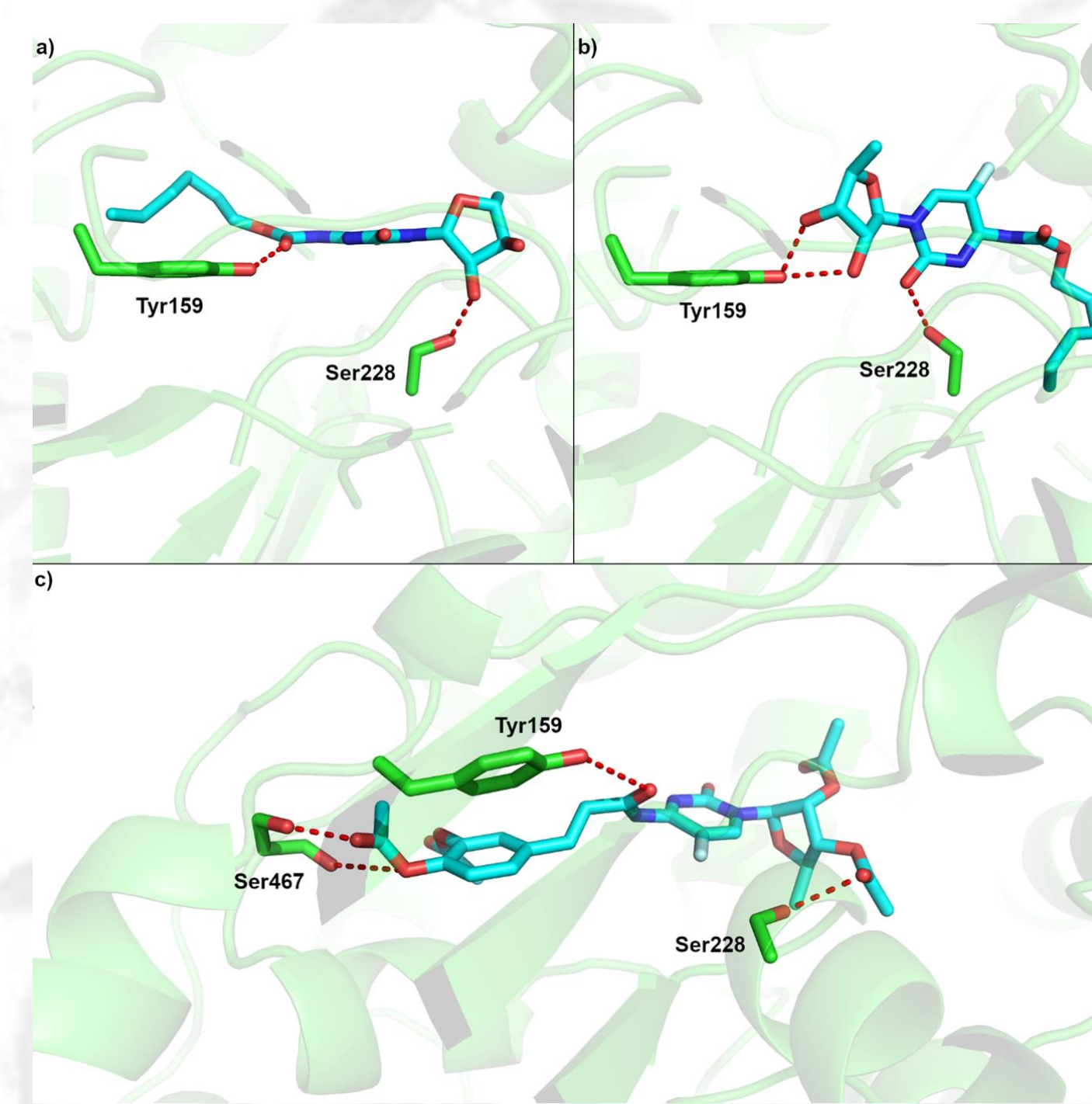


Tabela 2. Przewidywane zmiany swobodnej energii Gibbsa oraz stałe inhibicji badanych związków z CES2.

Związek	Poza 1	
	ΔG(kcal/mol) ^a	K _i (μM) ^b
1	-12,1	0,001
2	-8,8	0,334
3	-12,1	0,001
4	-9,6	0,100
5	-11,7	0,002
6	-10,3	0,030
5-dFCR	-7,5	5,000
kapecytabina	-7,6	4,000

Podsumowanie

Nowe amidowe koniugaty kwasów hydroksycynamonowych z 5-dFCR **1-6** wykazują wyższą skuteczność oraz selektywność *in vitro* względem pierwotnej linii BxPC-3. Biorąc pod uwagę, że mogą one działać jako substraty CES2, porównano aktywność analogów **5** i **6** różniących się liczbą grup acetylowych w cząsteczce. Oba związki charakteryzują się podobnym działaniem na komórki BxPC-3 i AsPC-1, co może wskazywać na ich enzymatyczną hydrolizę do tego samego związku aktywnego. Powyższą hipotezę wspierają wyniki obliczeń bioinformatycznych, w których wykazano silną interakcję koniugatów z resztą aminokwasową seryny, wchodzącej w skład triady katalitycznej odpowiedzialnej za zdolność hydrolizy przez CES2.

Finansowanie

Projekt zrealizowany w ramach dotacji celowej Prezesa Centrum Łukasiewicz, umowa no. 4/Ł-ICHP/CL/2021.